

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



**Bc. Kristýna Míčková**

Postkopulační pohlavní výběr a selekce na fenotyp spermií u vlaštovky obecné  
Postcopulatory sexual selection on phenotypic traits in European barn swallows

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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, dne

Podpis:

Kristýna Míčková

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Mgr. Tomáši Albrechtovi, Ph.D. za vedení mého studia, umožnění podílet se na výzkumu vlaštovky obecné na Třeboňsku a dále za cenné rady a pomoc během psaní a kontrolu tohoto textu. Dále mé díky patří Mgr. Romaně Micháلكové za analýzu genetických rodičů, MVDr. Oldřichovi Tomáškoví, PhD. za jakoukoliv pomoc, o kterou jsem požádala, a celému vlaštovčímu týmu za spolupráci a skvělý kolektiv v terénu. Děkuji také své rodině a příteli za podporu a nekonečnou důvěru, že to zvládnou.

## Abstrakt

Fenotyp spermií je zásadním ukazatelem kvality ejakulátu samců a může mít výrazný vliv na jejich reprodukční úspěch. Fenotyp spermií je značně variabilní mezi druhy, ale rozdíly lze najít i mezi jedince jednoho druhu. Tyto rozdíly mohou být způsobeny věkem samce či postkopulační selekcí. V této práci jsem se zabývala (1) variabilitou ve fenotypem spermií u vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*), (2) analýzou změn v kvalitě ejakulátu samců s věkem, (3) vztahem mezi morfologií spermií a rychlostí spermií, (4) vlivem fenotypu spermií (morfologie, motilita) na fertilizační úspěch samce s využitím rozsáhlého datasetu 174 pozorování pro 130 samců a údajů o mimopárovém úspěchu samců a (5) experimentálním studiem vlivu samičího prostředí na rychlost spermií. Z testovaných proměnných pouze délka krčku korelovala s věkem samce. Starší samci měli kratší krček spermií než mladší jedinci. Mezi věkem a reprodukčním úspěchem samců však nebyl prokázán žádný vztah. Celková délka spermií negativně ovlivňovala rychlost spermií a zároveň byl prokázán pozitivní vliv relativní délky krčku na rychlost spermií. Celkový reprodukční úspěch samců nebyl ovlivněn žádnou z testovaných proměnných. Samci s kratším relativním krčkem měli méně cizích mláďat ve vlastním hnízdě a samci s kratšími spermii a delším relativním krčkem spíše uspěli v mimopárových kopulacích. Tento výsledek je v souladu s prokázaným negativním vlivem délky spermií na motilitu. Stabilizující selekce na morfologii spermií nebyla v této studii u vlaštovky obecné prokázána. Samci s průměrnou délkou spermií nebyli úspěšnější než samci s kratšími či delšími spermii. Následné srovnání podváděných a podvádějících samců neprokázalo rozdíly ve velikosti či motilitě spermií. Experimentální část práce zaměřená na skrytou volbu samice prokázala, že spermie samců plavou lépe v samičím prostředí než v neutrálním mediu. Zároveň se však motilita nelišila v prostředí heterospecifické a konspecifické samice. Tyto výsledky ukazují možný vliv kompetice spermií na fenotyp spermií a zároveň prokazují roli skryté volby samice na pohyb spermií u vlaštovky obecné.

**Klíčová slova:** Postkopulační výběr, morfologie spermií, motilita spermií, senescence spermií, vlaštovka obecná

## **Abstract**

Sperm phenotype is an essential indicator of the male ejaculate quality and may have a significant impact on male reproductive success. Sperm phenotypes are considerably variable across species but variation is also found among males within species. This thesis examines (1) variation in sperm phenotypes among males in barn swallows (*Hirundo rustica*), (2) changes in male ejaculate quality with age, (3) relationships between sperm morphology and motility, (4) effects of sperm phenotypes (morphology and motility) on male fertilization success, using a large dataset of 174 observations for 130 males, and (5) the influence of female reproductive environment on sperm motility. From the tested variables, only midpiece length correlated with male age. Older males had shorter midpiece but no relationship between male age and reproductive success was found. Sperm length negatively affected sperm motility and, simultaneously, relative midpiece length positively correlated with sperm motility. No correlation was found between the male reproductive success and sperm motility, presence of abnormalities, length of outermost tail feathers or age. Males with shorter relative midpiece were more successful in within-pair paternity, and males with shorter sperms but longer relative midpiece were more successful in extrapair copulations. This result is consistent with a negative relationship between sperm length and motility. Stabilizing selection on sperm length of barn swallow has not been proven, as males with medium sized sperm did seem to outcompete short or long sperm males. A comparison of sperm traits in cuckolding males and males they cuckolded did not reveal any differences in sperm morphology or motility. The experimental part of thesis focused on cryptic female choice. Sperm cells were swimming better in a setup mimicking the female reproductive environment than in a neutral medium. Sperm motility, however, did not differ between female environment of heterospecific and conspecific females. The results indicate that postcopulatory selection may affect several sperm phenotypes in barn swallows and demonstrate some role of cryptic female choice on sperm performance in this species.

**Key words:** Postcopulatory sexual selection, sperm morphology, sperm motility, sperm senescence, barn swallow

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>1.1. FENOTYP SPERMIÍ</b>	<b>8</b>
1.1.1. MORFOLOGIE PĚVČÍ SPERMIE	11
1.1.2. ABNORMÁLNÍ MORFOLOGIE SPERMIÍ	12
1.1.3. SENESCENCE SPERMIÍ	13
<b>1.2. VLIV DÉLKY SPERMIE NA MOTILIT</b>	<b>14</b>
<b>1.3. MIMOPÁROVÉ KOPULAC</b>	<b>15</b>
<b>1.4. PREKOPULAČNÍ ZNAKY OVLIVŇUJÍCÍ REPRODUKČNÍ ÚSPĚCH SAMC</b>	<b>17</b>
<b>1.5. POSTKOPULAČNÍ SELEKCE</b>	<b>18</b>
1.5.1. KOMPETICE SPERMIÍ	19
<i>1.5.1.1. VNITRODRUHOVÁ VARIABILITA V DÉLCE SPERMIÍ</i>	21
1.5.2. SKRYTÁ VOLBA SAMICE	23
<i>1.5.2.1. SKLADOVÁNÍ SPERMIÍ</i>	25
<i>1.5.2.2. VLIV SAMIČÍHO PROSTŘEDÍ NA MOTILITU SPERMIÍ</i>	27
<b>1.6. VLAŠTOVKA OBECNÁ – MODELOVÝ ORGANIZMUS</b>	<b>28</b>
<b>1.7. CÍLE PRÁCE</b>	<b>31</b>
<b>2. METODIKA</b>	<b>32</b>
<b>2.1. ODCHYTY</b>	<b>32</b>
<b>2.2. ODBĚR VZORKŮ</b>	<b>33</b>
<b>2.3. DÉLKA SPERMIÍ</b>	<b>33</b>
2.3.1. ANALÝZA ABNORMALIT	34
<b>2.4. MOTILITA SPERMIÍ</b>	<b>36</b>
<b>2.5. EXPERIMENT MOTILITY V NEUTRÁLNÍM MEDIU A SAMIČÍM PROSTŘEDÍ</b>	<b>37</b>
<b>2.6. ANALÝZA PATERNIT</b>	<b>38</b>
<b>2.7. STATISTICKÉ VYHODNOCOVÁNÍ</b>	<b>39</b>
<b>3. VÝSLEDKY</b>	<b>41</b>
<b>3.1. VELIKOST SPERMIÍ</b>	<b>42</b>
3.1.1. OPAKOVATELNOST VE FENOTYPU SPERMIÍ	42
3.1.2. ABNORMÁLNÍ MORFOLOGIE	43

3.1.3. SENESENCE SPERMÍÍ	44
3.2. VLIV DÉLKY SPERMÍÍ NA MOTILIT	45
3.3. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ REPRODUKČNÍ ÚSPĚCH SAMCŮ	47
3.4. SROVNÁNÍ PODVÁDĚNÝCH A MIMOPÁROVÝCH SAMCŮ	51
3.5. VLIV SAMIČÍHO PROSTŘEDÍ NA MOTILITU SPERMÍÍ	54
<b>4. DISKUZE</b>	<b>57</b>
4.1. FENOTYP SPERMÍÍ A ABNORMALITY U VLAŠTOVKY OBECNÉ	57
4.2. SENESENCE SPERMÍÍ A VLIV VĚKU NA REPRODUKČNÍ ÚSPĚCH SAMCŮ	58
4.3. VLIV DÉLKY SPERMÍÍ NA MOTILITU	59
4.4. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ REPRODUKČNÍ ÚSPĚCH SAMCŮ	60
4.5. SROVNÁNÍ PODVÁDĚNÝCH A PODVÁDĚJÍCÍCH SAMCŮ	63
4.6. VLIV SAMIČÍHO PROSTŘEDÍ NA MOTILITU SPERMÍÍ	63
<b>5. ZÁVĚR</b>	<b>65</b>
<b>6. LITERATURA</b>	<b>67</b>
<b>7. PŘÍLOHY</b>	<b>87</b>

# 1. Úvod

Samčí gamety, spermie, slouží k oplození vajíčka. Spermie patří mezi nejvariabilnější buňky. Rozdíly ve velikosti spermií můžeme najít nejen mezi jednotlivými druhy a poddruhy (např. Laskemoen et al. 2013a), ale také mezi jedinci v rámci jedné populace (např. Kleven et al. 2008). Variabilita ve velikosti spermií by mohla být částečně vysvětlena senescencí spermií. Se zvyšujícím se věkem samce se mohou objevovat chyby ve spermatogenezi (Pizzari et al. 2008), které mohou snižovat kvalitu spermií. U promiskuitních druhů může být velikost spermií ovlivněna i postkopulační selekcí, která se uplatňuje v podobě kompetice spermií (Parker 1970) a skryté volby samice (Thornhill 1983). Přes dosavadní výzkum však role postkopulační selekce není zcela probádána. Více pozornosti bylo věnováno studiu kompetice spermií, ale i zde výzkum narážel na četná úskalí. Díky vyvinuté metodě neinvazivního odběru ejakulátu (Wolfson 1952, Albrecht et al. 2013), se z pěvců stal modelový taxon pro studium kompetice spermií a vztahu mezi intenzitou postkopulační selekce a morfologickými či fyziologickými znaky spermií.

Ve své práci se věnuji studiu fenotypu spermií u vlaštovky obecné. Testovala jsem vliv stárnutí samců na fenotyp spermií a zároveň vliv postkopulační selekce na fenotyp spermií skrze reprodukční úspěch samců. V této práci jsem se dále pokusila propojit vliv prekopulačních i postkopulačních znaků na reprodukční úspěch samců. Součástí výzkumu postkopulační selekce byla i skrytá volba samice, která byla testována pomocí experimentů motility v neutrálním mediu a dvou typech samičího prostředí.

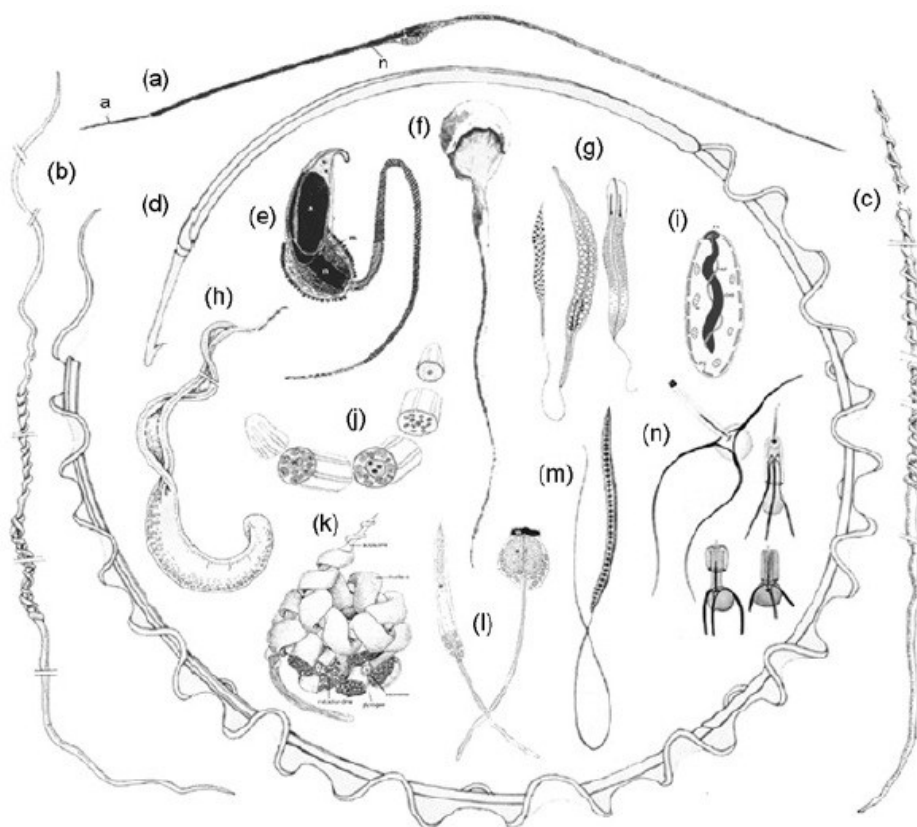
## 1.1. Fenotyp spermií

Jako první spermie objevil a pozoroval Antoni van Leeuwenhoek. Tehdy je označoval jako *animacules* (Birkhead 2010). Přestože je jejich funkce (oplození vajíčka) mezi taxony neměnná, jsou spermie velmi rozmanité (Obr. 1). Hnací silou evoluce morfologie a tedy i funkčnosti spermie byla především selekce skrze prostředí, ve kterém dochází k oplodnění. Druhy ryb, pro které je charakteristické vnitřní oplození, mají delší spermie než druhy s externím oplozením (Stockley et al. 1996). Vliv velikosti reprodukčního traktu samice na velikost spermií byla prokázána např. u brouků (Dybas & Dybas 1981), drosofilů (Pitnick & Markow 1994), molů (Morrow & Gage 2000) a ptáků (Briskie & Montgomerie 1992).



Spermie se obecně skládají ze 3 částí – hlavičky, krčku a bičíku. Hlavičku lze rozdělit na akrozomální a postakrozomální část. V první části se nachází akrozom obsahující enzymy, které jsou potřebné k průniku spermie do vajíčka (Drobnis & Overstreet 1992). V postakrozomální části spermie je uloženo jádro s genetickou informací. Krček nese koncentricky uspořádané mitochondrie, které produkují energii v podobě adenosintrifosfátu (ATP). Bičík pak bývá považován za hnací sílu spermie.

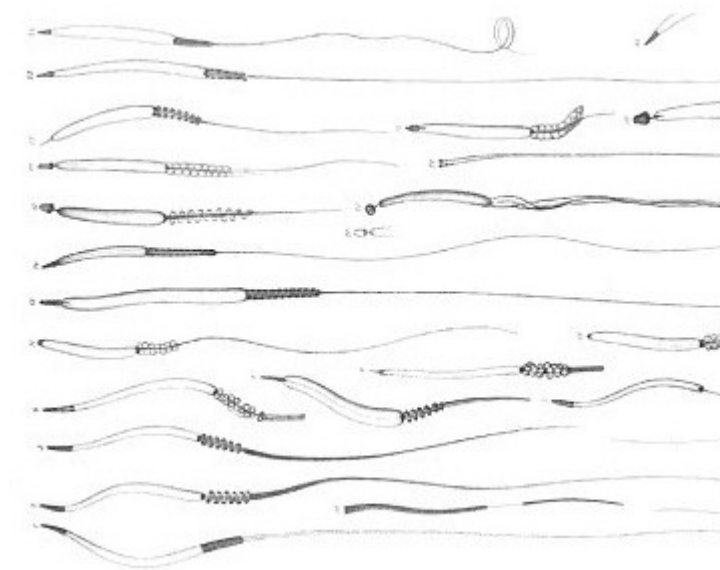
*Obr. 1. Variabilita v morfologii spermií u vybraných druhů bezobratlých a obratlovců. Převzato a upraveno podle Birkhead et al. 2009. (a) Aeolosoma litorale (Olejnuška, kroužkovci), (b) Acanthobdella peledina (Štětínovka sibiřská, kroužkovci), (c) Erpobdella octoculata (Hltanovka bahenní, kroužkovci), (d) Pleurodeles waltl (Žebrovník waltlův, strunatci), (e) Diurodrilus subterraneus (kroužkovci), (f) Cavia porcellus (Morče domácí, strunatci), (g) Echinoderes dujardini (Rypečka obecná, chobotovci, vlevo), E. capitatus (Rypečka, chobotovci, uprostřed), Pycnophyes communis (Rypečka, chobotovci, vpravo), (h) Epiphanes senta (vířníci), (i) Erythraeus phalangioides (členovci), (j) Parasitus berlesei (Savenka Berleseho, členovci), (k) Acerentulus tragardhi (Hmyzenka, členovci), (l) Tachypleus gigas (Ostrorep velký, členovci, vlevo), Nymphon sp. (členovci, vpravo) (m) Myzostomum cirriferum (kroužkovci), (n) Nephrops norvegicus (Humr norský, členovci).*



Morfologie spermií má vliv na funkčnost spermií, je zásadním ukazatelem kvality a může ovlivnit schopnost fertilizace (např. LaMunyon & Ward, 1998; Bennison et al. 2015; Knief et al. 2017; Kim et al. 2017; ale Cramer et al. 2003). Reprodukční úspěch samce může být ovlivněn délkou spermií či jejich komponent (např. LaMunyon & Ward 1998; García-González & Simmons 2007; Bennison et al. 2015; Knief et al. 2017, ale např. Cramer et al. 2013; Edme et al. 2017). Velmi často je sledován vztah mezi délkou spermií a motilitou (viz dále), jelikož motilita také patří mezi faktory ovlivňující reprodukční úspěch samce (např. Levitan 2000; Malo et al. 2005; Rudolfsen et al. 2008, Knief et al. 2017, ale Sætre et al. 2018). Dále může fertilizační schopnost samce ovlivnit zastoupení spermií s abnormální morfologií v ejakulátu (Baldredin 1959; Guzick et al. 2001; Malo et al. 2005; Schmoll & Kleven 2016).

Morfologie ptačí spermie vyjma pěvců je označována za sauropsidní typ vzhledem k podobnosti s plazími spermii. Ptačí spermie (obr. 2) jsou nitkovité, výrazně prodloužené a lze u nich rozpoznat jednotlivé komponenty (Humphreys 1972). Hlavička spermie je válcovitá a hladká. Krček je relativně krátký (Jamieson 2007) a nese větší množství mitochondrií (více než 1400 u křepelky japonské, *Coturnix japonica*, Korn et al. 2000). Morfologie pěvčí spermie je výrazně odlišná. Vzhledem k zaměření této práce na postkopulační procesy u vlaštovky obecné je pozornost věnována přednostně morfologii pěvčí spermie.

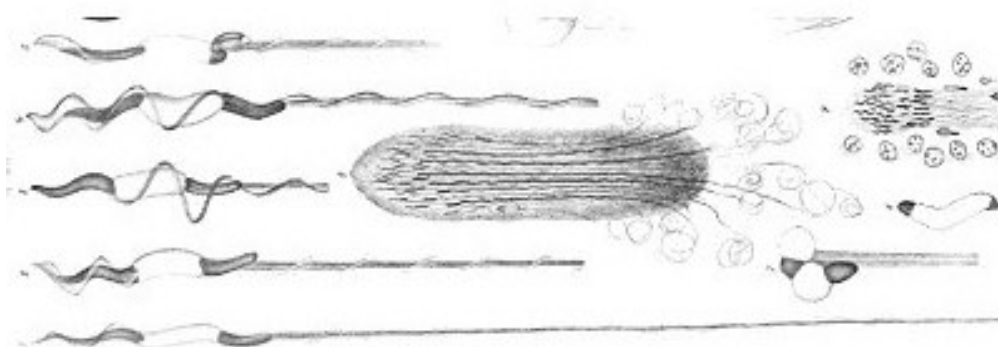
Obr. 2. Morfologie spermií u nepěvců. Převzato a upraveno podle Retzius 1909.



### 1.1.1. Morfologie pčvčí spermie

Spermie pčvců (Obr. 3) se vyznačují jedinečnou a snadno rozpoznatelnou morfologií. Hlavička je u nich na rozdíl od ostatních ptáků šroubovitá (helix) a navazuje na ní výrazně prodloužený krček tvořený pouze jednou fúzovanou mitochondrií, která je spirálovitě obtočena kolem bičíku. Terminální konec spermie je tvořen volnou částí bičíku. Díky své morfologii se spermie nepohybuje především mrskáním jako u jiných skupin, ale otáčí se kolem své osy a pohybuje se vpřed díky spirálovité konformaci (Humphreys 1972; Henley et al. 1978). Výjimku tvoří spermie hýla azorského (*Pyrrhula murina*) a obecného (*Pyrrhula pyrrhula*), které se velmi liší od pčvčího modelu. Spermie těchto druhů nejsou spirálovité. Hlavička je zesílená a válcovitá. Krček je extrémně krátký a obsahuje více než jednu mitochondrii (Lifjeld et al. 2013).

Obr. 3. Morfologie pčvčí spermie. Převzato a upraveno dle Retzius 1909.



Velikost pčvčích spermií je značně variabilní. Celková délka spermií pčvců se pohybuje v rozmezí od 35  $\mu\text{m}$  u některých zástupců čeledi *Pipridae* do 330  $\mu\text{m}$  u papežíků rodu *Passerina* (vlastní data, také Briskie et al. 1997). Rozdíly v délce spermií se vyznačují i jednotlivé poddruhy pčvců (*Hirundo rustica*, Laskemoen et al. 2013a; *Poephila acuticauda*, Rowe et al. 2015). Variabilitu ve velikosti spermií ovšem pozorujeme i mezi jedinci v rámci jedné populace (Kleven et al. 2008). Tato variabilita může být vysvětlována senescencí či rozdílnou intenzitou postkopulační selekce.

Bylo prokázáno, že fenotyp spermie je v rámci samce opakovatelný znak. Velikost spermií se vyznačuje vyšší opakovatelností než motilita spermií (Birkhead et al. 2005; Mossman et al. 2009; Laskemoen et al. 2013b; Opatová et al. 2016). Zároveň byla prokázána

částečná dedičnost těchto znaků (Birkhead et al. 2005; Mossman et al. 2009). Z těchto výsledků vyplývá, že samci mohou být charakterizováni specifickým fenotypem spermií. Nicméně údaje jsou k dispozici pouze pro omezený počet pěvčích druhů a je potřeba tyto informace doplnit.

### **1.1.2. Abnormální morfologie spermií**

Morfologie spermií je jedním z kvalitativních faktorů a určuje tedy i úspěšnost fertilizace. V morfologii spermií se mohou objevovat odchylky, které jsou považovány za abnormality, tedy vady hlavičky, krčku či bičíku. Abnormální spermie pak mohou být znevýhodněné vůči ostatním a někdy i přímo neschopné oplození. Přestože abnormální spermie také mohou oplodnit vajíčko (Chemes & Rawe 2010), zastoupení abnormálních spermií je často spojováno s reprodukčním neúspěchem (např. Kamar & Baldredin 1959; Guzick et al. 2001; Malo et al. 2005; Schmoll & Kleven 2016). Např. ve studii na sýkoře modřince (*Cyanistes caeruleus*) bylo prokázáno, že samec s abnormálními a téměř nepohyblivými spermii nebyl otcem ani jednoho z mláďat, o která pečoval (Schmoll & Kleven 2016). Zastoupení morfologicky abnormálních spermií a jejich vliv na fertilitu bylo často zkoumáno i na lidech. Abnormální spermií se pohybovaly pomaleji nežli morfologicky normální spermie (Morales et al. 1988).

Důležitým znakem kvality ejakulátu je zajisté poměr abnormálních spermií se spermii s normální morfologií. Poměr abnormálních a normálních spermií je probíráán např. v souvislosti s populačním bottleneckem u gepardů, kde bylo nalezeno snížení celkového množství spermií a z toho bylo 71% spermií s abnormální morfologií (Wildt et al. 1983; O'Brien et al. 1985). Množství spermií s abnormální morfologií ovlivňoval reprodukční úspěch kura domácího (*Gallus domesticus*, Kamar & Baldredin 1959). U tohoto druhu bylo nalezeno 3,5-3,6 % spermií s abnormální hlavičkou (Froman & Feltmann 1998). V ejakulátu samce pštrosa pak bylo 5-26 % spermií abnormálních (Hemberger et al. 2001).

Zastoupení abnormálních spermií v ejakulátu se však může měnit a to i např. během roku (Kamar & Badredin 1959). U srnce obecného (*Capreolus capreolus*) bylo nejmenší zastoupení abnormálních spermií během říje (Blottner et al. 1996). Stejně tak u jelena lysorohého (*Cervus eldi thamin*) bylo zastoupení abnormálních spermií nejnížší během zimy a jara (Monfort et al. 1993). Naopak ve studii na krocanech byl vysoký podíl abnormálních spermií zřejmě způsoben vysokou produkcí spermií během dní s vysokou sexuální aktivitou

(Kamar & Rizik 1972). U ostralky štíhlé (*Anas acuta*) pak nebyl nalezen rozdíl mezi počtem abnormálních spermií na počátku a ve středu reprodukční sezóny (Penfold et al. 2000). Meziroční opakovatelnost v množství abnormálních spermií v ejakulátu byla prokázána u zebřičky pestré (*Taenopygia guttata*). Zároveň zde byl nalezen významný vliv inbreedingu na zastoupení abnormálních spermií v ejakulátu (Opatová et al. 2016). Informace o podílu abnormálních spermií v ejakulátu samců z divokých populací jsou však mizivé. Stejně tak málo je prostudovaný vliv podílu abnormálních spermií na reprodukční úspěch samce.

### 1.1.3. Senescence spermií

Rozdíly v reprodukci, v závislosti na stáří jedinců, můžeme najít u celé řady obratlovců (Clutton-Brock 1988). Pokles reprodukčního úspěchu samců je často spojován se senescencí spermií, která by mohla vysvětlovat část variability v reprodukčním úspěchu jednotlivých samců. Senescence je způsobena degradací vnitřních fyziologických procesů (Kirkwood & Austad 2000) a objevuje se se zvyšujícím se věkem jedince. Stárnutí tedy může mít negativní efekt na reprodukci (např. Hamilton 1966). Spermie jsou produkovány během reprodukčního období po celou dospělost. Se zvyšujícím se věkem však může docházet ke vzniku mutací, které mohou ovlivnit spermatogenezi (Pizzari et al. 2008). Mutace mohou vznikat díky snižující se schopnosti opravy DNA (Sloter et al. 2004; Paul et al. 2011). Bylo dokázáno, že se zvyšujícím se věkem dochází ke snížení počtu spermií (Pasqualotto et al. 2005, Sasson et al. 2012; Langen et al. 2017), snížení motility (Wolf et al. 2000; Pasqualotto et al. 2005; Dean et al. 2010) a samozřejmě snížení reprodukčního úspěchu samců (Dean et al. 2010). U živorodky duhové (*Poecilia reticulata*) došlo ke snížení velocity spermií u starších samců, ale jejich spermie byly zároveň delší (Gasparini et al. 2010). Delší spermie u starších samců byly nalezeny i u pestřence zlatového (*Pelvicachromis taeniatus*, Langen et al. 2017). Vliv věku na fenotyp spermií byl testován i u vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*). Byl zde nalezen negativní vliv věku na motilitu spermií, ale pouze pro dvě ze 13 testovaných proměnných byl vztah signifikantní (Moller et al. 2009).

Stárnutí je spojováno i s výskytem spermií s abnormální morfologií (Syntin & Robaire 2001; Rijsselaere et al. 2007). Zastoupení abnormálních spermií se může zvyšovat s věkem samce, jako v případě tchoře černonohého (*Mustela nigripes*, Wolf et al. 2000) či kura (*Gallus gallus*, Tabatabaei et al. 2010) anebo může nejprve v životě klesat a poté opět stoupat jako u geparda štíhlého (*Acinonyx jubatus*, Durrant et al. 2001). Naproti tomu u

pipulky kopinaté (*Chiroxiphia lanceolata*) množství abnormalit nesouviselo s věkem samce (Sardell & DuVal 2014).

Na základě těchto studií by se dalo předpokládat, že úspěšnější v reprodukci budou mladší samci. Přesto však některé studie ukazují jiné výsledky. Například u lesňáčka lejskovitého (*Setophaga ruticilla*) měli starší samci méně cizích mláďat v hnízdě (Perreault et al. 1997). Stejný výsledek byl nalezen i v některých dalších studiích (např. Bollinger & Gavin 1991; Wagner et al. 1996; Soukup & Thomsen 1997; Gil et al. 2007; Bowers et al. 2015; ale Hoset et al. 2014). Starší samci lesňáčka kanadského (*Cardellina canadensis*) byli otcí většiny mimopárových mláďat v populaci (Reitsma et al. 2018). Vztah mezi věkem samce a jeho schopností získat mimopárová mláďata byl prokázán i v dřívějších studiích (např. Kleven et al. 2006b; Lehtonen et al. 2009). Párový i mimopárový úspěch samce se zvyšoval s věkem u vrabce domácího (*Passer domesticus*, Hsu et al. 2017). Výše zmíněné výsledky ukazují, že vliv stárnutí na fenotyp spermií a jejich fertilizační kapacitu není jednoznačný. K objasnění je potřeba problematiku dále studovat.

## 1.2. Vliv délky spermií na motilitu

Motilita, tedy pohyblivost spermie, hraje zásadní roli při oplození a je důležitým faktorem určující reprodukční úspěch (např. Donoghue et al. 1999). Delší spermie mají několik výhod. Jednou z nich je delší bičík (Immler & Birkhead 2007), který umožňuje rychlejší pohyb vpřed (Cardullo & Baltz 1991). Díky delšímu krčku pak má spermie více mitochondrií (Immler & Birkhead 2007; Anderson & Dixson 2002) a může tedy produkovat více adenosintrifosfátu (ATP), který slouží jako zdroj energie (Vladić et al. 2002; Rowe et al. 2013; Tourmente et al. 2013; ale viz Rowe et al. 2013; Burness et al. 2004; Bennison et al. 2016).

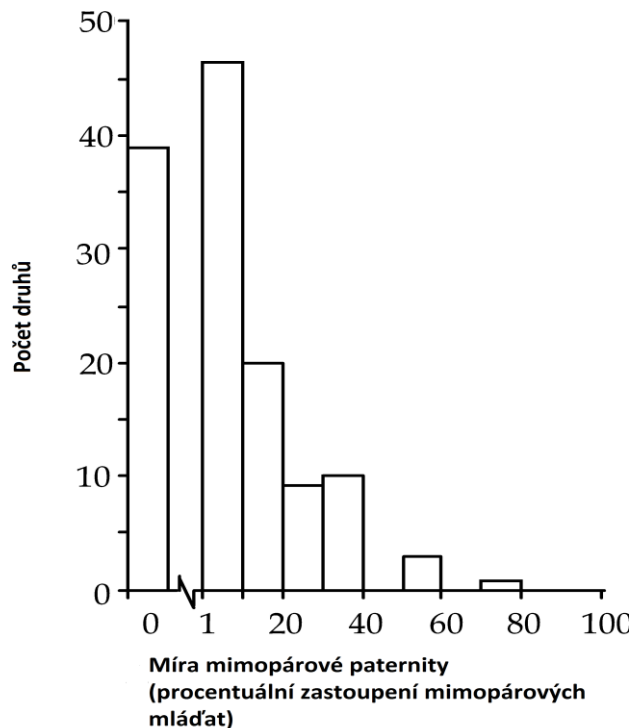
Rychlejší spermie by mohly mít výhodu v „honbě“ za oplozením vajíčka. Tento předpoklad byl potvrzen např. u některých hlodavců. U druhů s vyšší mírou kompetice bylo zjištěno, že se jednotlivé spermie spojují ve vláčky a pohybují se společně rychleji než samostatné spermie (Immler et al. 2007), při čemž ve vláčkách bývají spermie pouze jednoho samce (Fisher & Hoekstra 2010). U ptáku jsou však výsledky rozporuplné. Studie Lüpold et al. (2009a) dokazuje na mezidruhové úrovni, že delší krček či bičík zvyšují rychlost spermií. Zároveň se objevují i studie, které tento fakt nepotvrzují (Kleven et al. 2009a; Lüpold et al. 2009b).

Stejně rozdílné výsledky lze najít i ve vnitrodruhových studiích. U háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*) delší spermie plavaly rychleji a byly schopny odstranit kratší hermafroditické spermie (LaMunyon & Ward 1998). Delší krček měl pozitivní vliv na motilitu u myši domácí (*Mus domesticus*, Firman & Simmons 2010). V případě vlaštovky stromové (*Tachycineta bicolor*) byl nalezen také pozitivní vztah mezi délkou krčku a rychlostí spermií (Laskemoen et al. 2010), stejně jako v případě zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*, Knief et al. 2017). Helfenstein et al. (2010) pak potvrdili pozitivní korelaci mezi délkou flagella (součet krčku a samostatného bičíku) a rychlostí spermií u vrabce domácího (*Passer domesticus*). U sýkory koňadry (*Parus major*) delší spermie také plavaly rychleji (Losdat & Helgenstein 2018). Stejně tak ve studii na zebřičkách pestrých (*Taeniopygia guttata*) bylo prokázáno, že delší spermie spíše dosáhne vajíčka a samci s delšími spermiemi oplodní více vajíček. To může být způsobeno lepší pohyblivostí spermií a/nebo také schopností dorazit do skladovacích tubulů a lépe se v nich udržet (Bennison et al. 2015). Naopak studie na lejskovi černohlavém (*Ficedula hypoleuca*) poukázala na to, že delší spermie neplavou rychleji než krátké (Lifjeld et al. 2012). Překvapivé výsledky se objevily ve studii Cramer et al. (2015), kde autoři sledovali vztah mezi velikostí spermií a pohyblivostí u vrabce domácího (*Passer domesticus*) a pokřovního (*Passer hispaniolensis*). Rychlost spermií nekorelovala s délkou krčku a byl zde dokonce negativní vztah mezi délkou flagella a celé spermie s její rychlostí (Cramer et al. 2015). Výsledky zde prezentovaných studií opět vykazují značnou rozporuplnost, a proto je třeba dále studovat vliv velikosti spermií na jejich motilitu.

### 1.3. Mimopárové kopulace

Ptáci, kteří byli dříve považováni za převážně monogamní skupinu (Lack 1968), se zdáli nevhodní pro studium kompetice spermií. Avšak pouze asi 25% sociálně monogamních druhů je i geneticky monogamní (obr. 4, Griffith et al. 2002). Mimopárové kopulace byly pozorovány u celé řady druhů (Birkhead & Møller 1992). Jako první byly u ptáků pozorované mimopárové kopulace u kachny divoké (*Anas platyrhynchos*, Huxley 1912). U celé řady druhů je míra mimopárové paternity nízká (např. u buňáka ledního, *Fulmarus glacialis*, Hunter et al. 1992), ale u pěvců může být až 70 % mláďat zplozeno z mimopárových kopulací (Birkhead & Møller 1992; Westneat & Webster 1994; Griffith et al. 2002).

Obr. 4. Výskyt mimopárových paternit u ptáků. Převzato a upraveno podle Griffith et al. 2002.



Mimopárové kopulace mohou být nucené či dobrovolné (Birkhead & Møller 1992). Nucená kopulace byla pozorována téměř u 100 druhů (McKinney et al. 1984). Frekvenci mimopárových kopulací může ovlivňovat celá řada faktorů, např. populační hustota (Birkhead et al. 1987; Richardson & Burke 2001; Pitcher et al. 2005) a synchronizace hnízdění (Stutchbury et al. 1997; Conrad et al. 1998), kvalita teritorií (Rubenstein 2007) či dostupnost potravy (Vaclav et al. 2003). Mimopárové kopulace mohou vést, za předpokladu úspěšné fertilizace, k mimopárovým paternitám (extra-pair paternity – EPP), které mohou, ale nemusí přispívat k varianci v reprodukční úspěšnosti samců (Webster et al. 1995; Albrecht et al. 2007). Reprodukční úspěch se skládá ze dvou hlavních komponent: (1) vnitropárového úspěchu, tedy počtu potomků, které je samec schopen zplodit se svou sociální partnerkou (a uchránit svou paternitu v hníždě) a (2) mimopárového úspěchu, tedy počtu potomků, které je samec schopný zplodit mimo sociální pár (Webster et al. 1995). Aby samec zvýšil svůj reprodukční úspěch na úkor ostatních samců v populaci, musí uspět v obou komponentách.

Díky mimopárovým kopulacím dochází, i u zdánlivě monogamních druhů, k postkopulační sexuální selekci, v podobě kompetice spermií a skryté samičí volby (Parker 1970; Birkhead 1998). Výskyt mimopárových mláďat u pěvců dokládá existenci kompetice



spermíí u tohoto taxonu. I vzhledem k variabilitě v míře promiskuity a dostupnosti populací se tato skupina jeví vhodným modelovým objektem pro studium vlivu sexuální promiskuity na fenotyp spermíí.

#### **1.4. Prekopulační znaky ovlivňující reprodukční úspěch samců**

Jak již bylo výše zmíněno, reprodukční úspěch samce se skládá ze 2 komponent – vnitropárového a mimopárového úspěchu. Vnitropárový úspěch lze charakterizovat jako schopnost samce ochránit paternitu ve vlastním hnízdě tedy jako počet mláďat, která samec zplodí se svou partnerkou. Mimopárový úspěch samce tvoří mláďata, která zplodil mimo sociální pár (Webster et al. 1995). Reprodukční úspěch samce může být ovlivněn prekopulačními znaky, které ovlivňují párování, ale také postkopulačními znaky, které ovlivňují výsledek fertilizace.

Jelikož jsou samci vystaveni silnému pohlavnímu výběru ze strany samic, dochází u nich k rozvoji nápadných znaků (ornamentů). Mezi samci lze nalézt variabilitu v těchto znacích a samice si na základě exprese ornamentu vybírá samce, se kterými se bude pářit (Sheldon et al. 1997). Ornamenty by tedy měly ovlivňovat reprodukční úspěch samců. Zatímco některé studie tento předpoklad potvrzují, v jiných studiích vztah mezi reprodukčním úspěchem samců a ornamentací nebyl potvrzen. Např. u hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) bylo potvrzeno, že ornamentace je důležitým znakem ovlivňujícím reprodukční úspěch samců (Albrecht et al. 2009). V případě lesňáčka žlutého (*Setophaga petechia*) byl sledován vliv dvou ornamentů na reprodukční úspěch samců. Nebyl nalezen vliv pigmentace na celkový reprodukční úspěch samců. Samci, kteří měli kvalitnější melaninové zbarvení ale ne karotenoidové, byli úspěšnější v mimopárových kopulacích, ale dokázali méně ochránit paternitu ve vlastním hnízdě. Samci, kteří měli oba znaky na vysoké úrovni, měli méně cizích mláďat ve vlastním hnízdě, ale získali méně mimopárových mláďat (Grunst & Grunst 2014). Naopak u hýla mexického (*Carpodacus mexicanus*) nebyl nalezen vliv ornamentace na úspěšnost samce v mimopárových paternitách (Westneat & Stewart 2003). Ornamentace samců však není omezena pouze na jejich zbarvení. U některých populací vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) byla nalezena korelace mezi délkou ocasních per a úspěchem samce v mimopárových kopulacích (Møller & Tegelström 1997; Saino et al. 1997; Møller et al. 2003; Safran et al. 2016). Navíc se prokázalo, že vliv ornamentace se může lišit mezi populacemi jednoho druhu. Příkladem je např. lesňáček bělokrký (*Ficedula*

*albicollis*). V případě švédské populace tohoto druhu byl potvrzen vliv čelní bílé skvrny při výběru mimopárového partnera (Shledon & Ellegrent 1999), ale v maďarské (Rosivall et al. 2009) či české (Edme et al. 2016) populaci se tento efekt neprokázal. To může vést k rozdílným výsledkům při studiu ornamentace na reprodukční úspěch v jednotlivých populacích.

Zároveň bylo prokázáno, že existuje spojitost mezi ornamentací a kvalitou ejakulátu samce. Pozitivní vztah mezi prekopulačními a postkopulačními znaky byl vysvětlen pomocí dvou hypotéz, které zároveň vysvětlují, proč samice vyhledávají více samců ke kopulaci. Hypotéza pohlavně selektovaných spermií (the sexually selected sperm hypothesis) předpokládá, že samice se páří s více samci, aby její potomci zdělili úspěšnost v reprodukci po svém otci (teorie sexy spermií) či schopnost plodit životaschopnější potomky (teorie dobrých spermií). Alternativní hypotéza „phenotype-linked fertility hypothesis“ pracuje s předpokladem, že se samice snaží předcházet případné neplodnosti sociálního partnera tím, že se páruje se samci s vysokou expresí druhotných ornamentů (Birkhead & Pizzari 2002; Andersson & Simmons 2006).

Většina studií se nezabývá vlivem prekopulačních a postkopulačních znaků na reprodukční úspěch samců zároveň, přestože je třeba sledovat vliv těchto znaků současně. Výjimkou tvoří studie na lejskovi bělokřkém (*Ficedula albicollis*), která testovala vliv velikosti spermií a velikosti bílé skvrny na čele na reprodukční úspěch. Reprodukční úspěch samců nebyl ovlivněn ani jedním z těchto znaků (Edme et al. 2017).

## 1.5. Postkopulační selekce

Pohlavní selekce (pohlavní výběr) je základní složkou evoluce, která zvyšuje frekvenci genů, přinášejících svému nositeli reprodukční výhodu. Jako první popsal sexuální selekci již Charles Darwin a rozdělil ji na dvě části, intrasexuální a intersexuální (Darwin 1871). Bateman (1948) stanovil sílu sexuální selekce jako vztah mezi počtem partnerů, se kterými jedinec kopuloval, a počtem jeho mláďat. Kopulace s více jedinci zvýšila výrazně počet mláďat u samců, a proto se domníval, že sexuální selekce působí více na samce (Bateman 1948). Pohlavní výběr zvýhodňuje znaky, které jedinci zvyšují úspěšnost při intrasexuální i intersexuální selekci. Sekundární (epigamní) pohlavní znaky zvyšují atraktivitu jedince (častěji samce) či mohou být nápomocny při soubojích. Tyto znaky bývají energeticky nákladné a odrážejí kvalitu jedince (Andersson 1994). Samice si pak na základě těchto znaků

vybírají samce, se kterými kopulují. Tyto znaky tedy mohou ovlivňovat reprodukční úspěch samců.

Do 70. let minulého století se předpokládalo, že je selekce čistě prekopulační záležitost (Andersson 1994). U sexuálně promiskuitních druhů se ovšem mezi inseminací a oplozením vajíčka může uplatňovat postkopulační pohlavní výběr, který má opět dvě části – kompetici spermií a skrytou volbu samice (Parker 1970; Thornhill 1983). Reprodukční úspěch samců se často odvíjí od množství samic, se kterými daný samec kopuloval, pokud ale samice kopuluje se dvěma či více samci, utváří se prostor pro uplatnění kompetice spermií a díky skryté volbě i samice sama může zřejmě zasahovat do výběru spermií, které oplodní její vajíčko/a. Postkopulační pohlavní výběr se velmi zásadně uplatňuje v evoluci morfologie a funkčnosti spermií. Zásadně ovlivňuje fenotypové znaky spermií (např. Hunter & Birkhead 2002; LaMunyon & Ward 2002; Baer et al. 2003; Immler & Birkhead 2007; Rowe & Pruett-Jones 2011).

### **1.5.1. Kompetice spermií**

Přestože se zdá, že stačí pouze jedna kopulace k oplození (např. Birkhead et al. 1988; Birkhead et al. 1989), samice kopulují několikrát během jednoho fertlního období (Birkhead et al. 1987; Birkhead et al. 1991). Díky vícečetným kopulacím samice dochází k uplatnění kompetice spermií a ejakulátů jednotlivých samců, kteří se se samicí pářili (Parker 1970). Jeden z prvních modelů předpokládá, že kompetice vede ke zvětšení počtu spermií, ale zároveň ke zmenšení jejich velikosti. Samci se tedy mohou pokusit zvýšit svoje šance zvýšením produkce spermií (Parker 1982). V celá řadě studií se prokázalo, že relativní velikost testes pozitivně koreluje s mírou promiskuity u samic (Birkhead & Møller 1998). Tento vztah byl potvrzen u řady živočichů – např. u much r. *Drosophila* (Pitnick 1996), motýlů (Gage 1994), ryb (Balshine et al. 2001), žab (Jennions & Passmore 1993), ptáků (Møller & Briskie 1995) či savců (Kenagy & Trombulak 1986, Baker et al. 2018). Čím větší testes samec má, tím více spermií je schopen vyprodukovat (Møller 1989; 1991) a zároveň skladovat a předat samici větší množství spermií (Pitcher et al. 2005). V komparačních studiích na kroužkvcích (Velando et al. 2008), hmyzu (Gage 1991; Aron et al. 2016), rybách (Boschetto et al. 2011), ptácích (Pizzari et al. 2003; Rowe & Pruett-Jones 2011) i savcích (delBarco-Trillo & Ferkin 2004) se prokázalo zvýšené množství spermií v ejakulátu samců u druhů s vyšší mírou kompetice spermií (ale Locher & Bauer, 2000; Byrne, 2004;

Ramm & Stockley, 2007). Tento výsledek byl potvrzen i vnitrodruhově např. ve studii na běláskovi řepovém (*Pieris rapae*), kde bylo prokázáno, že samci předali větší množství spermií samicím, které se již dříve pářily, jelikož je zde vyšší pravděpodobnost kompetice spermií (Wedell & Cook 1999).

Kromě počtu spermií je rozhodujícím faktorem v reprodukčním úspěchu samce také velikost jeho spermií. Čím vyšší je riziko kompetice spermií, tím delší spermie samci produkují (např. Gomendio & Roldan 1991; Gage 1994; Johnson & Briskie 1999; Tourmente et al. 2001). Vliv postkopulační selekce na délku spermie byl testován u celé řady organizmů. Pozitivní korelace mezi kompeticí a délkou spermií byla potvrzena v některých hmyzích skupinách – např. u motýlů (Gage 1994; Morrow & Gage 2000). Dále se tento vztah objevil u cichlid (*Cichlidae*, Balshine et al. 2001) či u žab z čeledi *Myobatrachidae* napříč 100 druhy. Druhy s vyšším rizikem kompetice spermií měly delší hlavičku a ocáskok spermie (Byrne et al. 2003). U bahňáků, respektive u slukovitých (*Scolopacidae*), kulikovitých (*Charadriidae*) a ostnákovitých (*Jacaniidae*) délka spermie i jejich částí byla menší u druhů, které se vyznačují monogamií (Johnson & Briskie 1999). Pozitivní vztah mezi mírou kompetice a délkou spermií byl nalezen i mezi savci (např. Gomendio & Roldan 1991; Tourmente et al. 2011; Fisher et al. 2016, ale Gage & Freckleton 2003). Zároveň se však opět ukazuje, že celá situace bude složitější. U netopýrů se předpoklad zvětšující se délky spermií při zvýšené kompetici neprokázal a postkopulační selekce zde nemá vliv na délku spermií (Hosken 1997). Samci s delšími spermii či jejich komponentami by měli být úspěšnější, jelikož delší spermie většinou plavou rychleji (např. LaMunyon & Ward 1998; Mossman et al. 2009; Helfenstein et al. 2010; Laskemoen et al. 2010, ale viz Sætre et al. 2018, Cramer et al. 2013; Edme et al. 2017). V manipulativní studii na zebříčkách pestrých (*Taeniopygia guttata*) bylo prokázáno, že delší spermie jsou úspěšnější v oplození vajíček (Bennison et al. 2015). Nicméně situace je komplikovanější, neboť u dalších druhů žádný vztah mezi délkou spermií a jejich rychlostí nebyl nalezen (např. Sætre et al. 2018, Cramer et al. 2013; Edme et al. 2017). K prokázání vlivu motility na reprodukční úspěch samce je tedy třeba problematiku dále studovat.

Na mezidruhové úrovni by kompetice spermií mohla ve výsledku vést ke zvýšené kvalitě ejakulátu (Parker 1970; Birkhead & Møller 1998). V případě porovnání živočichů s a bez rizika kompetice spermií výsledky ukazují, že intenzivní kompetice spermií vede k produkci více spermií (Parker 1984; Møller 1989), ale i životaschopnějších spermií (Hunter & Birkhead 2002), uniformních spermií (Calhim et al. 2007; Immler et al. 2008; Kleven et al. 2008; Fitzpatrick & Baer 2016), delších spermií (Gomendio & Roldan 1991;

Gage 1994; Morrow & Gage 2000; LaMunyon & Ward 2002; Baer et al. 2003; Immler & Birkhead 2007; Lüpold et al. 2009a) a rychlejších spermií (Fitzpatrick et al. 2009; Lüpold et al. 2009a). Tyto vlastnosti ovlivňují reprodukční úspěch samce, ale není jisté do jaké míry. Kompetice spermií je velmi složitý proces. Některé nekonzistentní výsledky mohou být i důsledkem vlivu samičího prostředí na výsledek fertilizace. Výsledná paternita pak může být nezávislá na počtu či kvalitě spermií, které od samce získá.

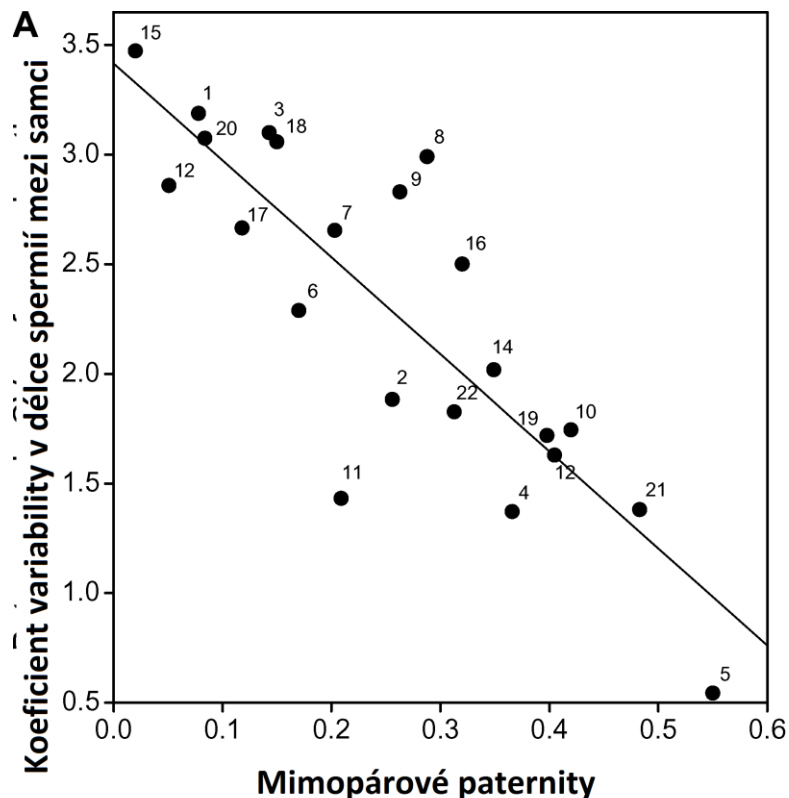
### **1.5.1.1. Vnitrodruhová variabilita v délce spermií**

Zatímco mezidruhové variabilitě se věnovala dostatečná pozornost, variabilita v rámci druhu byla oproti tomu dlouho opomíjena. Předpokládá se, že délku spermie neovlivňuje pouze kompetiční risk, ale může se zde projevat také vliv samičího traktu, respektive délky skladovacích tubulů (např. Pitnick & Markow 1994; Briskie et al 1997). V rámci druhů probíhá silná selekce na optimální velikost spermií, která maximalizuje samčí úspěch při fertilizaci. Proto by se měla se zvyšující se kompeticí spermií snižovat variabilita mezi jedinci jednoho druhu (stabilizující selekce na délku spermie, Morrow & Gage 2001; Calhim et al. 2007; Immler et al. 2008; Kleven et al. 2008; Lifjeld et al. 2010; Fitzpatrick & Baer 2011; Šandera et al. 2013; Varea-Sánchez et al. 2014). U promiskuitnějších druhů, u kterých dochází ke kompetici spermií, by měl být proces spermatogeneze optimalizován, což by mělo vést k produkci kvalitnějších spermií v ejakulátu a také k snížení variability v rámci ejakulátu. V reprodukci by pak měli být nejúspěšnější samci s průměrnou délkou spermií, zatímco spermie kratší či delší by měly být znevýhodněny (např. Calhim et al. 2007).

Snížení vnitrodruhové variability v délce spermií bylo potvrzeno pouze pomocí komparačních studií, které ukazují nižší variabilitu spermií mezi jedinci u druhů, které se vyznačují vyšší mírou kompetice spermií. Variabilita ve velikosti spermií ve vztahu k míře promiskuity (kompetice spermií) byla testována například u včel a mravenců. Výsledky potvrdily, že druhy s vyšším rizikem kompetice mají menší variabilitu spermií (Fitzpatrick & Baer 2011). Morrow & Gage (2001) také naznačují existenci stabilizující selekce na variabilitu spermií u 10 druhů živočichů (Morrow & Gage 2001). Stejně tak se potvrdila snižující se variabilita ve velikosti háčku, pomocí kterého se spermie spojují do již zmiňovaných vláček, u zástupců podčeledi *Murinae* (Šandera et al. 2013; Varea-Sánchez et al. 2016). Stabilizující selekce může působit i u pěvců. Zde byla také nalezena snižující se variabilita ve velikosti spermií se zvyšující se mírou kompetice spermií (11 druhů, Immler et

al. 2008; 22 druhů, obr. 5, Kleven et al. 2008). Mezipopulační studie na vlaštovce obecné (*Hirundo rustica*) našla negativní vztah mezi variabilitou v délce spermií a poměrem hnízd s mimopárovými mládřaty. Stejně tak variabilita v délce spermií negativně korelovala s poměrem mimopárových mládřat, výsledek však nebyl signifikantní (Laskemoen et al. 2013a).

Obr. 5. Vztah mezi mimopárovými paternitami a variabilitou v délce spermií u vybraných druhů pěvců. Převzato a upraveno podle Kleven et al. 2008. (1) *Acrocephalus schoenobaenus* (Rákosník proužkovaný), (2) *Agelaius phoeniceus* (Vlhovec červenokřídlý), (3) *Carduelis tristis* (Čížek žlutý), (4) *Dendroica petechia* (Lesňáček žlutý), (5) *Emberiza schoeniclus* (Strnad rákosní), (6) *Fringilla coelebs* (Pěnkava obecná), (7) *Geothlypis trichas* (Lesňáček žlutohrdlý), (8) *Hirundo rustica* (Vlaštovka obecná), (9) *Luscinia svecica* (Slavík modráček), (10) *Malurus splendens* (Modropláštník modrofialový), (11) *Melospiza georgiana* (Strnadec mokřadni), (12) *Melospiza melodia* (Strnadec zpěvný), (13) *Passerculus sandwichensis* (Strnadec skvrnitý), (14) *Passerina cyanea* (Papežik indigový), (15) *Phoenicurus phoenicurus* (Rehek zahradní), (16) *Phylloscopus trochilus* (Budníček větší), (17) *Poecile atricapilla* (Sýkora černohlavá), (18) *Riparia riparia* (Břehule říční), (19) *Setophaga ruticilla* (Lesňáček lejskovitý), (20) *Sialia sialis* (Salašník modrý), (21) *Tachycineta bicolor* (Vlaštovka stromová), (22) *Vermivora chrysoptera* (Lesňáček zlatokřídlý).



Přestože z předcházejících studií vyplývá předpoklad stabilizující selekce na délku spermií, doposud neexistuje žádná vnitropopulační studie, která by stabilizující selekci potvrdovala. Jak již bylo zmíněno, při existenci stabilizující selekce na velikost spermií, by měli být v reprodukci nejúspěšnější samci se středně dlouhými spermii. U vlaštovky stromové (*Tachycineta bicolor*) však nebyl nalezen vztah mezi délkou spermií a reprodukčním úspěchem samců (Laskemoen et al. 2010). Reprodukční úspěch samců nebyl ovlivněn délkou spermií ani v studii na střízlikovi zahradním (*Troglodytes aedon*, Cramer et al. 2013). Stejný výsledek byl nalezen i v případě lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*, Edme et al. 2017) nebo slavíka modráčka (*Luscinia svecica*, Sætre et al. 2018). Stabilizující selekci pak odporují studie na zebříčkách pestrých (*Taenopygia guttata*), u kterých se prokázalo, že delší spermie jsou úspěšnější v oplození vajíček (Bennison et al. 2015; Knief et al. 2017). Zebříčka pestrá však není klasickým příkladem. Bylo prokázáno, že u zebříček dochází k pericentrické inverzi (otočení fragmentu chromozomu obsahující centromeru o 180 stupňů) na chromozomu Z, která ovlivňuje délku spermií. Nejdelší spermie mají heterozygoti, u kterých byla prokázána i nejvyšší motilita. Systém je udržován díky overdominanci (Knief et al. 2017). U ostatních druhů pěvců, kde se tato inverze nevyskytuje, je situace složitější. Pro vlaštovku obecnou doposud nejsou k dispozici informace o vlivu velikosti spermií na reprodukční úspěch samců.

## 1.5.2. Skrytá volba samice

Dříve se předpokládalo, že samice hrají během fertilizace pasivní roli a fungují pouze jako příjemce spermií. Zřejmě je však tento předpoklad chybný a samice mají důležitou roli ve výsledné paternitě (např. Møller & Briskie 1995; Bishop 1996; Price 1997; Wilson et al. 1997; Clark et al. 1999; Thuman & Griffith 2005; Gasparini & Pilastro 2011; Alcaide et al. 2012). Předpokládá se, že se kompetice spermií nikdy neodehrává bez vlivu samice, a proto se skrytá volba samice stává často středem sporu v evoluční a reprodukční biologii. Její existence se těžko dokazuje, jelikož se volba odehrává uvnitř samičího traktu. Z toho důvodu ji také Thornhill (1983) a jeho následovatelé označují za skrytou volbu samice (cryptic female choice). Eberhard (1996) definuje skrytou volbu samice jako schopnost zvýhodnit určitého samce při získávání paternity. Skrytá volba umožňuje samici vybrat spermie, které se uloží ve skladovacích orgánech a přežijí nebo naopak budou ztraceny z reprodukčního traktu (Eberhard 1996), umožňuje tedy snížení vlivu prekopulačního výběru. Skrytá volba

samice byla popsána v různých skupinách (Sakaluk 1997; Reyer et al. 1999; Ward 2000; Alcaide et al. 2012), u více než 100 druhů živočichů (Eberhard 1996). Vztahuje se na behaviorální, fyziologické i morfologické procesy, které po kopulaci zvýhodňují některé samce (Eberhard & Cordero 1995). I díky těmto procesům se pouze malé procento spermií transportuje k vajíčku (např. Turner & Montgomerie 2002; Yeates et al. 2013). Výsledkem skryté volby samice je zabránění většímu počtu spermií v průniku do vajíčka (Levitan et al. 2007), eliminace spermií nekompatibilních samců (Gasparini & Pilastro 2011) a snaha zajistit, že vajíčko bude oplozeno nejlepší spermií. Skrytou volbu samice pak lze rozdělit na sekvenční a simultánní. Sekvenční skrytá volba spočívá v ejakci většiny spermií od předchozího samce před kopulací s následujícím samcem. Při simultánní samičí volbě si samice uchovává spermie z kopulací s více samci a dochází k výběru v pohlavním traktu (Simmons & Siva-Jothy 1998). Dále se skrytá samičí volba dělí na přímou a nepřímou. Přímá volba samice zvýhodňuje spermie samce na základě jeho fenotypu (Birkhead & Pizzari 2002). Tento typ volby byl nalezen například u kura domácího (*Gallus gallus domesticus*). Samice tohoto druhu nedokážou zabránit kopulaci se subdominantními samci, ale po kopulaci jejich ejakulát vypuzují z těla a přednostně uchovávají spermie dominantních partnerů (Pizzari & Birkhead 2000). V nepřímé skryté volbě však fenotyp samce nehraje žádnou roli, naopak se uplatňuje např. kompatibilita genomů (Birkhead & Pizzari 2002).

Skrytá volba samice se může uplatňovat několika způsoby. Samice mohou například ovlivňovat proces páření. Pokud přeruší kopulaci před přenosem spermií, kopulující samec nemá šanci na oplození jejich vajíček (Thornhill 1983). Jedním z jevů potvrzující výběr samice je také již zmiňované vypuzení spermií. U racka tříprstého (*Rissa tridactyla*) samice vypuzovaly sperma z dřívějších kopulací, aby k oplození použily sperma čerstvé (Wagner et al. 2004). Tyto výsledky potvrzují teorii Siva-Jothy (2000), která tvrdí, že samice získávají výhodu v podobě čerstvého ejakulátu, jelikož věk spermií negativně ovlivňuje viabilitu zygot (Jones et al. 2000). Skrytá volba samice se může projevovat i jako selekce na určité fenotypové znaky spermií (Thornhill 1983). Např. u kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) bylo zdokumentováno, že samice je schopna upřednostnit spermie jednoho ze samců, aniž by znala fenotyp samce (Birkhead et al. 2004). Existuje několik vysvětlení pro to, jak se samice rozhoduje při výběru spermií. Jeden z faktorů ovlivňující výsledek skryté volby samice je zřejmě příbuznost mezi samcem a samicí (např. Wilson et al. 1997; Thuman & Griffith 2005; Gasparini & Pilastro 2011) či variabilita v genech pro hlavní histokompatibilní komplex (např. Richardson et al. 2005; Alcaide et al. 2012, ale Promerová et al. 2011).



### 1.5.2.1. Skladování spermií

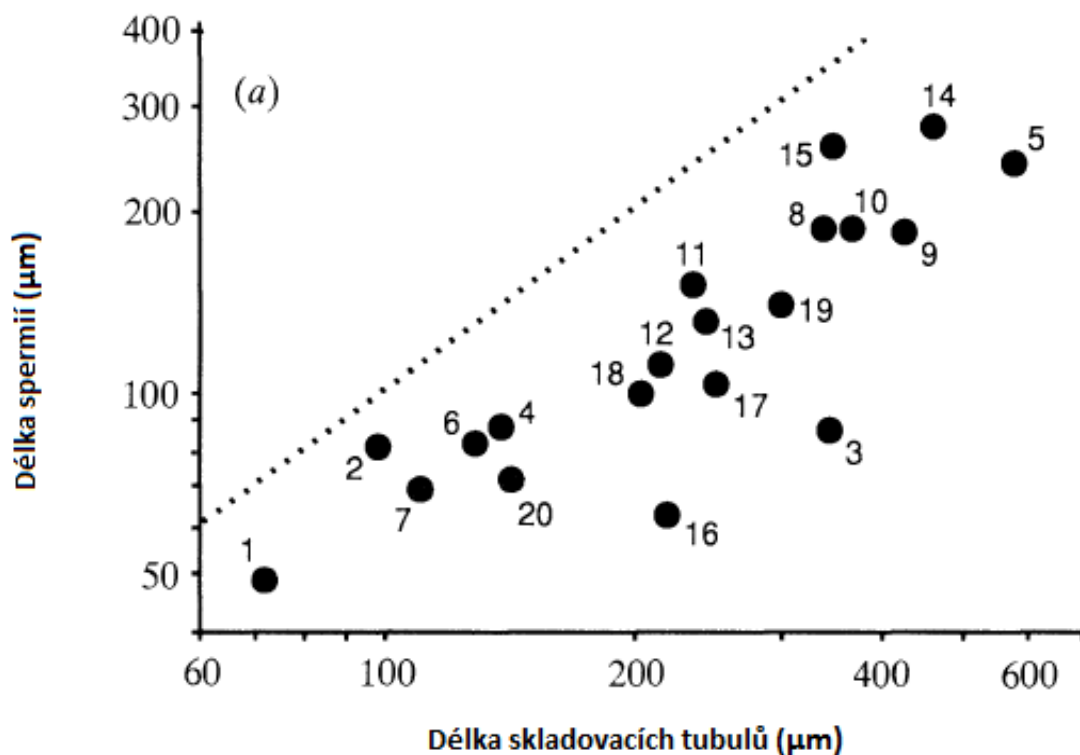
Jeden z hlavních faktorů, který odlišuje reprodukci ptáků od reprodukce většiny savců, je skladování spermií ve skladovacích tubulech. Zatímco savčí spermie přežije v samičím traktu většinou maximálně 48 hod, ptačí spermie uložena ve skladovacích orgánech může přežít až 117 dní (domestikovaný krocan divoký, *Meleagris gallopavo*, Birkhead & Moller 1993). Výjimku mezi savci tvoří např. skupina letounů, kteří mohou skladovat spermie až 198 dní (Birkhead & Moller 1993). Uchovávání spermií však bylo prokázáno i u paryb (např. hladkoun antarktický, *Mustelus antarcticus*, Storrie et al. 2008), ryb (např. plata skvrnitá, *Xiphophorus maculatus*, Potter et al. 2000), obojživelníků (čolek obecný, *Triturus vulgaris*, Sever et al. 1999) a plazů (např. *Tantilla coronata*, Aldridge 1992). Je zřejmé, že spermie mimo tubuly v reprodukčním traktu samice nemají dlouhou životnost. Skladování spermií je adaptace na oplodňování jednotlivých vajíček v delším časovém rozmezí (Gomendio & Roldan 1993). Díky skladování spermií je zde vytvořen i větší prostor pro kompetici spermií (Parker 1970). Čím déle jsou spermie skladovány, tím větší šanci má samice na výběr spermií, které ve výsledku oplodní její vejce.

Ptačí skladovací orgány jsou uloženy v uterovaginálním spoji. Do skladovacích tubulů se dostane pouze malé množství spermií, které jsou morfologicky v pořádku (Bohr et al. 1964a,b). Bylo prokázáno, že existuje značná variabilita v počtu skladovacích tubulů mezi jednotlivými druhy ptáků (Birkhead & Møller 1992). Zdá se, že počet skladovacích tubulů roste s velikostí těla. Např. u andulky se uvádí počet 500 tubulů (Birkhead 1988), zatímco u krocana až 20 000 tubulů (Goodrich-Smith & Marquez 1978). Tubuly však nemusí být aktivní všechny v jeden okamžik (Bakst 1989; Birkhead et al. 1990). Experimentální studie ukázaly, že spermie z jednotlivých kopulací zůstávají v tubulech odděleny (King et al. 2002; Hemmings & Birkhead 2017).

Délka spermií může být ovlivněna kompeticí spermií, ale zároveň je ovlivněna délkou skladovacích tubulů. Studie zabývají se vztahem mezi délkou tubulů a délkou spermií potvrzují koevoluci spermií a skladovacích tubulů. Délka tubulů pozitivně korelovala s délkou spermií u 20 pěvčích druhů. Tubuly měly přibližně dvojnásobnou délku spermie. Vejdou se do nich tedy přibližně dvě řady spermií. Zároveň můžeme najít vztah mezi délkou tubulů a párovacího systému. Jak se dalo z předchozích výsledků usuzovat, delší tubuly byly nalezeny u druhů, kde se uplatňuje kompetice spermií (Briskie & Montgomerie 1993). Pozitivní vztah mezi délkou spermií a délkou skladovacích tubulů u pěvců (obr. 6) byl

nalezen i v další studii (Briskie & Montgomerie 1992). Zároveň zde byla negativní korelace mezi délkou spermií a počtem skladovacích tubulů. Autoři dále uvádí, že vztah mezi délkou spermií a párovacím systémem může být narušen právě skladováním spermií v tubulech (Briskie & Montgomerie 1992). Korelace mezi délkou spermií a skladovacími orgány byla potvrzena mimo jiné i u hmyzu (např. Dybas & Dybas 1981; Pitnick & Markow 1994; Presgraves et al. 1999).

Obr. 6. Vztah mezi délkou skladovacích tubulů a spermií u vybraných druhů pěvců. Převzato a upraveno podle Briskie & Montgomerie 1992. (1) *Empidonax minimus* (*Tyranovec malinký*), (2) *Vireo olivaceus* (*Zelenáček červenooký*), (3) *Turdus migratorius* (*Drozd stěhovavý*), (4) *Hirundo rustica* (*Vlaštovka obecná*), (5) *Tachycineta bicolor* (*Vlaštovka stromová*), (6) *Eremophila alpestris* (*Skřivan ouškatý*), (7) *Anthus rubescens* (*Linduška proměnlivá*), (8) *Carduelis tristis* (*Čížek žlutý*), (9) *Carduelis flammea* (*Čečetka zimní*), (10) *Carduelis hornemanni* (*Čečetka bělavá*), (11) *Calcarius pictus* (*Strnad pestrý*), (12) *Calcarius lapponicus* (*Strnad severní*), (13) *Plectrophenax nivalis* (*Sněhule severní*), (14) *Dendroica petechia* (*Lesňáček žlutý*), (15) *Setophaga ruticilla* (*Lesňáček lejskovitý*), (16) *Molothrus ater* (*Vlhovec hnědohlavý*), (17) *Xanthocephalus xanthocephalus* (*Vlhovec žlutohlavý*), (18) *Euphagus cyanocephalus* (*Vlhovec pospolitý*), (19) *Agelaius phoeniceus* (*Vlhovec červenokřídlý*), (20) *Sturnella neglecta* (*Vlhovec západní*).



Výsledky studií z předchozích kapitol tedy naznačují pozitivní vztah mezi kompeticí spermií a délkou spermií. Čím vyšší riziko kompetice, tím mají samci delší spermií. Jejich maximální délka je však omezená délkou skladovacích tubulů, do kterých se spermie musí vejít. Briskie et al. (1997) uvádějí, že ke zvětšení délky spermií při zvýšené kompetici spermií došlo nepřímo. Vyšší riziko kompetice vedlo k prodloužení skladovacích tubulů a na to zřejmě samci odpověděli prodloužením svých spermií (Briskie et al. 1997).

### **1.5.2.2. Vliv samičího prostředí na motilitu spermií**

Některé studie potvrzují, že samičí trakt může ovlivnit funkčnost spermií (např. Tesarik et al. 1990; Fetterolf et al. 1994; Yániz et al. 2000). Proteiny produkované epiteliálními buňkami v oviduktu se zřejmě podílejí na kapacitaci spermií (McNutt et al. 1992) a mohou ovlivňovat motilitu (Abe et al. 1995) či životnost spermií (Abe et al. 1995; Elliott et al. 2009; Lloyd et al. 2009). Ovariální tekutina, která je produkovaná samicí společně s vajíčkem zlepšuje pohyblivost spermií a zvyšuje jejich rychlost (Alonzo et al. 2016). Ve studii zabývající se příbuzností mezi samcem a samicí se prokázalo, že spermie nepříbuzných samců dosahovali větší rychlosti v ovariální tekutině než samci příbuzní se samicí (Gasparini & Pilastro 2011). Další možností, jak samice může ovlivnit výsledek kompetice spermií, je skrze spermicidní látky v reprodukčním traktu (Birkhead et al. 1993)

Samice tedy zřejmě mohou, jak již bylo řečeno, imunologicky a biochemicky vybírat mezi spermii jednotlivých samců. Některé studie se pak zaměřují na vliv tekutin ze samičího reprodukčního traktu na motilitu spermií a porovnáním motility spermií v tekutinách reprodukčního traktu jednotlivých samic či jejich srovnáním s motilitou v neutrálním prostředí. Pohyblivost spermií lososa a pstruha byla dvojnásobně lepší v samičích tekutinách než v neutrálním prostředí (Yeates et al. 2013). Rychlost spermií lososa čavyča (*Oncorhynchus tshawytscha*) se také lišila v závislosti na tekutině ze samičího reprodukčního traktu, ve kterém byla měřena (Rosengrave et al. 2008). Ve studii na vlaštovkách obecných (*Hirundo rustica*) byla porovnávána velocita spermií v tekutinách reprodukčního traktu samic a v neutrálním prostředí. Jeden ze čtyř faktorů velocity byl signifikantně ovlivněn prostředím a spermie většiny samců plavaly lépe v neutrálním mediu (Møller et al. 2008). V další studii na vlaštovkách obecných bylo zjištěno, že starší samci mají lepší pohybové vlastnosti v samičí tekutině, zatímco mladým samcům se dařilo spíše v neutrálním mediu (Møller et al. 2009).

Studium motility v tekutinách reprodukčního traktu konspecifických a heterospecifických samic je zajímavé především díky možné spojitosti mezi skrytou volbou samice a speciací druhů. Během speciace druhů se mezi druhy postupně vytváří reprodukční izolační bariera. Vytvoření úplné reprodukční bariery předchází snížení fertility u vzniklých hybridů. Samice tedy mohou selektovat spermie v reprodukčním traktu ve prospěch konspecifických samců a zabránit tak produkci hybridů. Předpokládá se, že spermie samce by se měli lépe pohybovat v tekutině reprodukčního traktu konspecifické samice. Tento předpoklad byl potvrzen v hybridní zóně lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) a černohlavého (*F. hypoleuca*, Cramer et al. 2016a). Naopak ve studii Cramer et al. (2014) se testoval vliv samičích tekutin na rychlost a motilitu spermií mezi dvěma druhy vrabců – domácího (*Passer domesticus*) a pokřovního (*Passer hispaniolensis*). Výsledky ukázaly, že vlastnosti spermií se nelišily v závislosti na původu tekutiny, do kterého byly vpraveny, přesto, že zde bylo prokázáno, že tekutiny získané z reprodukčního traktu samice obsahovaly proteiny (Cramer et al. 2014) důležité pro interakci mezi spermií a samicí (Steele & Wishart 1992). Experimenty byly zopakovány i pro další blízké příbuzné druhy či poddruhy (vlaštovka obecná, *Hirundo rustica* vs. břehule říční, *Riparia riparia*; 2 poddruhy slavíka modráčka, *Luscinia svecica svecica* vs. *L. s. namnetum*; sýkora koňadra, *Parus major* vs. sýkora modřinka, *Cyanistes caeruleus*) se stejným výsledkem (Cramer et al. 2016b).

## 1.6. Vlačovka obecná – modelový organizmus

Jako modelový organizmus pro předloženou studii byla vybrána vlačovka obecná (*Hirundo rustica*). Jedná se o malého, přibližně 20g, insektivorního pěvce (*Passerines*) z čeledi vlačovkovitých (*Hirundinidae*). Jedinci loví hmyz za letu, a proto je pro ně typický manévrovací let, který je umožněn dlouhými a úzkými křídly a také dlouhým vykrojeným ocasem, jenž se stal učebnicovým příkladem pohlavního výběru (např. Møller 1992; 1995; Møller et al. 1998; Kleven et al. 2006a; Balbontín et al. 2011). Tito ptáci jsou typičtí kovově lesknoucím se peřím na hřbetě, melaninovým cihlově zbarveným hrdélkem a čelem (McGraw et al. 2004) a také bílými skvrnami na rýdovacím peří. Břišní strana těla je pak zbarvená od bílé až po světle rezavou.

Do Evropy přilétají vlačovky ze zimovišť v Africe na období hnízdění, které probíhá ve většině případů od května do srpna. Ptáci hnízdí koloniálně a typická je pro ně stavba miskovitých hnízd. Vlačovka obecná je pro studium kompetice spermií vhodným

modelovým organizmem díky prokazatelnosti existence mimopárových kopulací u tohoto druhu. Míra mimopárových mláďat se v jednotlivých populacích může značně lišit (např. Smith & Boag 1991; Møller & Tegelström 1997; Saino et al. 1997; Møller et al. 2003; Kleven et al. 2006a). V našich podmínkách jsou dospělci schopni vyhnízdit až 3x během jedné sezóny. Samice klade zpravidla jedno vejce denně až do maximálního počtu 6-7 vajec. Inkubuje pouze samice, o mláďata se starají oba rodiče.

Vlaštovka obecná se objevila i jako modelový organizmus ve studii zaměřené na fenotyp spermií. Jedna ze studií se zabývá vlivem radiace na fenotyp spermií populace žijící v Černobyli. Dle studie jedinci zde žijící měly vyšší zastoupení abnormálních spermií v ejakulátu než-li kontrolní skupina (Møller et al. 2005). Laskemoen et al. (2013) pak provedli analýzu vlivu různé míry kompetice spermií na fenotyp spermií u 7 populací tohoto druhu. Autoři zde sice našli signifikantní negativní vztah mezi poměrem hnízd s mimopárovými mláďaty a variabilitou v délce spermií naznačující stabilizující selekci na délku spermií, tento výsledek však nedokázali zopakovat v případě poměru mimopárových mláďat (Laskemoen et al. 2013a). Dále se výzkum zaměřil na vliv samičích tekutin z reprodukčního traktu na motilitu spermií. Porovnávala se motilita spermií v tekutinách samic s motilitou v neutrálním mediu. Lepší motilita byla prokázána v neutrálním mediu (Møller et al. 2008). V navazující studii bylo poté prokázáno, že starší samci měli prokazatelně lepší motilitu spermií v samičí tekutině, naopak mladší jedinci měli lepší motilitu v neutrálním mediu (Møller et al. 2009).

Reprodukční úspěch samců vlaštovky obecné může být ovlivněn zbarvením ventrální strany těla, délkou rýdovacích per a bílými skvrnami na ocasních perách. Vliv těchto proměnných se však výrazně liší mezi jednotlivými poddruhy vlaštovky obecné. Pro evropský poddruh vlaštovky obecné (*H. r. rustica*) se zdá být velmi důležitým znakem délka rýdovacích per. Samci s delšími rýdovacími pery byli úspěšnější v reprodukci. Měli méně cizích mláďat v hníždě a získali více mimopárových mláďat. Tento výsledek byl následně potvrzen i manipulativním experimentem. Samci s prodlouženým ocasem měli větší úspěšnost a samci se zkrácenými pery měli nejnižší reprodukční úspěch (Saino et al. 1997). Zároveň celoživotní reprodukční úspěch koreloval s délkou rýdovacích per a skvrnami na ocase, ale ne se zbarvením ventrální strany těla (Costanzo et al. 2017). Naopak u severoamerické vlaštovky obecné (*H. r. erythrogaster*) se v manipulativní studii zvýšila úspěšnost samců v ochraně paternity ve vlastním hníždě po ztmavení ventrální strany těla a zkrácení rýdovacích per. Ke změně v reprodukčním úspěchu došlo pouze u samců, u kterých bylo změněno zbarvení (Safran et al. 2016). V případě poddruhu *H. r. transitiva* ochránili

lépe paternitu ve svém hnízdě samci, u kterých došlo ke ztmavení ventrální strany těla a prodloužení rýdovacích per (Vortman et al. 2013; Safran et al. 2016). Délka rýdovacích per neovlivňovala reprodukční úspěch u poddruhu *H. r. gutturalis* (Kojima et al. 2009). Pro zbývající dva poddruhy vlaštovky obecné (*H. r. tytleri* a *H. r. savignii*) nejsou informace dostupné. Vliv délky spermií či kombinace prekopulačních a postkopulačních znaku u vlaštovky obecné zatím nebyl testován.

## 1.7. Cíle práce

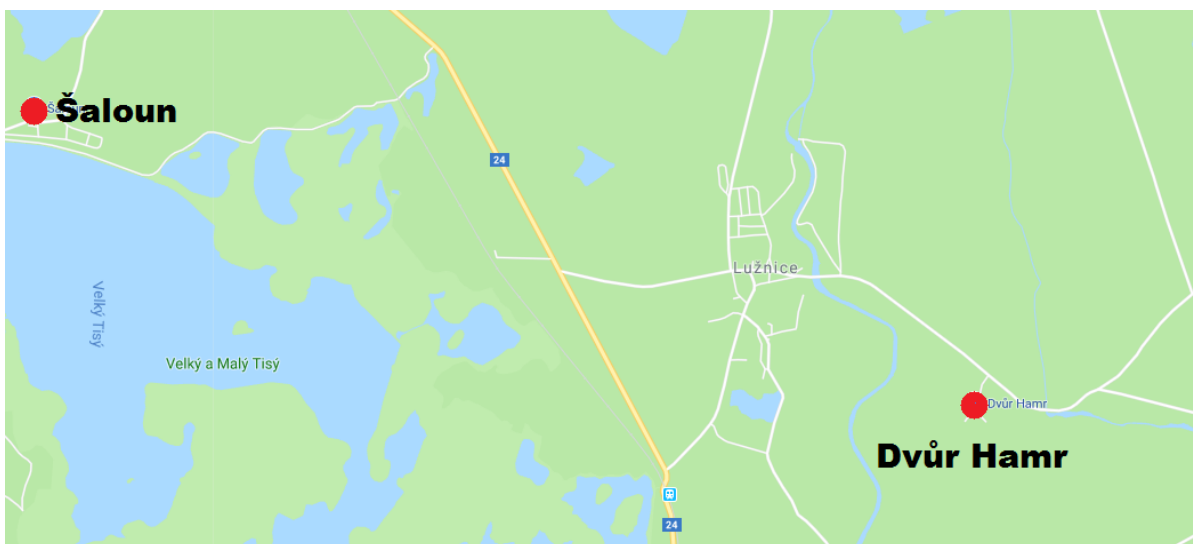
1. Stanovení opakovatelnosti fenotypu spermií u vlaštovky obecné.
2. Zhodnotit změny v kvalitě spermií (velikost, rychlost, abnormality) s věkem samce.
3. Stanovit vztah mezi fenotypem spermií, stářím samce a prekopulačními signály a fertilizačním úspěchem samců.
4. Objasnit vztah mezi výskytem abnormálních spermií a fertilizační kapacitou ejakulátu.
5. Ověřit vliv samičího prostředí na chování spermií v neutrálním, konspecifickém a heterospecifickém prostředí.

## 2. Metodika

### 2.1. Odchyty

Jedinci byli odchyťaváni do nárazových sítí v Jižních Čechách na dvou izolovaných lokalitách v oblasti Lužnice – Dvůr Hamr ( $49^{\circ}3'24.217''\text{N}$ ,  $14^{\circ}46'9.361''\text{E}$ ) a Lomnice nad Lužnicí – Šaloun ( $49^{\circ}04'07.6''\text{N}$ ,  $14^{\circ}42'37.7''\text{E}$ ) v okrese Jindřichův Hradec (Obr. 7). Odchyty byly prováděny na zemědělských usedlostech, kde vlaštovky každoročně hnízdí. Zde je možné jedince odchyťit a díky vzdálenosti a izolovanosti těchto lokalit lze určit genetické rodiče u naprosté většiny mláďat. Zároveň byly prováděny pravidelné kontroly hnízd.

Obr. 7. Výzkumné lokality



Odchyty ptáků na výše zmíněných lokalitách probíhají již od r. 2009 několikrát v průběhu hnízdní sezóny od dubna až do srpna. Jak již bylo řečeno, jedinci byli odchyťaváni do nárazových sítí a to v brzkých ranních hodinách. Sítě byly umístěny do průletových míst – oken a dveří. Během sezóny byla vždy odchycena většina jedinců. Všichni jedinci byli označeni hliníkovým kroužkem s unikátním kódem Národního muzea v Praze. Zároveň každý jedinec dostal kombinaci barevných kroužků. Kombinace byly taktéž jedinečné a sloužily k určení sociálních partnerů na jednotlivých hnízdech pomocí dalekohledu či fotoaparátu. Kvůli určení biologických rodičů mláďat byla všem dospělým jedincům odebrána krev, která byla uchovávána v 96% ethanolu. Po dobu držení byli ptáci umístěni do



prodyšných sáčků. Výzkumná práce byla prováděna v improvizovaných laboratořích. Samice byly vždy zpracovávány přednostně a co nejrychleji vypuštěny zpět na hnízda.

Každý odchycený jedinec byl zvážen pomocí digitální váhy (Pesola, MS500, rozsah 0-500 g, přesnost 0,1 g). Pomocí posuvného digitálního měřítka (rozsah 0-150 mm, rozlišení 0,1 mm, chyba  $\pm 0,03$  mm) byla jedincům změřena velikost hlavy, zobáku a tarsu, délka křídla pomocí pravítka se zarážkou (přesnost 0,1 cm) a délky rýdovacích per pomocí pravítka s hřebíčkem, které slouží k přesnému určení báze pera. Věk samce byl přesně znám, pokud byl jedinec okroužkován jako mládě v naší lokalitě. Pokud byl samec odchycen bez kroužku, jeho věk byl určen jako 1 rok. Tento postup byl převzat z předcházejících studií (Møller et al. 2003; Costanzo et al. 2017).

Každé mládě bylo ve věku 6 – 9 dní okroužkováno hliníkovým kroužkem s identifikačním kódem a pro pozdější určení biologických rodičů byla mláďatům odebrána krev. Po skončení odběru byla mláďata vrácena na hnízdo, které bylo v průběhu manipulace zakryté, aby ho dospělí jedinci nepovažovali za prázdné.

## 2.2. Odběr vzorků

Spermie byly samcům odebírány neinvazivní metodou pomocí kloakální masáže (Wolfson 1952; Albrecht et al. 2013) pomocí tenkostěnné kapiláry. Vzorky určené pro měření motility byly vloženy do předem vyhřátého (40 °C) media DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Advanced D-MEM, Invitrogen, Carlsbad, CA). Vzorek určen pro analýzu morfologie spermií byl přenesen do zkumavky s 5% roztokem formalínu.

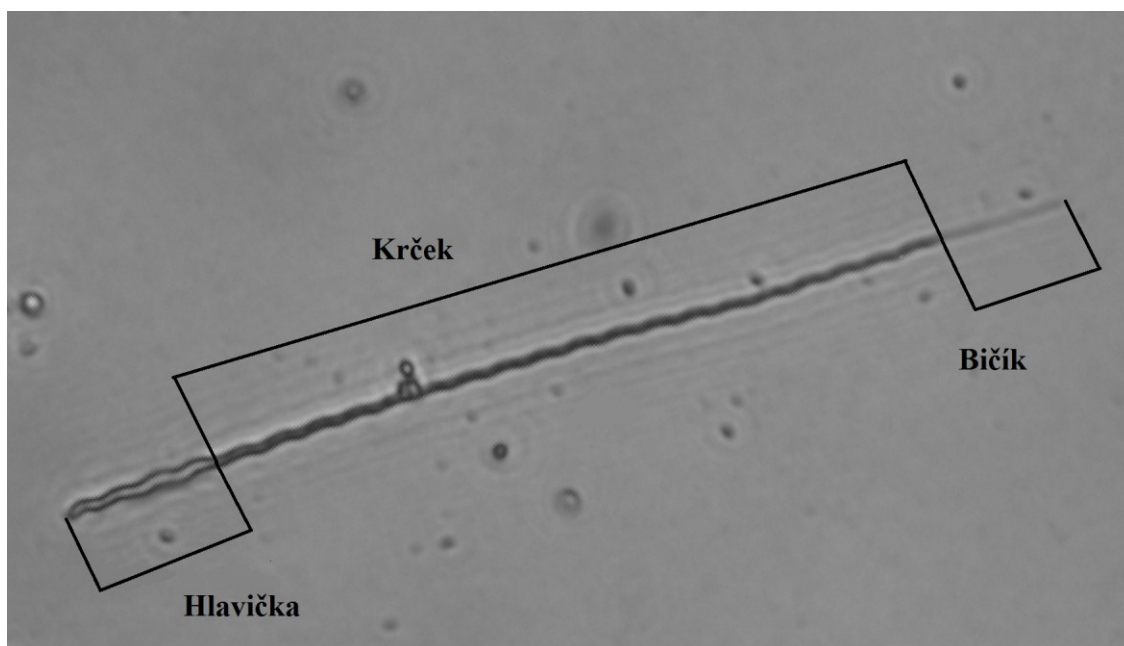
Pro získání tekutiny ze samičích reprodukčních cest bylo do kloaky samice aplikováno 5  $\mu$ l PBS. Po 10 s byla tekutina odebrána a celý postup se dvakrát zopakoval. Odebrané vzorky byly skladovány v tekutém dusíku. Metodika odběru tekutin z reprodukčního traktu samice byla převzata od Cramer et al. (2014). Metoda byla aplikována stejně u české i severoamerické populace.

## 2.3. Délka spermií

Z odebraných vzorků ejakulátu se později v laboratoři nanoslo pomocí automatické pipety 7  $\mu$ l spermií v roztoku na podložní sklíčka. Preparát se nechal nejprve přes noc oschnout, aby se zajistilo přichycení spermií k povrchu, a poté byl opláchnut destilovanou vodou, čímž

byly odstraněny zbytky formalínu. Poté se nechal preparát znovu oschnout. Připravené preparáty byly prohlíženy světelným mikroskopem značky Olympus (BX51) při zvětšení 400x za použití digitální kamery DP71 značky Olympus a počítačového programu QuickPhoto Industrial 2.3. Pro každého jedince byly pořízeny snímky 10ti spermií. Do měření byly zahrnuty pouze spermie s normální morfologií. Z pořízených snímků se opět v programu QuickPhoto Industrial změřila délka hlavičky, krčku a bičíku spermie (Obr. 8). Celková délka spermie je pak rovna součtu těchto tří částí. Údaje jsou udávány v mikrometrech ( $\mu\text{m}$ ).

Obr. 8. Spermie vlašťovky obecné (zdroj vlastní data, zvětšení 400x)

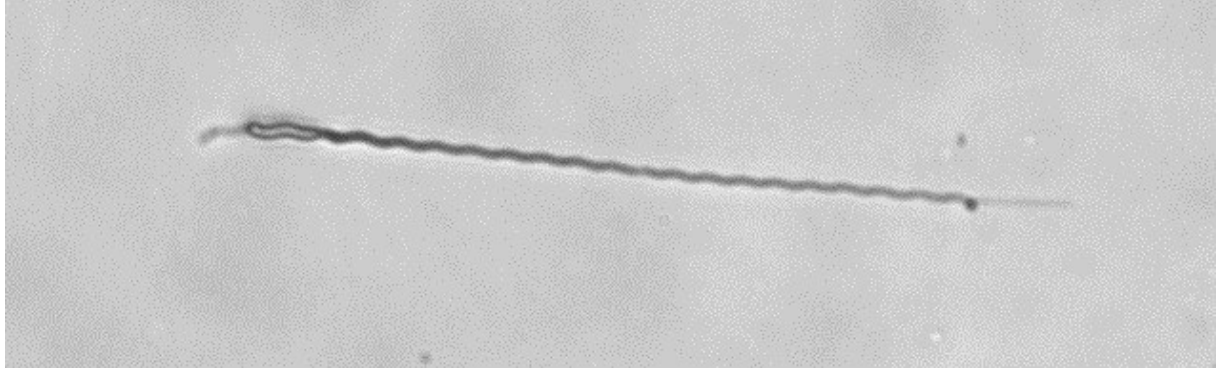


### 2.3.1. Analýza abnormalit

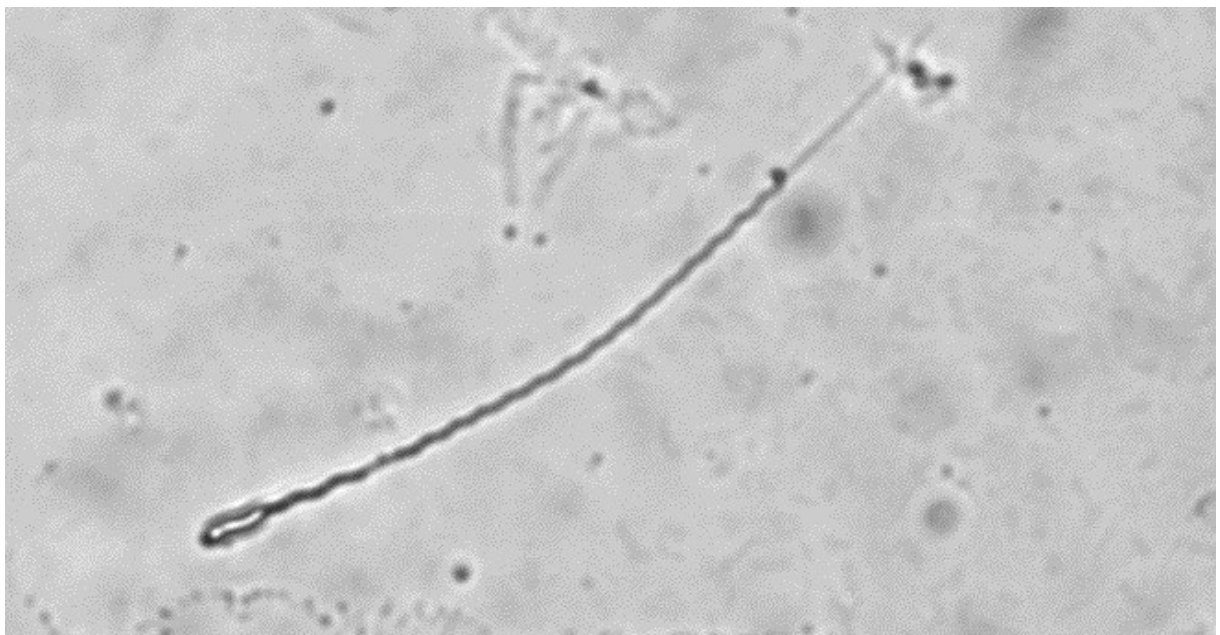
Od každého jedince bylo náhodně vybráno 100 spermií, u nichž bylo zanalyzováno zastoupení abnormalit v morfologii spermií. Každá spermie, která nevykazovala charakteristickou spirálovitou konformaci pěvčí spermie, byla určena jako abnormální. Abnormality byly rozčleněny do 5 kategorií – abnormální akrozom (obr. 9), chybějící akrozom (obr. 10), spermie bez hlavičky (obr. 11), absence helikální struktury (obr. 12) a ostatní abnormality. Za abnormální morfologii jsem nepovažovala zlomy krčku a bičíku, jelikož mohou být způsobeny při manipulaci se vzorkem. Spermie bez hlavičky bylo možné rozeznat od spermií se zlomem, a proto se s nimi v analýze počítalo. Metodika byla převzata

ze studie Opatová et al. (2016). Výsledkem je procentuální zastoupení abnormálních spermií v ejakulátu a typy abnormalit nalezené u těchto jedinců.

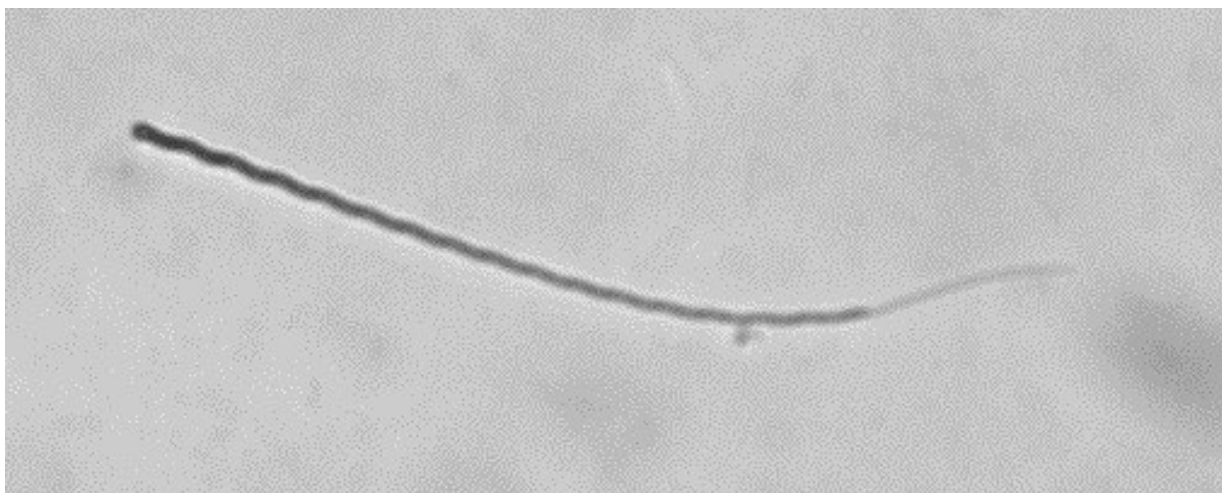
*Obr. 9. Abnormální akrozom (zdroj vlastní data, zvětšení 400x)*



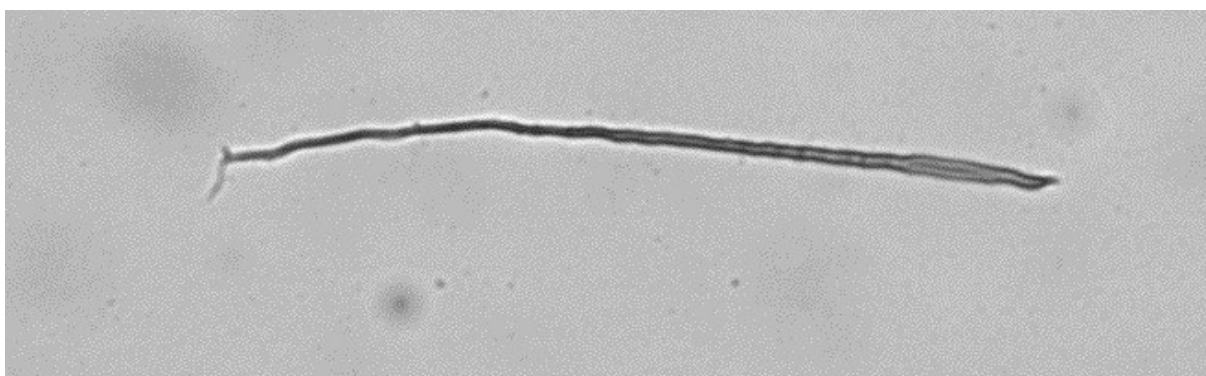
*Obr. 10. Spermie bez akrozomu (zdroj vlastní data, zvětšení 400x)*



Obr. 11. Spermie bez hlavičky (zdroj vlastní data, zvětšení 400x)



Obr. 12. Absence helikální struktury (zdroj vlastní data, zvětšení 400x)



## 2.4. Motilita spermií

Odebrané spermie aplikované do media DMEM byly bezprostředně přeneseny na mikroskopické Leja sklíčko (20  $\mu\text{m}$  hluboká, čtyř komorová, Leja, Nieuw-Venep, The Netherlands), které bylo rovněž jako medium vyhřáté na 40 °C. Motilita spermií byla natáčena pomocí mikroskopického setu (CX41 s fázovým kontrastem, digitální kamera UI-1540-C, program QuickPhoto Industrial 12.3, Olympus) při 100 násobném zvětšení. Teplota preparátu se udržovala na 40 °C pomocí průhledné vyhřevné destičky (ThermoPlate, MATS-U55S Tokai Hit, Olympus). Pohyb spermií se natáčel po dobu několika vteřin na více místech, což vedlo k zaznamenání motility více spermií.

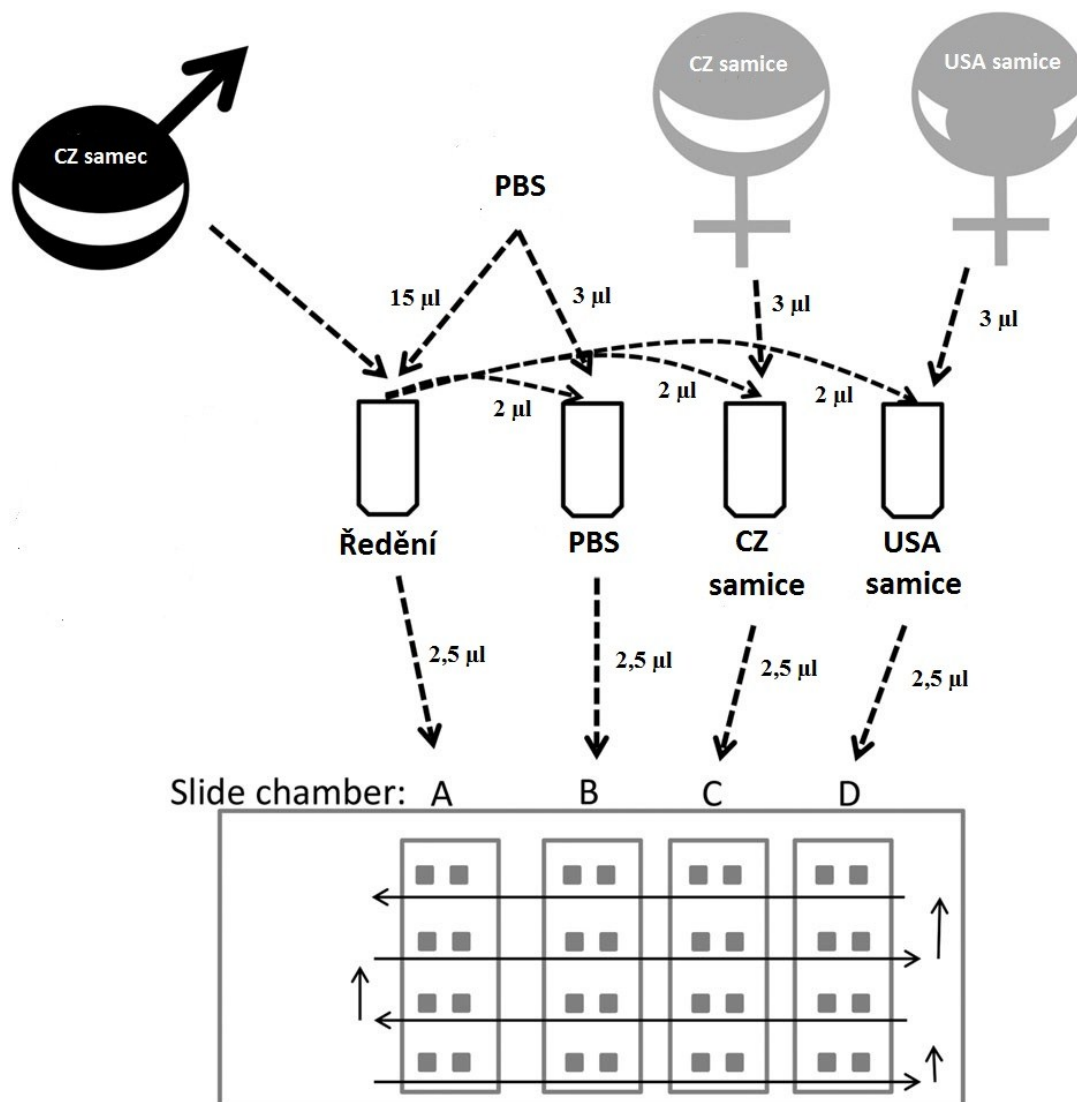
Pořízené videonahrávky motility spermií byly později analyzovány v programu CASA (Computer Assisted Sperm Analysis, CEROS, Hamilton Thorne, Inc. USA). Z výstupných dat byla vybrána hodnota VCL (velocity curvilinear). Tato hodnota určuje

rychlost spermií po celé její trajektorii tak, že určí jednotlivé rychlosti v bodech, kterými spermie prošla. Kromě hodnoty VCL byly na základě analýzy motility získány i údaje o rychlosti po vyrovnané trajektorii (VAP, velocity average path) a rychlosti na přímé trajektorii mezi výchozím a konečným bodem za určitý čas. Jelikož však neutrální medium neobsahovalo látky, které by spermie naváděly k nějakému cíli, byla v analýze využita pouze hodnota VCL, která byla považována za směrodatnou i v dalších studiích (Kleven et al. 2009; Opatová et al. 2016, Knief et al. 2017).

## **2.5. Experiment motility v neutrálním mediu a samičím prostředí**

Experiment vlivu samičí tekutiny z reprodukčních cest na motilitu spermií byl vždy proveden za použití vzorku spermií ze samce odchyceného v naší populaci, tekutiny jedné konspecifické samice (z naší populace) a heterospecifické samice (odchycené kolegy z týmu Dr. Safran v Coloradu, v USA). Odebraný vzorek ejakulátu byl nejprve rozředěn v 15  $\mu$ l PBS. Zároveň byly připraveny 3  $\mu$ l tekutiny z reprodukčního traktu od jedné heterospecifické a konspecifické samice a dále 3  $\mu$ l PBS, do kterých se po naředění přenesly 2  $\mu$ l vzorku. Po promíchání se na vyhřáté mikroskopické Leja sklíčko (20  $\mu$ m hluboká, čtyř komorová, Leja, Nieuw-Vennep, The Netherlands) aplikovalo 2,5  $\mu$ l z každé směsi a byla natáčena motilita pomocí mikroskopického setu (mikroskop CX41 s fázovým kontrastem, digitální kamera UI-1540-C, program QuickPhoto Industrial 12.3, Olympus) při zvětšení 100x. V každé komůrce se opět natáčelo po dobu několika vteřin na několika místech k zaznamenání motility pro větší počet spermií. Postavení jednotlivých medií na sklíčku se v jednotlivých experimentech lišilo. Schéma experimentu je zobrazeno na obrázku (Obr. 13).

Obr. 13. Schéma experimentu motility v neutrálním a samicím prostředí (převzato a upraveno dle Cramer et al. 2016a).



## 2.6. Analýza paternit

Za účelem určení paternit byla provedena genotypizace vzorků s využitím PCR a fragmentační analýzy. K paternitní analýze bylo využito 6 vysoce polymorfních, fluorescenčně značených, mikrosatelitových lokusů: Hir6, Hir10, Hir15, Hir20, Hir22 (Primmer et al. 1995) a HrU10 (Tsyusko et al. 2007), které byly hodnoceny pomocí programu GeneMarker® version 1.9 software (Softgenetics). Žádný z použitých markerů nevykazoval vysokou frekvenci nulových alel a kombinovaná pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče jako genetického otce/matky (combined probability of exclusion, CPE) dosahovala 99.999% pro celkový set. Vzhledem k tomu, že v námi sledované populaci

vlaštovek byl již dříve detekován výskyt mimopárových maternit (hnízdního parazitismu) a quasiparazitismu (Petrželková et al. 2015), byla v prvním kroku provedena analýza určující genetickou matku (Maternity analysis) a teprve poté separátní analýzy určujícího genetického otce (Paternity analysis). Pro potvrzení nalezených kandidátních rodičů byla na závěr provedena „Parent-pair analysis“. K analýzám a odhadu pozorované a očekávané heterozygotnosti, frekvenci nulových alel a CPE, byl použit program Cervus 3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). Samci byli považováni za genetické otce mláděte, pokud vykazovali nulovou nebo pouze jednu neshodu s daným mládětem. Tuto část práce provedla členka našeho týmu Mgr. Romana Michálková. Podrobnější informace o postupu při určení genetických rodičů jsou k dispozici v práci Petrželková et al. (2015).

Kromě párových a mimopárových mláďat byla rozlišena mláďata parazitická a quasiparazitická. Parazitické mládě je mládě, které samice snesla do cizího hnízda (nevychovává ho ani jeden genetický rodič). Tyto mláďata bylo potřeba rozdělit na párová (zplozená sociálním párem) a mimopárová. Dle rozdělení s nimi bylo dále počítáno v analýze. Quasiparazitická mláďata jsou taková, která jsou snesena cizí samicí do hnízda genetického otce. Byla tedy vždy započítána jako mimopárový úspěch samce.

## 2.7. Statistické vyhodnocování

K vyhodnocení dat byl použit program R 3.5.0 (R Core Team, 2017). Opakovatelnost měření v rámci samce byla testována s využitím package rptR (počet bootstrapů nastaven na 1000, Stoffel et al. 2017). Nejčastěji byly použity mixované lineární modely či zobecněné mixované lineární modely (package lme4 v R programu, Bates et al. 2015). V analýze byli použiti všichni samci odchycení během let 2013 – 2017, kteří měli odběr spermií během prvního hnízdění. Analýza vlivu proměnných na reprodukční úspěch samce tedy zahrnovala identitu samce jako náhodný efekt. Rozložení bylo binomické či Poissonovo dle typu závislé proměnné. V modelech testujících senescenci spermií byl věk do modelů zadán s příkazem `poly` (druhého řádu) k otestování jiného než lineárního vztahu mezi proměnnými. V modelech testujících faktory ovlivňující reprodukční úspěch byla délka spermií, popř. délka krčku, do modelu dána s příkazem `poly` (druhého řádu) k potvrzení stabilizující selekce na délku spermie či délku krčku. K porovnání fenotypu spermií u podváděných a mimopárových samců byl vytvořen nový dataset. Velikost spermií byla porovnána v rámci 72 hnízd, motilita pouze u 65 případů. Ke srovnání jsem použila zobecněný lineární model,

který byl kontrolován na kód hnízda a identitu samice jako náhodný efekt. Vyhodnocování vždy započalo sestavením plného modelu (full model), který byl pomocí funkce drop1 zjednodušován postupným delečním testem (step-wise deletion test) až k získání minimálního adekvátního modelu (minimal adequate model) či nulového modelu, pokud nebyl prokázán signifikantní vliv ani pro jednu z proměnných. Oprávněnost zjednodušení byla testována s využitím  $\text{Chi}^2$  testu (Crawley 2012). Výsledný model byl vždy srovnán s nulovým modelem. K analýze motility v tekutinách z reprodukčního traktu samic a neutrálním mediu byl použit lineární mixovaný model s číslem experimentu jako náhodným efektem. Modely byly testovány na normální rozložení residuálů s využitím Shapiro-Wilkova testu. Relativní délka krčku byla kvůli nenormálnímu rozložení logit transformována. Pro všechny analýzy byly považovány za signifikantní hodnoty s  $p < 0,05$ . Hodnoty průměrů jsou prezentovány společně s  $\pm$  SE.



### 3. Výsledky

V letech 2013 až 2017 bylo odchyceno celkem 130 samců vlaštovky obecné, kteří zahníždili a podstoupili odběr spermií v období prvního hnízdění. Celkem 3 jedinci byli odchyceni ve čtyřech po sobě jdoucích sezonách, 7 jedinců ve třech a 21 jedinců ve dvou sezonách. Celkově jsem tedy pracovala se 174 pozorováními. Seznam použitých proměnných je zobrazen v tabulce (Tabulka 1). Z celkového počtu 687 mlád'at, 102 (14,8 %) mlád'at pocházelo z mimopárových kopulací. V hnízdech 81 (46,6 %) samců bylo přítomno alespoň jedno mimopárové mládě. Celkem 17 parazitických mlád'at bylo rozděleno na párová mlád'ata – 5 mlád'at (29,4 %) a mimopárová mlád'ata – 12 (70,6 %). Dále bylo v datasetu počítáno s 10 quasiparazitickými mlád'aty.

Tabulka 1. Popisná statistika použitých proměnných

Proměnná	Průměr	SE <sup>1</sup>	Minimum	Maximum	N
<b>Věk</b>	2,098	0,082	1	6	174
<b>Délka ocasních per</b>	115,7	0,742	88	141	174
<b>WPY<sup>2</sup></b>	3,362	0,095	1	6	174
<b>EPY v hnízdě<sup>3</sup></b>	0,730	0,070	0	4	174
<b>EPY samce<sup>4</sup></b>	0,586	0,078	0	5	174
<b>Fitness<sup>5</sup></b>	3,948	0,122	1	10	174
<b>Celková délka spermie (μm)</b>	86,8	0,183	81,2	93,58	174
<b>Délka hlavičky (μm)</b>	12,75	0,049	10,26	14,37	174
<b>Relativní délka hlavičky (μm)</b>	0,147	0,001	0,12	0,1712	174
<b>Délka krčku (μm)</b>	58,41	0,208	46,51	65,42	174
<b>Relativní délka krčku (μm)</b>	0,673	0,003	0,544	0,749	174
<b>Délka bičíku (μm)</b>	15,65	0,261	9,2	28,74	174
<b>VLC (μm/s)</b>	93,26	0,955	48,75	118,87	174
<b>Počet abnormálních spermií</b>	3,511	0,691	0	80	174

<sup>1</sup> Směrodatná chyba (standard error)

<sup>2</sup> Počet párových mlád'at v hnízdě

<sup>3</sup> Počet cizích mlád'at v hnízdě

<sup>4</sup> Počet mimopárových mlád'at samce

<sup>5</sup> Celkový počet mlád'at samce

### 3.1. Velikost spermií

Každému jedinci byla změřená celková délka spermie a jednotlivých komponent (hlavička, krček, bičík). Nejčastěji užívaným znakem morfologie spermií je celková délka. Korelační matice (Tabulka 2) prokazuje korelaci jednotlivých morfologických znaků spermie (délka hlavičky, relativní délka hlavičky, délka krčku, relativní délka krčku, délka bičíku a celková délka spermie). Celková délka spermie koreluje signifikantně se všemi znaky kromě délky krčku. Proto se v následných analýzách počítalo především s celkovou délkou spermie a délkou krčku.

Tabulka 2. Korelační matice komponent spermie (hodnoty uvádí Spearmanův korelační koeficient, tučně zvýrazněné hodnoty jsou signifikantní na hladině  $p < 0,05$ )

Proměnná	Rel. hlavička	Krček	Rel. krček	Bičík	Celková délka
Hlavička	<b>0,82</b>	0,03	-0,08	-0,05	<b>0,22</b>
Rel. hlavička		-0,02	<b>0,20</b>	<b>-0,39</b>	<b>-0,32</b>
Krček			<b>0,80</b>	<b>-0,67</b>	0,11
Rel. krček				<b>-0,96</b>	<b>-0,46</b>
Bičík					<b>0,60</b>

#### 3.1.1. Opakovatelnost ve fenotypu spermií

Jelikož někteří jedinci byli odchyceni více let po sobě, byla provedena meziroční analýza opakovatelnosti v délce spermií, zastoupení abnormálních spermií a motilitě spermií. Opakovatelnost byla počítána v programu R s využitím balíčku rptR. Z výsledků (Tabulka 3) vyplývá, že celková délka spermie i její jednotlivé komponenty, motilita spermií i množství abnormalit jsou opakovatelné v životě samce.

Tabulka 3. Meziroční opakovatelnost v délce a motilitě spermií

Proměnná	r	SE <sup>1</sup>	CI <sup>6</sup>	p
Délka hlavičky	0,581	0,113	0,325 – 0,760	<0,001
Délka krčku	0,679	0,088	0,469 – 0,815	<0,001
Délka bičíku	0,732	0,080	0,546 – 0,852	<0,001
Celková délka spermie	0,869	0,045	0,756 – 0,931	<0,001
VCL	0,530	0,115	0,284 – 0,713	<0,001
Abnormality	0,901	0,035	0,813 – 0,951	<0,001

<sup>6</sup> Konfidenční interval 95%

### 3.1.2. Abnormální morfologie

Pro všech 174 pozorování 130 samců bylo určeno množství abnormálních spermií v ejakulátu samce. U vlaštovky obecné bylo nalezeno 5 druhů abnormalit – abnormální akrozom, chybějící akrozom, spermie bez hlavičky, absence helikální struktury a ostatní abnormality. Četnost jednotlivých abnormalit lze vyčíst z tabulky (Tabulka 5). Z tabulky vyplývá, že nejčastější abnormalitou pro vlaštovku obecnou na Třeboňsku je spermie bez hlavičky. Celkem bylo zkontrolováno 174 vzorků, ze kterých u 124 (71,3 %) případů byla nalezena alespoň jedna abnormální spermie. Celkem ze 17400 spermií bylo 603 (3,5 %) určeno jako abnormálních. Jak lze vyčíst z tabulky (Tabulka 1), nejméně spermií zastoupených v ejakulátu bylo 0, nejvíce 80 abnormálních spermiích. V tabulce (Tabulka 4) lze vyčíst průměrné zastoupení, maximum i minimum daných abnormalit v rámci jednotlivých samců, celkový počet daných abnormalit v datasetu a jejich procentuální zastoupení.

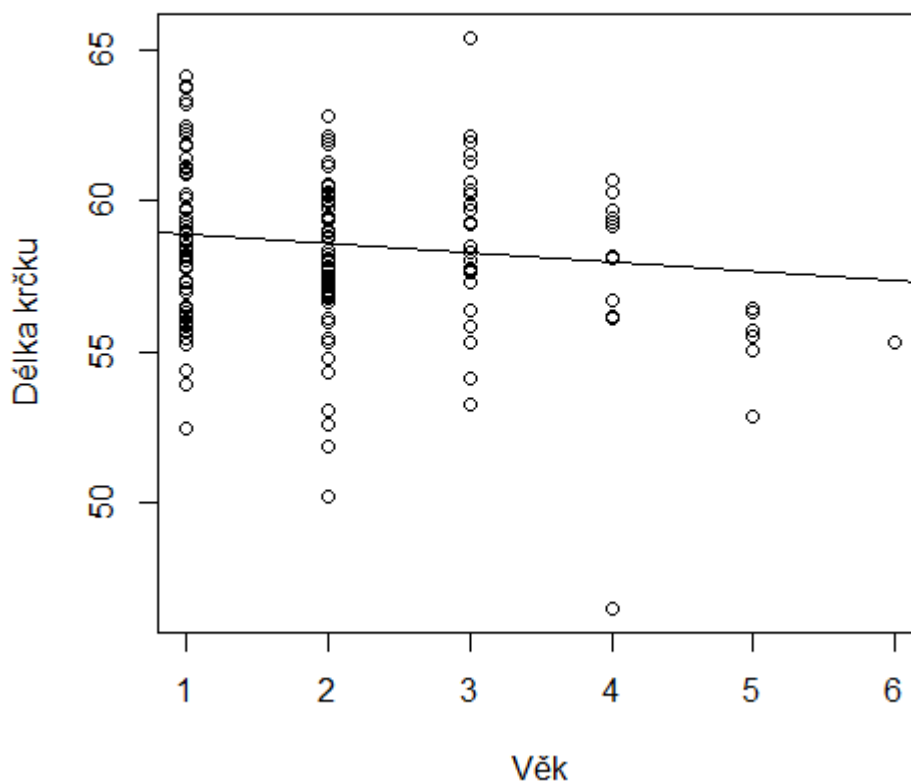
Tabulka 4. Abnormality morfologie spermií vlaštovky obecné

Proměnná	Průměr	SE <sup>1</sup>	Minimum	Maximum	Celk. počet	% zastoupení
Abn. akrozom	1,023	0,129	0	16	178	29,5
Bez akrozomu	0,540	0,102	0	10	94	15,6
Bez hlavičky	1,42	0,580	0	68	247	41,0
A. h. struktury	0,471	0,236	0	35	82	13,6
Ostatní	0,001	0,008	0	1	2	0,3

### 3.1.3. Senescence spermíí

Pomocí lineárního mixovaného modelu byl testován neprve vztah mezi celkovou délkou spermie a věkem samce. Mezi proměnnými nebyl nalezen nelineární ani lineární vztah. Modely zahrnující délku spermie byl srovnány s nulovým modelem (polynom:  $\text{Chi}^2 = 1,075$ ;  $\Delta\text{df} = 2$ ;  $p = 0,584$ ; lineární:  $\text{Chi}^2 = 0,893$ ;  $\Delta\text{df} = 1$ ;  $p = 0,345$ ;  $N = 174$  pozorování, 130 jedinců). Pomocí stejného modelu byl testován vliv věku na délku krčku (Obr. 14). Nebyl nalezen nelineární vztah mezi proměnnými (srovnání modelu s nulovým modelem:  $\text{Chi}^2 = 5,736$ ;  $\Delta\text{df}=2$ ;  $p=0,057$ ;  $N=174$  pozorování, 130 jedinců). Byl však nalezen negativní lineární vztah (sklon  $\pm$  SE =  $-0,289 \pm 0,142$ ;  $t = -2,032$ ) věku na délku krčku (srovnáno s nulovým modelem:  $\text{Chi}^2 = 4,12$ ;  $\Delta\text{df} = 1$ ;  $p = 0,042$ ;  $N = 174$  pozorování, 130 jedinců). Relativní délka krčku nebyla ovlivněna věkem samce (polynom:  $\text{Chi}^2 = 3,169$ ;  $\Delta\text{df} = 2$ ;  $p = 0,205$ ; lineární:  $\text{Chi}^2 = 2,637$ ;  $\Delta\text{df} = 1$ ;  $p = 0,104$ ;  $N = 174$  pozorování, 130 jedinců). Následující analýza vztahu mezi motilitou (VCL) a věkem samce opět neodhalila nelineární ani lineární vztah mezi proměnnými. Modely byly opět srovnány s nulovým modelem (polynom:  $\text{Chi}^2 = 0,750$ ;  $\Delta\text{df} = 2$ ;  $p = 0,687$ ; lineární:  $\text{Chi}^2 = 0,166$ ;  $\Delta\text{df} = 1$ ;  $p = 0,684$ ;  $N = 174$  pozorování, 130 jedinců). Jako poslední byl testován vliv věku na výskyt spermíí s abnormální morfologií u samců vlaštoky obecné. Opět nebyl nalezen nelineární ani lineární vztah mezi věkem samce a výskytem abnormalních spermíí (polynom:  $\text{Chi}^2 = 3,235$ ;  $\Delta\text{df} = 2$ ;  $p = 0,198$ ; lineární:  $\text{Chi}^2 = 0,002$ ;  $\Delta\text{df} = 1$ ;  $p = 0,966$ ;  $N = 174$  pozorování, 130 jedinců).

Obr. 14. Vztah mezi délkou krčku ( $\mu\text{m}$ ) a věkem samce



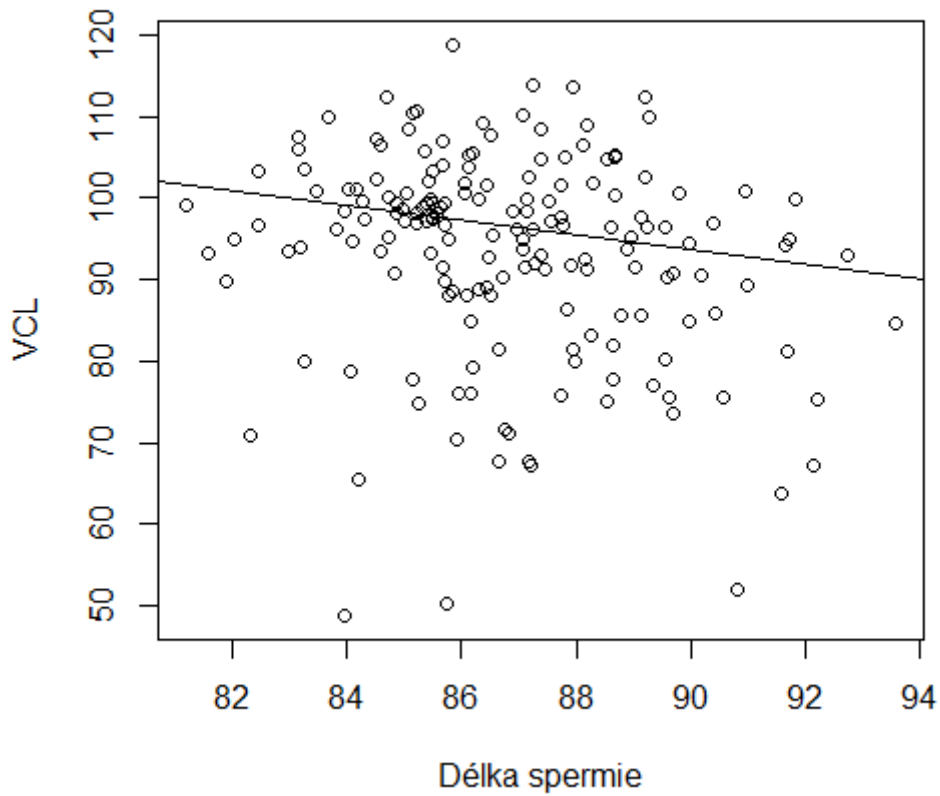
### 3.2. Vliv délky spermií na motilitu

Vliv celkové délky spermie, délky hlavičky, krčku a relativní délky krčku na motilitu spermií byl testován s využitím lineárních mixovaných modelů. Výsledky jednotlivých univariatních modelů jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 5). Byl nalezen negativní signifikantní vliv celkové délky na motilitu spermií (L. ratio = 4,90;  $\Delta\text{df} = 1$ ;  $p = 0,026$ ). Samci s kratšími spermiemi mají vyšší motilitu (Obr. 15). Nebyl prokázán žádný vliv délky hlavičky na motilitu spermií (L. ratio = 1,77;  $\Delta\text{df} = 1$ ;  $p = 0,183$ ). Mezi délkou krčku a motilitou nebyl nalezen žádný vztah (L. ratio = 0,942;  $\Delta\text{df} = 1$ ;  $p = 0,332$ ). Zároveň byl potvrzen pozitivní vztah mezi relativní délkou krčku a motilitou spermií (L. ratio = 4,032;  $\Delta\text{df} = 1$ ;  $p = 0,045$ ). Spermie s delším krčkem ku délce spermie plavaly rychleji (Obr. 16).

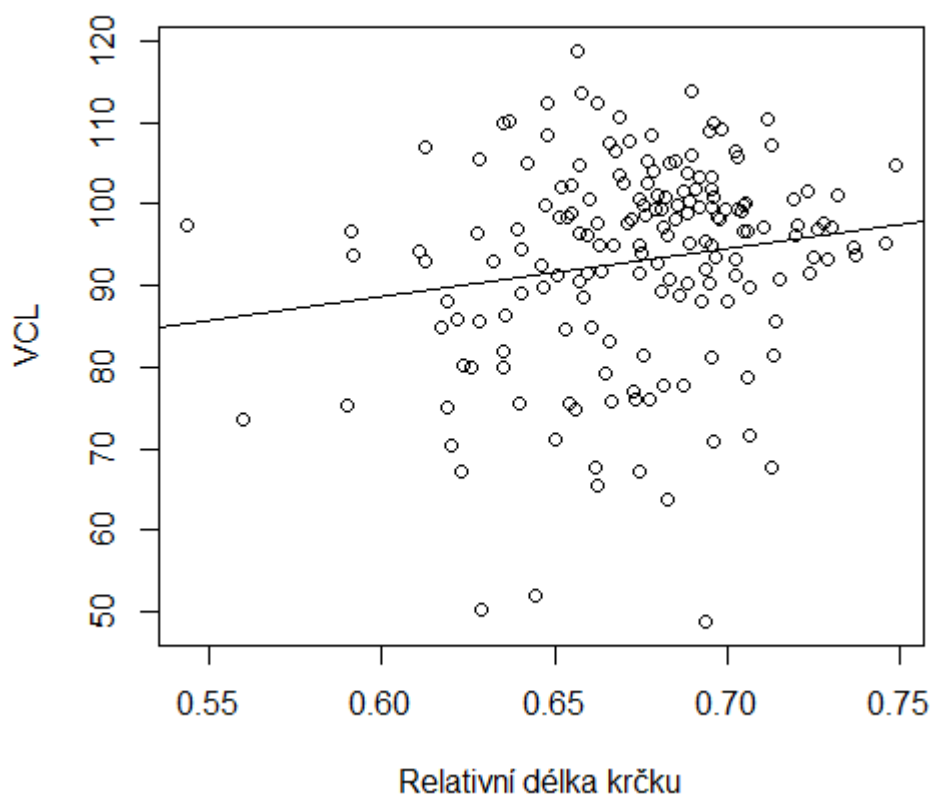
Tabulka 5. Výsledky analýz vztahu mezi velikostí spermií a motilitou

Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	t	p
Délka hlavičky	-2,068	1,508	-1,371	0,177
Délka krčku	0,348	0,359	0,969	0,338
Rel. délka krčku	29,541	14,608	2,022	0,049*
Celk. délka spermie	-0,938	0,422	-2,224	0,032*

Obr. 15. Vztah mezi celkovou délkou spermie ( $\mu\text{m}$ ) a motilitou spermií ( $\mu\text{m/s}$ )



Obr. 16. Vztah mezi relativní délkou krčku ( $\mu\text{m}$ ) a motilitou spermií ( $\mu\text{m/s}$ )



### 3.3. Faktory ovlivňující reprodukční úspěch samců

Pomocí mixovaného zobecněného lineárního modelu s identitou samce jako náhodným efektem byl testován vliv vybraných proměnných na fitness (počet párových a mimopárových mláďat) samce. V modelu byly za testované proměnné zvoleny motilita spermií (VLC), celková délka spermie, délka krčku a relativní délka krčku, přítomnost/nepřítomnost spermií s abnormální morfologií (1 - přítomnost, 0 - nepřítomnost), délka ocasních per a věk samce. Délka spermie a délka krčku byla do modelu dána s příkazem `poly` (testování lineárního i polynomického členu) k prokázání stabilizující selekce. Pokud by zde stabilizující selekce působila na délku spermií, samci s optimální (průměrnou) délkou by byli v reprodukci nejuspěšnější. Počáteční plný model (Tabulka 6) byl zjednodušován pomocí příkazu `drop1`. Nebyl však potvrzen žádný signifikantní vztah mezi proměnnými a celkovou fitness samce. Zjednodušování modelu vedlo k vytvoření

nulového modelu. Výsledky univariátních analýz nepřinesly rozdílné výsledky a jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka S1) v příloze.

*Tabulka 6. Počáteční plný model pro fitness samce ( $Chi^2 = 5,694$ ;  $\Delta df = 9$ ;  $p = 0,770$ ;  $N = 174$  pozorování, 130 samců)*

Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	z	p
<b>Intercept</b>	1,341	0,108	12,369	<0,001
<b>VCL</b>	-0,030	0,040	-0,759	0,448
<b>Celková délka spermie (lineární)</b>	-2,422	6,149	-0,394	0,694
<b>Celková délka spermie (polynom)</b>	0,830	0,523	1,588	0,112
<b>Délka krčku (lineární)</b>	3,795	10,261	0,370	0,711
<b>Délka krčku (polynom)</b>	-0,332	0,608	-0,545	0,586
<b>Rel. délka krčku</b>	-0,335	0,857	-0,391	0,696
<b>Přítomnost abnormálních spermií</b>	-0,055	0,085	-0,640	0,522
<b>Délka ocasních per</b>	0,014	0,041	0,334	0,738
<b>Věk</b>	0,032	0,037	0,859	0,391

Reprodukční úspěch samce může být posuzován i dle jeho schopnosti uchránit paternitu v rámci vlastního páru. Následující model tedy jako vysvětlovanou proměnnou obsahuje poměr vlastních a cizích mlád'at v hnízdě samce. Nejprve byl sestaven plný model s využitím všech výše zmíněných proměnných (Tabulka 7). Pomocí funkce drop1 byly odebrány proměnné, pro které nebyl prokázán signifikantní vliv na poměr mlád'at v hnízdě. Postupným odebráním došlo k vytvoření minimálního adekvátního modelu ( $Chi^2 = 4,551$ ;  $\Delta df = 1$ ;  $p = 0,033$ ;  $N = 174$  pozorování, 130 samců), který obsahoval pouze relativní délku krčku. Relativní délka krčku negativně korelovala se schopností samce uchránit paternitu ve vlastním hnízdě (sklon  $\pm$  SE =  $-0,261 \pm 0,124$ ;  $z = -2,096$ ;  $p = 0,036$ ). Samci s kratším krčkem ku délce spermie měli méně cizích mlád'at ve svém hnízdě. Opět byly provedeny univariátní analýzy (Tabulka S2 v příloze), jejichž výsledek se od tohoto modelu nelišil.



Tabulka 7. Počáteční plný model pro poměr vlastních a cizích mláďat v hnízdě samce ( $\text{Chi}^2 = 10,610$ ;  $\Delta\text{df} = 9$ ;  $p = 0,303$ ;  $N = 174$  pozorování, 130 samců)

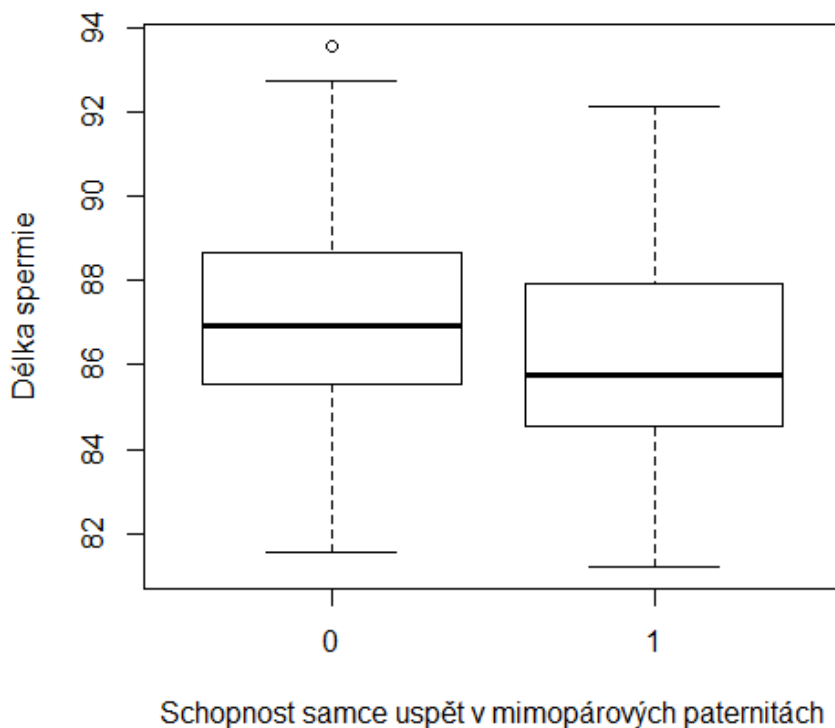
Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	z	p
<b>Intercept</b>	1,924	0,354	5,428	<0,001
<b>VCL</b>	0,011	0,128	0,090	0,929
<b>Celková délka spermie (lineární)</b>	-38,149	20,042	-1,903	0,057
<b>Celková délka spermie (polynom)</b>	1,605	1,756	0,914	0,361
<b>Délka krčku (lineární)</b>	66,197	33,402	1,982	0,048*
<b>Délka krčku (polynom)</b>	1,723	2,108	0,817	0,414
<b>Rel. délka krčku</b>	-5,711	2,780	-2,055	0,040*
<b>Přítomnost abnormálních spermií</b>	-0,150	0,261	-0,577	0,564
<b>Délka ocasních per</b>	0,135	0,129	1,049	0,294
<b>Věk</b>	-0,002	0,122	-0,204	0,838

Celkový reprodukční úspěch samce však obsahuje i schopnost samce zplodit mimopárová mláďata, a proto jsem test zopakovala pro proměnnou schopnost/neschopnost samce zplodit mimopárová mláďata (kategoriální proměnná) samce jako vysvětlovanou složku modelu. Opět po získání počátečního plného modelu (Tabulka 8) byl model redukován pomocí příkazu drop1. Po odstranění nesignifikantních proměnných jsem získala minimální adekvátní model ( $\text{Chi}^2 = 7,312$ ;  $\Delta\text{df} = 1$ ;  $p = 0,007$ ;  $N = 174$  pozorování, 130 samců), který obsahoval pouze celkovou délku spermie jako signifikantní proměnnou. Byl nalezen negativní vliv celkové délky spermie na schopnost samce uspět v mimopárových paternitách ( $\text{sklon} \pm \text{SE} = -0,454 \pm 0,174$ ;  $z = -2,606$ ;  $p = 0,009$ ). Čím kratší byla spermie, tím spíše samec uspěl v mimopárových kopulacích (Obr. 17). Univariátní analýzy (Tabulka S3 v příloze) kromě korelace s délkou spermie ukázaly i pozitivní vztah mezi relativní délkou krčku a schopností samce zplodit mimopárová mláďata ( $\text{sklon} \pm \text{SE} = 0,743 \pm 0,178$ ;  $z = 2,659$ ;  $p = 0,008$ ).

Tabulka 8. Počáteční plný model pro schopnost samce uspět v mimopárových kopulacích ( $\chi^2 = 15,276$ ;  $\Delta df = 9$ ;  $p = 0,084$ ;  $N = 174$  pozorování, 130 samců)

Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	z	p
Intercept	-1,547	0,497	-3,113	0,002
VCL	-0,078	0,177	-0,438	0,661
Celková délka spermie (lineární)	-10,914	31,332	-0,348	0,728
Celková délka spermie (polynom)	1,260	2,451	0,514	0,607
Délka krčku (lineární)	12,782	52,078	0,245	0,806
Délka krčku (polynom)	-0,382	3,039	-0,126	0,900
Rel. délka krčku	-0,601	4,298	-0,140	0,889
Přítomnost abnormálních spermií	0,256	0,378	0,677	0,498
Délka ocasních per	-0,186	0,179	-1,037	0,300
Věk	0,298	0,167	1,792	0,073

Obr. 17. Srovnání délky spermií ( $\mu\text{m}$ ) u samců, kteří neuspěli (0) a uspěli (1) v mimopárových kopulacích



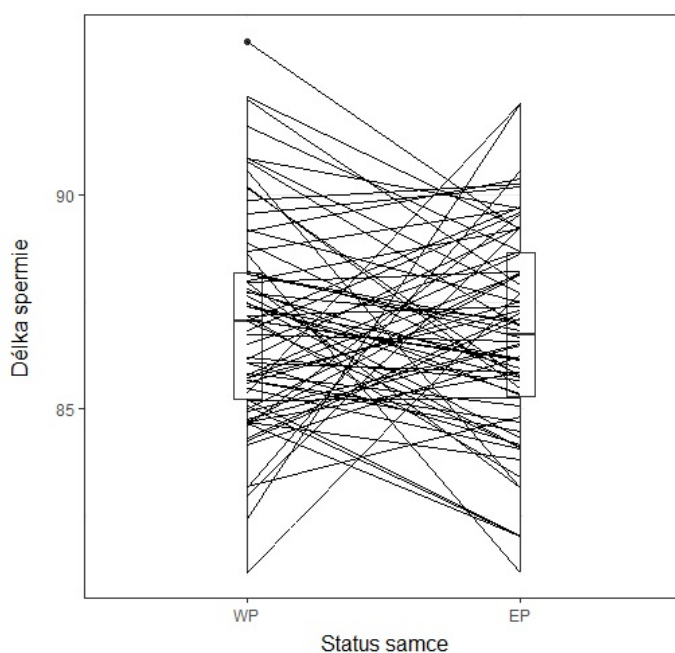
### 3.4. Srovnání podváděných a mimopárových samců

Vzhledem k předchozím výsledkům jsem se rozhodla vytvořit nový dataset, který by mi umožnil srovnat v rámci hnízd samce podváděné a podvádějící. Pro srovnání v celkové délce spermií, délce krčku a relativní délce krčku se podařilo vytvořit dataset 72 hnízd s párovým i mimopárovým samcem (popř. mimopárovými samci). Motilita byla srovnána pouze u 65 hnízd. Výsledky univariátních modelů jsou zobrazeny v tabulkách (Tabulka 9 – 12). Samci se mezi sebou signifikantně nelišili v délce spermií a jejich částí ani v motilitě. Výsledky jsou současně prezentovány v grafech (Obr. 18 – 21).

Tabulka 9. Srovnání celkové délky spermií párových a mimopárových samců ( $\chi^2 = 0,239$ ;  $\Delta df = 1$ ;  $p = 0,625$ ;  $N = 159$  pozorování, 72 hnízd, 59 samic)

Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	z	p
Intercept	-0,190	0,159	-1,189	0,235
Celková délka spermie	0,078	0,160	0,488	0,625

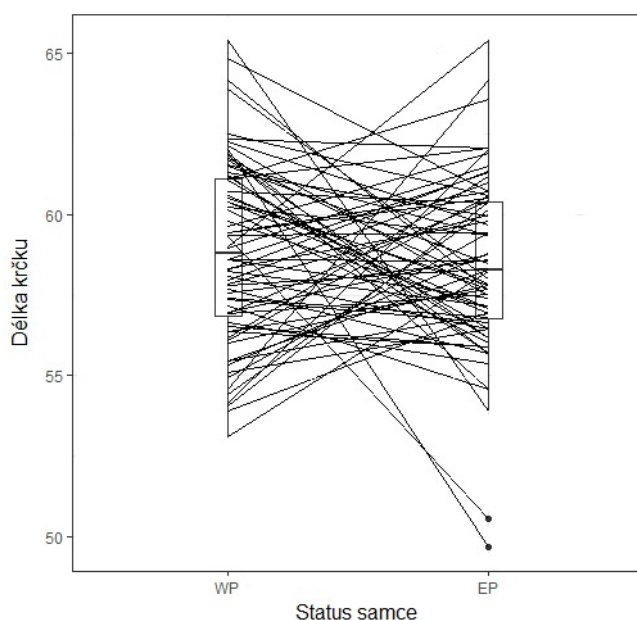
Obr. 18. Srovnání podváděných (WP) a podvádějících (EP) samců v délce spermií (V případě, že se v hnízdě vyskytovali dva mimopároví samci, jejich hodnoty pro délku spermií byly zprůměrovány, v grafu je zobrazen median, 25% a 75% kvantil, odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body)



Tabulka 10. Srovnání délky krčku spermií párových a mimopárových samců ( $\chi^2 = 0,643$ ;  $\Delta df = 1$ ;  $p = 0,423$ ;  $N = 159$  pozorování, 72 hnízd, 59 samic)

Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	z	p
Intercept	-0,190	0,160	-1,190	0,234
Délka krčku	0,0129	0,161	0,800	0,424

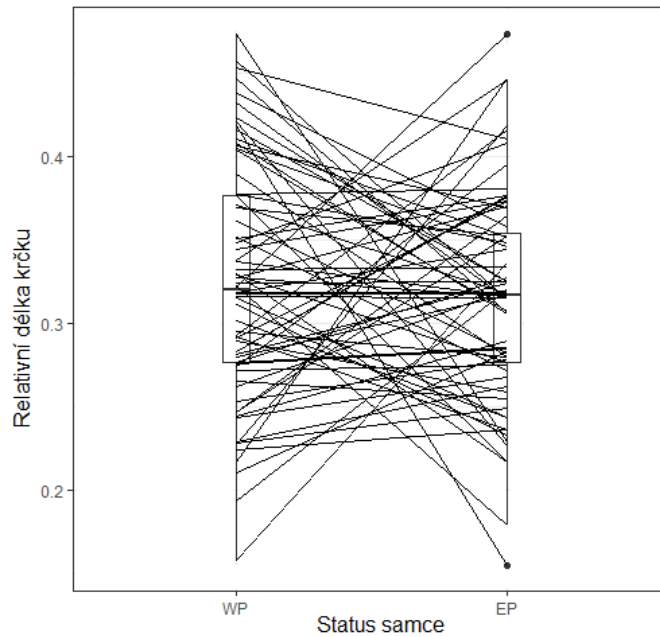
Obr. 19. Srovnání podváděných (WP) a podvádějících (EP) samců v délce krčku (V případě, že se v hnízdě vyskytovali dva mimopároví samci, jejich hodnoty pro délku krčku byly zprůměrovány, v grafu je zobrazen median, 25% a 75% kvantil, odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body)



Tabulka 11. Srovnání relativní délky krčku spermií párových a mimopárových samců ( $\chi^2 = 0,270$ ;  $\Delta df = 1$ ;  $p = 0,604$ ;  $N = 159$  pozorování, 72 hnízd, 59 samic)

Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	z	p
Intercept	-0,190	0,159	-1,189	0,235
Rel. délka krčku	0,083	0,160	0,519	0,604

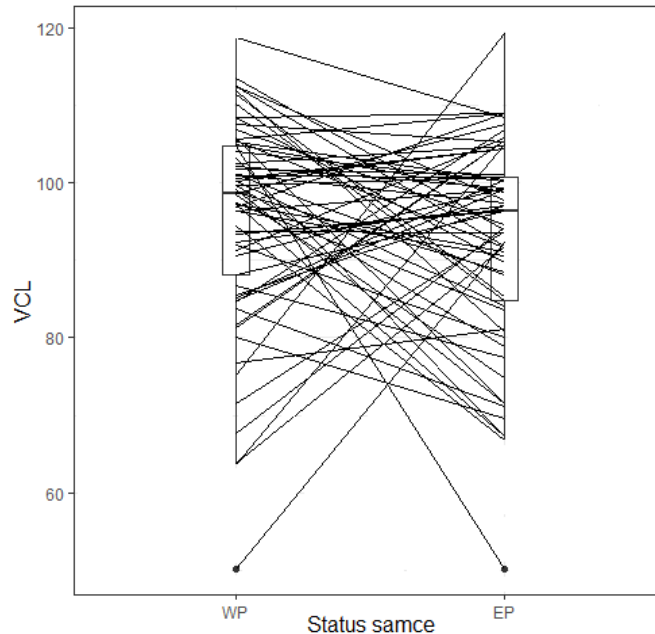
Obr. 20. Srovnání podváděných (WP) a podvádějících (EP) samců v relativní délce krčku (V případě, že se v hnízdě vyskytovali dva mimopároví samci, jejich hodnoty pro relativní délku krčku byly zprůměrovány, v grafu je zobrazen median, 25% a 75% kvantil, odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body)



Tabulka 12. Srovnání motility spermií párových a mimopárových samců ( $\text{Chi}^2 = 1,905$ ;  $\Delta df = 1$ ;  $p = 0,168$ ;  $N = 143$  pozorování, 65 hnízd, 56 samic)

Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	z	p
Intercept	-1,769	1,182	-1,496	0,135
VCL	0,017	0,012	1,359	0,174

Obr. 21. Srovnání podváděných (WP) a podvádějících (EP) samců v motilitě spermií (VCL) (V případě, že se v hnízdě vyskytovali dva mimopároví samci, jejich hodnoty pro motilitu spermií byly zprůměrovány, v grafu je zobrazen median, 25% a 75% kvantil, odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body)



### 3.5. Vliv samičího prostředí na motilitu spermií

V rámci studování vlivu postkopulační selekce na parametry spermie jsem testovala existenci skryté volby samice u vlaštovky obecné. Byly provedeny experimenty motility v tekutinách z reprodukčního traktu samic vlaštovky obecné z evropské a severoamerické populace a neutrálním mediu (Tabulka 13). Tato část měla prokázat selekci spermií samicí ve prospěch konspicivního samce. Celkem bylo provedeno 16 experimentů. V případě posledního experimentu se nezdařilo připravit tekutinu severoamerické samice vlaštovky obecné. Pro srovnání motility spermií v samičím prostředí a neutrálním mediu bylo tedy použito dostupných 15 experimentů.

Tabulka 13. Motilita spermií v neutrálním mediu (PBS) a v tekutinách reprodukčního traktu českých (CZ) a amerických (USA) samic

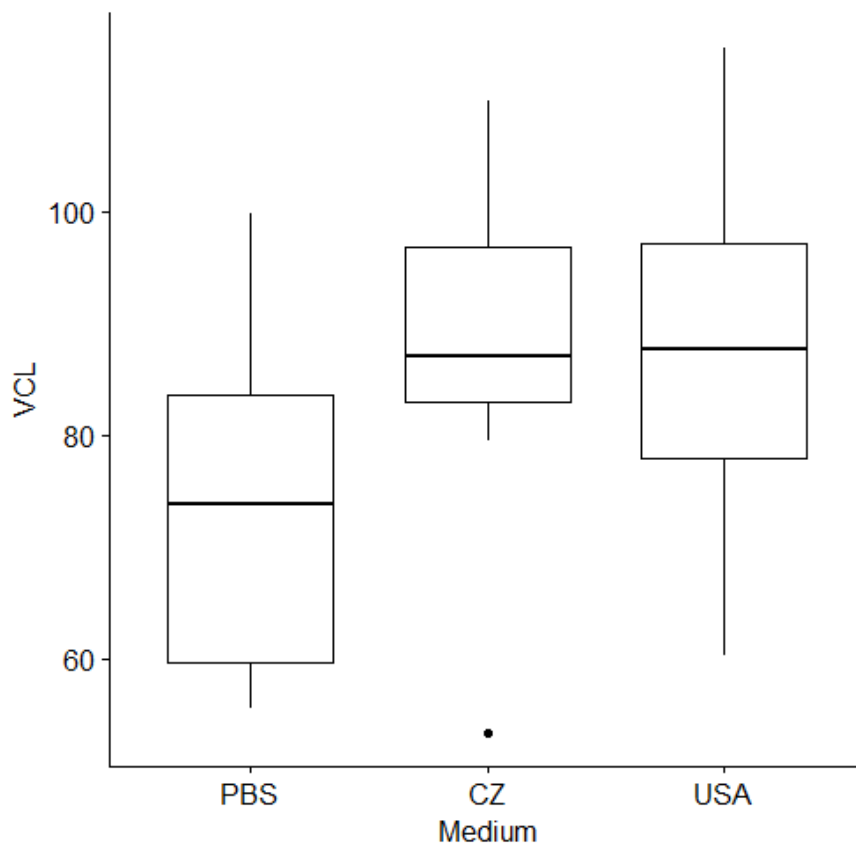
Proměnná	Průměr	SE <sup>1</sup>	Minimum	Maximum	N
PBS	74,57	3,792	55,48	99,70	16
CZ	87,51	3,349	53,37	109,90	16
USA	87,42	3,868	60,32	114,57	15

Výsledky modelu jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 14). Motilita v tekutinách obou skupin samic se signifikantně lišila od motility v neutrálním mediu. Spermie dosahovaly vyšší rychlosti v samičím prostředí než v neutrálním mediu. Motilita spermií v tekutinách z reprodukčního traktu českých samic však nebyla výrazně odlišná od motility v tekutinách samic ze S. Ameriky. Vztahy jsou graficky znázorněny v grafu (Obr. 22).

Tabulka 14. Srovnání motility spermií v neutrálním mediu (PBS, kontrola) a v tekutinách reprodukčního traktu českých (CZ) a amerických (USA) samic ( $L. ratio = 17,914$ ;  $\Delta df = 2$ ;  $p = <0,001$ )

Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	t	p
Kontrola	73,489	3,734	19,679	0,000
CZ	14,973	3,497	4,282	<0,001
USA	13,936	3,497	3,986	<0,001

Obr. 22. Srovnání motility spermií v neutrálním mediu (PBS) a v tekutinách reprodukčního traktu českých (CZ) a amerických (USA) samic





## 4. Diskuze

### 4.1. Fenotyp spermií a abnormality u vlaštovky obecné

Průměrná délka spermie vlaštovky obecné v této práci je 86,8  $\mu\text{m}$ , což je srovnatelný výsledek s předcházející studií na české populaci vlaštovky obecné (89,9  $\mu\text{m}$ , Laskemoen et al. 2013a). Pro fenotyp spermií byla počítána meziroční repeatabilita. Všechny komponenty (celková délka, délka hlavičky, krčku a volné části bičíku, zastoupení abnormálních spermií i motilita) se vyznačovaly značnou opakovatelností. Tento výsledek opět podporují předchozí výsledky (Laskemoen et al. 2013a;b). Opakovatelnost v délce a motilitě spermií byla prokázána např. i u vrabce domácího (*Passer domesticus*) a pokřovního (*P. hispaniolensis*, Cramer et al. 2013), vlhovce červenokřídlého (*Agelaius phoeniceus*, Lüpold et al. 2012) či zebříčky pestré (*Taenopygia guttata*, Opatová et al. 2016). V případě vlhovce však byla opakovatelnost relativně nízká. Pro krček byla nalezena opakovatelnost 0,32 a pro flagellum 0,29 (Lüpold et al. 2012). Údaje o opakovatelnosti fenotypu spermií jsou relativně vzácné. Především data získaná z divoce žijících populací jsou nedostatečná. Více studovaná je opakovatelnost délky spermií. Data o opakovatelnosti motility jsou vzácnější. Je třeba lépe prostudovat problematiku repeatability fenotypu spermií u dalších druhů pěvců, nejlépe v divoce žijících populacích, k potvrzení, že znaky spermií lze považovat za charakteristické znaky samce.

Vlaštovka obecná na Třeboňsku se vyznačuje relativně malým počtem spermií s abnormální morfologií. Průměrný zastoupení abnormalit v populaci je 3,5 % abnormálních spermií v ejakulátu samce. Abnormality byly u vlaštovky zkoumány ve spojitosti s radioaktivním prostředím v Černobyli. U populace žijící v Černobyli byl nalezen zvýšený počet abnormalit (21,74 %) v porovnání s kontrolní skupinou (2,65 %, Møller et al. 2005). Zastoupení abnormálních spermií v ejakulátu samců v Černobyli bylo testováno i u dalších druhů pěvců. Zastoupení abnormalit v kontrolních skupinách se pohybovalo v rozmezí 0,1 až 21,1 %. Zde byla také zastoupena vlaštovka obecná, pro kterou bylo zastoupení abnormálních spermií v kontrolní skupině 1,3 %. Množství abnormalit v kontrolní skupině je opět srovnatelný s výsledkem této studie. Kromě vlaštovky obecné bylo množství abnormalit sledováno u dlaska tlustozobého (*Coccothraustes coccothraustes*, 21,1 %), červenky obecné (*Erithacus rubecula*, 14 %), pěnkavy obecné (*Fringilla coelebs*, 14,9 %), sýkory koňadry (*Parus major*, 6,6 %), budníčka lesního (*Phylloscopus sibilatrix*, 16,1 %), budníčka většího

(*Phylloscopus trochilus*, 0,1 %), pěnice pokřovní (*Sylvia curruca*, 4,4 %), pěnice vlašské (*Sylvia nisoria*, 2,4 %) a kosa černého (*Turdus merula*, 4,9 %, Hermsell et al. 2013). U zebřičky pestré (*Taenopygia guttata*) byl testován vliv inbreedingu na zastoupení abnormálních spermií v ejakulátu samců. U skupiny s vysokým stupněm inbreedingu bylo potvrzeno zvýšené zastoupení abnormálních spermií (22 %) v porovnání s kontrolní skupinou (8 %, Opatová et al. 2016). Z dostupných informací se zdá, že u vlaštovky obecné je spíše nižší výskyt spermií s abnormální morfologií. Tento výsledek by mohl být způsoben relativně vysokou mírou kompetice spermií u tohoto druhu. Pro řadu druhů však informace nejsou dostupné.

## 4.2. Senescence spermií a vliv věku na reprodukční úspěch samců

V rámci své diplomové práce jsem testovala vliv věku na celkovou délku spermie, délku krčku, relativní délku krčku, motilitu spermií a výskyt spermií s abnormální morfologií. Nalezla jsem negativní vliv věku samce na délku krčku jeho spermií. Ostatní proměnné nebyly signifikantně ovlivněny věkem samce. Čím starší tedy samec byl, tím kratší krček měly jeho spermie. Tento výsledek tedy může potvrzovat senescenci spermií, jelikož délka krčku bývá často dávána do souvislosti s motilitou spermií a reprodukčním úspěchem. Spermie s delším krčkem by měly být schopny vyprodukovat větší množství ATP (Vladić et al. 2002; Rowe et al. 2013; ale Bennison et al. 2016) a plavat rychleji. V mnou studované populaci vlaštovky obecné sice nebyl nalezen vztah mezi délkou krčku a rychlostí spermií. Relativní délka krčku však pozitivně rychlost spermií ovlivňovala. Vztah mezi věkem a motilitou spermií však v mé studii nalezen nebyl. Spojitost mezi věkem a motilitou byla testována společně s vlivem media na motilitu spermií vlaštovky obecné ve studii Møller et al. (2009). Starší samci měli zhoršené dva parametry ze 13 v porovnání s mladšími samci – linearitu (počítána jako VSL/VCL) a přímost pohybu (počítána jako VSL/VAP, Møller et al. 2009). Vliv délky spermie a jejich komponent na motilitu je více diskutován níže.

Nízký výskyt senescence spermií u vlaštovky obecné by mohl být způsoben relativně vysokým rizikem kompetice spermií. Díky kompetici spermií je kladen vyšší nárok na kvalitu spermií a to může vést k produkci kvalitního ejakulátu takřka po celý život samce, aby byl schopen vyrovnat se kompetičnímu tlaku. Tento předpoklad byl testován u myší rodu *Mus* s rozličným zastoupením kompetice spermií. Ani u druhů s nízkou mírou kompetice však nebyla senescence spermií nalezena (delBarco-Trillo et al. 2018). V mé

studii byla navíc motilita natáčena po krátkou dobu. Je tedy možné, že spermie starších samců se mohou rychleji vyčerpat a snížení motility se projeví až po určitém časovém úseku. Dalším důvodem může být i neodstatečné věkové rozpětí samců, kteří byli do studie zahrnuti.

Zároveň reprodukční úspěch (poměr vlastních a cizích mlád'at v hnízdě, schopnost uspět v mimopárových kopulacích ani celkový počet mlád'at samce) neklesal s věkem samce. Tento výsledek je shodný s dalšími pěvčími studii, kde se spíše projevovала pozitivní korelace mezi věkem samce a jeho schopností uspět v mimopárových (Kleven et al. 2006b; Bitton et al. 2007; Bouwman et al. 2007; Lehtonen et al. 2009; Reitsma et al. 2018), ale i vnitropárových paternitách (Perreault et al. 1997; Bowers et al. 2015, Hsu et al. 2017). Tyto výsledky však nemusí znamenat, že starší samci mají kvalitnější spermie. Starší samci mohou být úspěšnější v mimopárových kopulacích proto, že mimopárové kopulace narozdíl od mladých a nezkušených samců více vyhledávají, či jsou schopni samice ke kopulaci efektivněji přinutit (Hsu et al. 2015). Další možnou příčinou může být výsledek samičího výběru starších samců, jelikož ti prokázali větší schopnost přežít a samice u nich mohou předpokládat kvalitnější geny.

### **4.3. Vliv délky spermií na motilitu**

K otestování vlivu délky spermií na jejich motilitu jsem si vybrala čtyři parametry spermií – délku hlavičky, délku krčku, relativní délku krčku a celkovou délku spermií. Mezi hlavičkou spermií a motilitou nebyl nalezen žádný vztah. Stejný výsledek byl nalezen i pro délku krčku. Relativní délka krčku však měla pozitivní vliv na motilitu spermií. Čím delší krček na celkovou délku spermií, tím rychleji spermie plavaly. Stejný výsledek byl zaznamenán v případě příbuzné vlaštovky stromové (*Tachycineta bicolor*, Laskemoen et al. 2010). Tento výsledek by potvrdzoval teorii, že delší krček souvisí s vyšší produkcí ATP (Vladić et al. 2002; Rowe et al. 2013, Tourmente et al. 2013). Díky většímu množství ATP jsou pak spermie schopny plavat rychleji (např. Tourmente et al. 2013, ale Rowe et al. 2013). Spermie s delším krčkem by tedy měli mít vyšší motilitu. U vlaštovky obecné však zřejmě nezáleží pouze na délce krčku, ale spíše na poměru délky krčku k celkové délce spermií. U modropláštěníka nádherného (*Malurus cyaneus*) pak nebyl nalezen vztah mezi délkou krčku a motilitou spermií (Calhim et al. 2011). V případě zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) studie byl nalezen negativní vztah mezi délkou krčku a množstvím ATP. Délka krčku však opět neměla signifikantní vliv na motilitu (Bennison et al. 2016, ale Knief et al. 2017).

Komparační studie zaměřené na pěvce ukazují rozporuplné výsledky. Některé studie potvrzují vliv délky krčku na motilitu spermií (Lüpold et al. 2009a), ale při srovnání 23 druhů pěvců byl sice nalezen vliv délky krčku na produkci ATP, motilita však zůstala neovlivněna (Rowe et al. 2013).

Vliv celkové délky na motilitu spermií se ukázal být v případě mé studie na vlaštovce obecné negativní. Tento výsledek je v rozporu s některými dalšími studiemi (Gomendio & Roldan 2008; Lüpold et al. 2009a; Losdat & Helfenstein 2018). Delší spermie lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) plavaly srovnatelně s krátkými (Lifjeld et al. 2012). V případě již zmiňované studii na zebříčkách pestrých (*Taeniopygia guttata*) byl pak nalezen nelineární vztah délky spermie na motilitu. Do určité délky motilita spermií stoupala se zvětšující se délkou spermie, ale příliš dlouhé spermie plavaly pomaleji (Bennison et al. 2016). Naopak mé výsledky se shodují s výsledky u příbuzného druhu břehule říční (*Riparia riparia*, Helfenstein et al. 2008). Délka spermie negativně ovlivňovala rychlost pohybu i v případě vrabce domácího (*Passer domesticus*) a pokřovního (*P. hispaniolensis*, Cramer et al. 2015).

Rozporuplné výsledky ukazují, že vztah mezi velikostí spermií a motilitou je patrně mnohem komplexnější, než se zprvu zdálo. Je potřeba dalšího testování k plnému pochopení problematiky. Navíc se prokázalo, že mít delší spermie nemusí být vždy nejvýhodnější. Delší spermie se mohou zřejmě rychleji vyčerpat (Levitan 2000; Helfenstein et al. 2010; Lifjeld et al. 2012; ale Helfenstein et al. 2008). Navíc příliš dlouhé spermie mohou mít potenciálně problém vejít se do skladovacích tubulů samice. Další možností je, že délka spermií a motilita nejsou úzce svázané proměnné a vyvíjí se nezávisle na sobě na základě rizika kompetice spermií.

#### **4.4. Faktory ovlivňující reprodukční úspěch samců**

K otestování faktorů ovlivňující reprodukční úspěch samců jsem zvolila motilitu spermií, celkovou délku spermie, délku krčku a relativní délku krčku, přítomnost/nepřítomnost spermií s abnormální morfologií, délku ocasních per a věk samce. Narozdíl od naprosté většiny studií, které se zabývají prekopulačními a postkopulačními znaky odděleně, jsem se pokusila otestovat vliv těchto proměnných současně a podat tak ucelený pohled na faktory ovlivňující reprodukční úspěch samců vlaštovky obecné. Zároveň však byly provedeny i univariátní analýzy. U všech těchto proměnných jsem předpokládala, že by mohly

ovlivňovat celkový reprodukční úspěch (fitness) či jeho složky (párový a mimopárový úspěch). U naší populace vlaštovky obecné nebyl nalezen vliv ani jedné z proměnných na celkový reprodukční úspěch samce. Relativní délka krčku negativně ovlivňovala poměr vlastních a cizích mládřat v hnízdě samce. Testování korelace proměnných na schopnost samce získat mimopárová mládřata ukázalo negativní vliv délky spermií na schopnost získat mimopárové paternity. Zároveň univariátní analýzy prokázaly ještě pozitivní vliv relativní délky krčku na schopnost samce zplodit mimopárová mládřata.

Vliv motility na reprodukční úspěch samců vlaštovky obecné se v případě mé studie nepodařilo prokázat. Stejný výsledek byl zaznamenán u slavíka modráčka (*Luscinia svecica*), kde motilita neovlivňovala reprodukční úspěch samce uvnitř páru, mimo něj, ani celkově (Sætre et al. 2018). Naopak v případě zebřičky pestré (*Taenopygia guttata*) spermie s nejdelším krčem dosahovaly nejvyšší motility a byly také nejúspěšnější ve fertilizaci (Knief et al. 2017, ale Bennison et al. 2016). Dle mého pohledu nedostatek studií zabývajících se vlivem motility na reprodukční úspěch pěvců může vést k mylné představě o vztahu mezi těmito veličinami. V budoucnu je tedy třeba více se zaměřit na otestování vlivu motility spermií na počet mládřat zplozených samcem.

K potvrzení stabilizující selekce na délku spermie jsem testovala nelineární vztah mezi délkou spermie a reprodukčním úspěchem samce. V případě existence stabilizující selekce na délku spermií u vlaštovky obecné jsem předpokládala, že samci s průměrnou délkou spermie budou nejúspěšnější. Tento předpoklad se však nepodařilo potvrdit a nebyl nalezen vztah mezi délkou spermie a reprodukčním úspěchem samců. Dále se v mé studii neprokázal vliv délky krčku ani relativní délky krčku na celkový počet zplozených mládřat. Relativní délka krčku však měla negativní vliv na podíl párových a mimopárových mládřat v hnízdě. Dále byla nalezena negativní korelace mezi délkou spermií a schopností samce získat mimopárová mládřata. Tento výsledek je v souladu s negativní vlivem délky spermií na jejich motilitu, který byl v naší populaci také prokázán. Vliv motility na mimopárové paternity se však v modelu neprokázal. Zároveň univariátní analýzy prokázaly pozitivní korelaci mezi relativní délkou krčku a schopností samce zplodit mimopárová mládřata. Tento výsledek je opačný než v případě vnitropárového úspěchu. Mohlo by se jednat o zdroj stabilizující či disruptivní selekce nebo o zdroj rozdílných selekčních tlaků. Je jisté, že tato problematika vyžaduje další výzkum. Vliv délky spermie jejich částí na celkový počet mládřat nebyl potvrzen ani v případě již zmiňované vlaštovky stromové (*Tachycineta bicolor*, Laskemoen et al. 2010). Délka spermií neměla žádný vliv na reprodukční úspěch samců kachny divoké (*Anas platyrhynchos*, Denk et al. 2005). Stejně tak v již zmiňované studii na

slavíkovi modráčkovi (*Luscinia svecica*) nebyl potvrzen vztah mezi délkou spermií a celkovým reprodukčním úspěchem samců ani jeho komponentami (Sætre et al. 2018). Zajímavý výsledek byl prezentován u modroplátníka nádherného (*Malurus cyaneus*), kde samci s větší hlavičkou a delším flagellem byli úspěšnější v mimopárových kopulacích, ale samci s menší hlavičkou a delším flagellem byli úspěšnější v ochraně paternity ve vlastním hnízdě (Calhim et al. 2010).

Řada studií prokazuje, že množství abnormálních spermií významně ovlivňuje reprodukční úspěch samce (Baldredin 1959; Guzick et al. 2001; Malo et al. 2005; Schmoll & Kleven 2016). Abnormální morfologie ovlivňuje negativně funkčnost spermií a to vede ke snížení úspěchu samců. Vzhledem k nízkému počtu abnormálních spermií v ejakulátech samců jsem testovala v modelech pouze jejich přítomnost/nepřítomnost. Samci, kteří měli alespoň malé zastoupení spermií s abnormální morfologií, neměli nižší reprodukční úspěch než samci bez abnormalit. Absence vlivu byla zřejmě způsobena pouze malým počtem spermií s abnormální morfologií. V ejakulátu samců bylo dostatečné množství kvalitních spermií, aby byli schopni oplodnit vajíčka. Nízký výskyt abnormalit může být způsoben, stejně jako senescence, relativně vysokým kompetičním rizikem, což může vést k produkci ejakulátů o vysoké kvalitě.

Dřívější studie poukazují na párování vlaštovek obecných dle délky ocasních per samců a považují ho za učebnicový příklad selekce. Samci s přirozeně delšími ocasními pery byli úspěšnější v reprodukci a experimentální studie tento vliv potvrzují (Møller & Tegelström 1997; Saino et al. 1997). V mé studii se neprojevil vliv délky ocasních per na mimopárový úspěch samců. Délka ocasu však nemusí ovlivňovat reprodukční úspěch samců v rámci všech populací vlaštovky obecné. Již dříve byly nalezeny rozdíly v selekci na prekopulační znaky vlaštovky obecné mezi poddruhy (viz výše). Je třeba tedy otestovat tento vliv v dalších populacích k objasnění výsledku.

Přestože byl věk samce potvrzen jako prediktor reprodukčního úspěchu v celé řadě pěvčích studiích (např. Wetton et al. 1995; Richardson & Burke 1999; Johnsen et al. 2001; Kleven et al. 2006b; Bitton et al. 2007; Schmoll et al. 2007), v naší populaci vlaštovky obecné se tento předpoklad nepodařilo potvrdit. Nebyl zde nalezen vliv věku na celkový reprodukční úspěch samce, na počet cizích mládřat v hnízdě ani na schopnost získat mimopárová mládřata. U vlaštovky stromové (*Tachycineta bicolor*) věk také neměl žádný vliv na párový úspěch samce, ale mimopárový úspěch pozitivně koreloval s věkem samce (Laskemoen et al. 2010). Stejný výsledek byl nalezen u strnada rákosního (*Emberiza*

*schoeniclus*), kde sice autoři našli i pozitivní vztah mezi věkem samce a jeho schopností uchránit paternitu v hnízdě, tento vztah však nebyl signifikantní (Bouwman et al. 2007).

#### **4.5. Srovnání podváděných a podvádějících samců**

Díky určování paternity v hnízdech jsem měla možnost porovnat mezi sebou podváděné a mimopárové samce v délce spermií, krčku, relativní délce krčku a jejich motilitě v rámci jednotlivých hnízd. Ani jedna z testovaných proměnných však neměla signifikantní vliv na postavení samce. Vzhledem k předchozím výsledkům jsem neočekávala rozdíly v motilitě mezi samci. Korelace mezi relativní délkou krčku a schopností uchránit paternitu ve vlastním hnízdě či získat mimopárová mláďata a mezi délkou spermií a mimopárovou úspěšností se však mohla v testování potenciálně objevit. Skupiny samců se však mezi sebou výrazně nelišily ve velikosti ani motilitě spermií. Stejný výsledek byl nalezen při párovém srovnání podváděných a mimopárových samců u slavíka modráčka (*Luscinia svecica*, Sætre et al. 2018) anebo střízlíka zahradního (*Troglodytes aedon*, Cramer et al. 2013).

Vzhledem k tomu, že se samci nelišili ve velikosti ani motilitě spermií, je možné, že měli výrazně odlišný genotyp a samice dle něho vybírala spermie, kterými oplodní svá vajíčka (např. Richardson et al. 2005; Thuman & Griffith 2005; ale Promerová et al. 2011). V tom případě by se u vlaštovky obecné spíše uplatňovala skrytá volba samice než kompetice spermií. Tento předpoklad však zatím nebyl otestován.

#### **4.6. Vliv samičího prostředí na motilitu spermií**

Dále jsem testovala i druhou složku postkopulační selekce - skrytou volbu samice. V této části práce jsem srovnávala motilitu v samičím prostředí konspecifických a heterospecifických samic a neutrálním prostředí. Předpokládala jsem, že samice ovlivňuje motilitu spermií v reprodukčním traktu pomocí proteinů ve prospěch konspecifického samce. V tom případě by spermie samců z Třeboňské populace měly lépe plavat v tekutinách odebraných z reprodukčního traktu třeboňských samic v porovnání s motilitou v tekutinách odebraných z vlaštovky obecné ze severoamerické populace. Tento výsledek by podporoval možnou účast skryté volby samice při vzniku reprodukčních bariér a speciaci druhů.

Motilita spermií byla signifikantně lepší v obou typech samičího prostředí než v neutrálním mediu. Spermie plavaly rychleji v samičím prostředí než v neutrálním mediu.

Opačný výsledek byl nalezen v dřívější studii na vlaštovkách obecných (Møller et al. 2008). V pozdější studii bylo prokázáno, že spermie starších samců plavaly lépe v samičím prostředí, zatímco mladší samci měli lepší motilitu v neutrálním mediu (Møller et al. 2009). Rozporuplnost výsledků může být způsobena výběrem populace. Skrytá volba samice nemusí působit ve všech populacích stejnou měrou. Stejně jako bylo prokázáno, že se míra kompetice spermií liší v jednotlivých populacích tohoto druhu (Smith & Boag 1991; Møller & Tegelström 1997; Saino et al. 1997; Møller et al. 2003; Kleven et al. 2006a).

Srovnávání motility v tekutinách heterospecifických a konspecifických samic ukázalo, že spermie českých samců neplavaly rozdílně v prostředí českých a amerických samic. Samice tedy nezvýhodňuje spermie konspecifického samce skrze motilitu. Signifikantní rozdíl nebyl nalezen ani při porovnávání dvou poddruhů slavíka modráčka (*Luscinia svecica svecica* a *L. s. namnetum*, Cramer et al. 2016) či při porovnávání motility u blízce příbuzných druhů (Cramer et al. 2014; 2016). Výsledky mé a předchozích studií tedy nepotvrzují skrytou volbu samice skrze ovlivnění motility jednotlivých spermiích. Přestože bylo prokázáno, že samičí reprodukční trakt může ovlivňovat funkčnost spermií a podílet se tak na vytváření reprodukční bariery mezi druhy při speciaci. Náš modelový systém nevykazoval náznak speciace v podobě snížení motility v samičím prostředí heterospecifické samice. Tato problematika by však měla být studována spíše v kontaktních zónách poddruhů a druhů. Takový výzkum by významně přispěl k pochopení problematiky.



## 5. Závěr

Ve své diplomové práci jsem se pokusila podat ucelenou představu o morfologii spermií vlašťovky obecné a o vlivu postkopulační selekce (kompetice spermií a skryté volby samice) na fenotyp spermií. Vlašťovka obecná je pro studium postkopulační selekce v mnoha směrech ideálním modelovým druhem díky způsobu hnízdění, přístupnosti hnízd a zastoupení mimopárových kopulací a paternit. Z výsledku diplomové práce lze vyvodit tyto závěry:

1. Velikost, podíl abnormálních spermií i motilita spermií vlašťovky obecné se vyznačuje značnou meziroční opakovatelností.
2. Spermie vlašťovky obecné se vyznačují nízkým zastoupením abnormalit. Nízký počet abnormálních spermií může souviset s působením postkopulační selekce na fenotyp spermií u tohoto druhu. U druhů s vysokým rizikem kompetice spermií by selekce měla vést k vysoké kvalitě spermií v ejakulátu.
3. V námi sledované populaci vlašťovek věk samce neovlivňoval celkovou délku spermie, relativní délku krčku, motilitu ani přítomnost abnormálních spermií v ejakulátu samce. Byla však nalezena negativní korelace délky krčku s věkem samce. Nízký výskyt senescence může opět souviset s existencí postkopulační selekce u tohoto druhu či s naší neschopností zahrnout do vzorku skutečně staré jedince.
4. Motilita pozitivně korelovala s relativní délkou krčku a byla negativně ovlivněna celkovou délkou spermie.
5. Reprodukční úspěch samce, vnitropárový úspěch ani schopnost získat mimopárová mláďata nebyla ovlivněna motilitou, přítomností abnormálních spermií v ejakulátu, délkou rýdovacích per ani věkem.
6. Vnitropárová paternita souvisela negativně s relativní délkou krčku spermie.
7. Schopnost samce uspět v mimopárových kopulacích byla negativně ovlivněna celkovou délkou spermie. Tento výsledek podtrhuje nalezený negativní vztah mezi délkou spermií a jejich motilitou. Zároveň byl prokázán pozitivní vliv relativní délky krčku na schopnost samce zplodit mimopárová mláďata.

8. Vliv stabilizující selekce na délku spermií se nepodařilo prokázat. Nebyl nalezen nelineární vztah mezi délkou spermie a reprodukčním úspěchem samců.
9. Podvádění a mimopároví samci se v rámci hnízd nelišili ve velikosti spermií ani v jejich motilitě.
10. Nebyl prokázán vliv skryté volby samice na motilitu spermií. Motilita spermií v samičím prostředí se výrazně lišila od motility v neutrálním mediu. Zároveň však nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi motilitou spermií v tekutinách konspecifických a hetespecifických samic.

Vzhledem k rozporuplnosti některých výsledků ve srovnání s předchozími studii by bylo vhodné pokračovat ve studiu vlivu postkopulační selekce na fenotyp spermií nejen u vlaštovky obecné, ale i u dalších volně žijících populací pěvců.

## 6. Literatura

- Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T., & Hoshi, H. (1995). Bovine oviduct - specific glycoprotein: A potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 42(2), 226–232.
- Albrecht, T., Kleven, O., Kreisinger, J., Laskemoen, T., Omotoriogun, T. C., Ottosson, U., Reif, J., Sedláček, O., Hořák, D., Robertson, R. J., & Lifjeld, J. T. (2013). Sperm competition in tropical versus temperate zone birds Sperm competition in tropical versus temperate zone birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1752).
- Albrecht, T., Schnitzer, J., Kreisinger, J., Exnerová, A., Bryja, J., & Munclinger, P. (2007). Extrapair paternity and the opportunity for sexual selection in long-distant migratory passerines. *Behavioral Ecology*, 18(2), 477–486.
- Albrecht, T., Vinkler, M., Schnitzer, J., Poláková, R., Munclinger, P., & Bryja, J. (2009). Extra-pair fertilizations contribute to selection on secondary male ornamentation in a socially monogamous passerine. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(10), 2020–2030.
- Alcaide, M., Rodríguez, A., Negro, J. J., & Serrano, D. (2012). Male transmission ratio distortion supports MHC-linked cryptic female choice in the lesser kestrel (Aves: Falconidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(11), 1467–1473.
- Aldridge, R. D. (1992). Oviductal anatomy and seasonal sperm storage in the southeastern crowned snake (*Tantilla coronata*). *Copeia*, (4), 1103–1106.
- Alonzo, S. H., Stiver, K. A., & Marsh-Rollo, S. E. (2016). Ovarian fluid allows directional cryptic female choice despite external fertilization. *Nature Communications*, 7.
- Anderson, M. J., & Dixson, A. F. (2002). Motility and the mipiece in primates. *Nature*, 416, 496.
- Andersson, M. (1994). Sexual selection. Princeton University Press, Princeton
- Andersson, M., & Simmons, L. W. (2006). Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(6), 296–302.
- Aron, S., Lybaert, P., Baudoux, C., Vandervelden, M., & Fournier, D. (2016). Sperm production characteristics vary with level of sperm competition in *Cataglyphis* desert ants. *Functional Ecology*, 30(4), 614–624.
- Baer, B., Schmid-Hempel, P., Høeg, J. T., & Boomsma, J. J. (2003). Sperm length, sperm storage and mating system characteristics in bumblebees. *Insectes Sociaux*, 50(2), 101–108.
- Baker, R. R., & Shackelford, T. K. (2018). A comparison of paternity data and relative testes size as measures of level of sperm competition in the Hominoidea. *American Journal of Physical Anthropology*, 165(3), 421–443.

- Bakst, M. R. (1989). Oviducal storage of spermatozoa in the turkey: Its relevance to artificial insemination technology. *British Poultry Science*, 30(2), 423–429.
- Balbontín, J., de Lope, F., Hermosell, I. G., Mousseau, T. A., & Møller, A. P. (2011). Determinants of age-dependent change in a secondary sexual character. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(2), 440–448.
- Balshine, S., Leach, B. J., Neat, F., Werner, N. Y., & Montgomerie, R. (2001). Sperm size of African cichlids in relation to sperm competition. *Behavioral Ecology*, 12(6), 726–731.
- Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2, 349–368.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. M., & Walker, S. C. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48.
- Bennison, C., Hemmings, N., Brookes, L., Slate, J., & Birkhead, T. (2016). Sperm morphology, adenosine triphosphate (ATP) concentration and swimming velocity: Unexpected relationships in a passerine bird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1837).
- Bennison, C., Hemmings, N., Slate, J., & Birkhead, T. (2015). Long sperm fertilize more eggs in a bird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1799).
- Birkhead, T. R. (1988). Behavioral aspects of sperm competition in birds. *Advances in the Study of Behavior*, 18, 35-72
- Birkhead, T. R. (1998). Cryptic Female Choice: Criteria for Establishing Female Sperm Choice. *Evolution*, 52(4), 1212–1218.
- Birkhead, T. R. (2010). How stupid not to have thought of that: Post-copulatory sexual selection. *Journal of Zoology*, 281(2), 78–93.
- Birkhead, T. R., Atkin, L., & Møller, A. P. (1987). Copulation behavioral of birds. *Behaviour*, 101(1–3), 101–138.
- Birkhead, T. R., Hatchwell, B. J., & Davies, N. B. (1991). Sperm competition and the reproductive organs of the male and female Dunnock *Prunella modularis*. *Ibis*, 133(3), 306–311.
- Birkhead, T. R., Hosken, D. J., & Pitnick, S. (2009). Sperm biology: An evolutionary perspective. Academic press.
- Birkhead, T. R., Hunter, F. M., & Pellatt, J. E. (1989). Sperm competition in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *Animal Behaviour*, 38, 935–950.
- Birkhead, T. R., Chaline, N., Biggins, J. D., Burke, T., & Pizzari, T. (2004). Nontransitivity of paternity in a bird. *Evolution*, 58(2), 416–420. Birkhead, T. R., & Møller, A. P. (1992). Sperm competition in birds: Evolutionary causes and consequences. Academic press, San Diego

- Birkhead, T. R., & Immler, S. (2007). Making sperm: design, quality control and sperm competition. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65(175).
- Birkhead, T. R., & Møller, A. P. (1993). Sexual selection and temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50(4), 295–311.
- Birkhead, T. R., & Møller, A. P. (1998). Sperm competition and sexual selection. Academic press, London.
- Birkhead, T. R., Møller, A. P., & Sutherland, W. J. (1993). Why do females make it so difficult for males to fertilize their eggs? *Journal of Theoretical Biology*, 161, 51–60.
- Birkhead, T. R., Pellat, E. J., Brekke, P., Yeates, R., & Castillo-Juarez, H. (2005). Genetic effects on sperm design in the zebra finch. *Nature*, 434(7031), 383–387.
- Birkhead, T. R., Pellatt, J., & Hunter, F. M. (1988). Extra-pair copulation and sperm competition in the zebra finch. *Nature*, 334, 60–62.
- Birkhead, T. R., Pellatt, J. E., & Hunter, F. M. (1990). Numbers and Distribution of Sperm in the Uterovaginal Sperm Storage Tubules of the Zebra Finch. *The Condor*, 92(2), 508–516.
- Birkhead, T. R., & Pizzari, T. (2002). Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics*, 3(4), 262–273.
- Bishop, J. D. D. (1996). Female control of paternity in the internally fertilizing compound ascidian *Diplosoma listerianum*. I. Autoradiographic investigation of sperm movements in the female reproductive tract. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 263, 369–376.
- Bitton, P. P., O'Brien, E. L., & Dawson, R. D. (2007). Plumage brightness and age predict extrapair fertilization success of male tree swallows, *Tachycineta bicolor*. *Animal Behaviour*, 74(6), 1777–1784.
- Blottner, S., Hingst, O., & Meyer, H. H. D. (1996). Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 108, 299–305.
- Bobr, L. W., Lorenz, F. W., & Ogasawara, F. X. (1964a). Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. I. Residence sites of spermatozoa in fowl oviducts. *Journal of Reproduction and Fertility*, 8, 39–47.
- Bobr, L. W., Ogasawara, F. X., & Lorenz, F. W. (1964b). Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. II. Transport of spermatozoa in the fowl oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, 8, 49–58.
- Bollinger, E. K., & Gavin, T. A. (1991). Patterns of Extra Pair Fertilizations in Bobolinks. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 29(1), 1–7.

- Boschetto, C., Gasparini, C., & Pilastro, A. (2011). Sperm number and velocity affect sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *65*(4), 813–821.
- Bouwman, K. M., van Dijk, R. E., Wijmenga, J. J., & Komdeur, J. (2007). Older male reed buntings are more successful at gaining extrapair fertilizations. *Animal Behaviour*, *73*(1), 15–27.
- Bowers, E. K., Forsman, A. M., Masters, B. S., Johnson, B. G. P., Johnson, L. S., Sakaluk, S. K., & Thompson, C. F. (2015). Increased extra-pair paternity in broods of aging males and enhanced recruitment of extra-pair young in a migratory bird. *Evolution*, *69*(9), 2533–2541.
- Briskie, J. V., & Montgomerie, R. (1992). Sperm size and sperm competition in birds. *Proceedings: Biological Sciences*, *247*(1319), 89–95.
- Briskie, J. V., & Montgomerie, R. (1993). Patterns of Sperm Storage in Relation to Sperm Competition in Passerine Birds. *The Condor*, *95*(2), 442–454.
- Briskie, J. V., Montgomerie, R., & Birkhead, T. R. (1997). The evolution of sperm size in birds. *Evolution*, *51*(3), 937–945.
- Burness, G., Casselman, S. J., Schulte-Hostedde, A. I., Moyes, C. D., & Montgomerie, R. (2004). Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *56*(1), 65–70.
- Byrne, P. G. (2004). Male sperm expenditure under sperm competition risk and intensity in quacking frogs. *Behavioral Ecology*, *15*(5), 857–863.
- Byrne, P. G., Simmons, L. W., & Dale Roberts, J. (2003). Sperm competition and the evolution of gamete morphology in frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *270*(1528), 2079–2086.
- Calhim, S., Double, M. C., Margraf, N., Birkhead, T. R., & Cockburn, A. (2011). Maintenance of sperm variation in a highly promiscuous wild bird. *PLoS ONE*, *6*(12).
- Calhim, S., Immler, S., & Birkhead, T. R. (2007). Postcopulatory sexual selection is associated with reduced variation in sperm morphology. *PLoS ONE*, *2*(5).
- Cardullo, R. A., & Baltz, J. M. (1991). Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cytoskeleton*, *19*(3), 180–188.
- Clark, A. G., Begun, D. J., & Prout, T. (1999). Female x male interaction in *Drosophila* sperm competition. *Science*, *283*(5399), 217–220.
- Clutton-Brock, T. H. (1988). Reproductive success: Studies of individual variation in contrasting breeding systems. University of Chicago Press, Chicago.

- Conrad, K. F., Robertson, R. J., & Boag, P. (1998). Frequency of Extrapair Young Increases in Second Broods of Eastern Phoebes. *American Ornithological Society*, *115*(2), 497–502.
- Costanzo, A., Ambrosini, R., Caprioli, M., Gatti, E., Parolini, M., Canova, L., Rubolini, D., Romano, A., Gianfranceschi, L., & Saino, N. (2017). Lifetime reproductive success, selection on lifespan, and multiple sexual ornaments in male European barn swallows. *Evolution*, *71*(10), 2457–2468.
- Cramer, E. R. A., Ålund, M., McFarlane, S. E., Johnsen, A., & Qvarnström, A. (2016a). Females discriminate against heterospecific sperm in a natural hybrid zone. *Evolution*, *70*(8), 1844–1855.
- Cramer, E. R. A., Laskemoen, T., Eroukhmanoff, F., Haas, F., Hermansen, J. S., Lifjeld, J. T., Rowe, M., Sætre, G., & Johnsen, A. (2014). Testing a post-copulatory pre-zygotic reproductive barrier in a passerine species pair. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *68*(7), 1133–1144.
- Cramer, E. R. A., Laskemoen, T., Kleven, O., LaBarbera, K., Lovette, I. J., & Lifjeld, J. T. (2013). No evidence that sperm morphology predicts paternity success in wild house wrens. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *67*(11), 1845–1853.
- Cramer, E. R. A., Laskemoen, T., Stensrud, E., Rowe, M., Haas, F., Lifjeld, J. T., Sætre, G., & Johnsen, A. (2015). Morphology-function relationships and repeatability in the sperm of Passer sparrows. *Journal of Morphology*, *276*(4), 370–377.
- Cramer, E. R. A., Stensrud, E., Marthinsen, G., Hogner, S., Johannessen, L. E., Laskemoen, T., Eybert, M., Slagsvold, T., Lifjeld, J. T., & Johnsen, A. (2016b). Sperm performance in conspecific and heterospecific female fluid. *Ecology and Evolution*, *6*(5), 1363–1377.
- Crawley, M. J. (2012). *The R book*. John Wiley & Sons.
- Darwin, C. R. (1871). *The descent of man*. London
- Dean, R., Bonsall, M. B., & Pizzari, T. (2007). Aging and sexual conflict. *Science*, *316*, 383–384.
- Denk, A. G., Holzmann, A., Peters, A., Vermeirssen, E. L. M., & Kempenaers, B. (2005). Paternity in mallards: Effects of sperm quality and female sperm selection for inbreeding avoidance. *Behavioral Ecology*, *16*(5), 825–833.
- delBarco-Trillo, J., & Ferkin, M. H. (2004). Male mammals respond to a risk of sperm competition conveyed by odours of conspecific males. *Nature*, *431*, 446–449.
- delBarco-Trillo, J., Tourmente, M., Varea-Sánchez, M., & Roldan, E. R. S. (2018). Is male reproductive senescence minimized in *Mus* species with high levels of sperm competition? *Biological Journal of the Linnean Society*, *123*(2), 463–470.

- Donoghue, A. M., Sonstegard, T. S., King, L. M., Smith, E. J., Burt, D. W., Birkhead, T., ... Froman, D. (1999). Turkey sperm mobility influences paternity in the context of competitive fertilization. *Biology of Reproduction*, *61*(2), 422–427.
- Drobnis, E. Z., & Overstreet, J. W. (1992). Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, *14*, 1–45.
- Durrant, B. S., Millard, S. E., Zimmermann, D. M., & Lindburg, D. G. (2001). Lifetime semen production in a cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Zoo Biology*, *20*, 359–366.
- Dybas, L. K., & Dybas, H. S. (1981). Coadaptation and Taxonomic Differentiation of Sperm and Spermathecae in Featherwing Beetles. *Evolution*, *35*(1), 168–174.
- Eberhard, W. G. (1996). *Female control: Sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, Princeton
- Eberhard, W. G., & Cordero, C. (1995). Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products - a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. *Trends in Ecology & Evolution*, *10*(12), 493–496.
- Edme, A., Munclinger, P., & Krist, M. (2016). Female collared flycatchers choose neighbouring and older extra-pair partners from the pool of males around their nests. *Journal of Avian Biology*, *47*(4), 552–562.
- Edme, A., Zobač, P., Opatová, P., Šplíchalová, P., Munclinger, P., Albrecht, T., & Krist, M. (2017). Do ornaments, arrival date, and sperm size influence mating and paternity success in the collared flycatcher? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *71*(1).
- Elliott, R. M. A., Lloyd, R. E., Fazeli, A., Sostaric, E., Georgiou, A. S., Satake, N., Watson, P. F., & Holt, W. V. (2009). Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. *Reproduction*, *137*(2), 191–203.
- Fetterolf, P. M., Jurisicova, A., Tyson, J. E., & Casper, R. F. (1994). Conditioned medium from human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity. *Biology of Reproduction*, *51*(2), 184–192.
- Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2010). Competition drives cooperation among closely related sperm of deer mice. *Nature*, *463*(7282), 801–803.
- Fisher, H. S., Jacobs-Palmer, E., Lassance, J. M., & Hoekstra, H. E. (2016). The genetic basis and fitness consequences of sperm midpiece size in deer mice. *Nature Communications*, *7*.
- Firman, R. C., & Simmons, L. W. (2010). Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice. *Biology Letters*, *6*(4), 513–516.
- Fitzpatrick, J. L., & Baer, B. (2016). Polyandry reduces sperm length variation in social insects. *Evolution*, *65*(10), 3006–3012.



- Fitzpatrick, J. L., Montgomerie, R., Desjardins, J. K., Stiver, K. A., Kolm, N., & Balshine, S. (2009). Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(4), 1128–1132.
- Froman, D., & Feltmann, A. J. (1998). Sperm mobility: a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction*, *58*, 379–384.
- Gage, M. J. G. (1991). Risk of sperm competition directly affects ejaculate size in the Mediterranean fruit fly. *Animal Behaviour*, *42*(6), 1036–1037.
- Gage, M. J. G. (1994). Associations between body size, mating pattern, testis size and sperm lengths across butterflies. *Proceedings: Biological Sciences*, *258*(1353), 247–254.
- Gage, M. J. G., & Freckleton, R. P. (2003). Relative testis size and sperm morphometry across mammals: no evidence for an association between sperm competition and sperm length. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *270*(1515), 625–632.
- García-González, F., & Simmons, L. W. (2007). Shorter sperm confer higher competitive fertilization success. *Evolution*, *61*(4), 816–824.
- Gasparini, C., & Pilastro, A. (2011). Cryptic female preference for genetically unrelated males is mediated by ovarian fluid in the guppy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *278*(1717), 2495–2501.
- Gasparini, C., Simmons, L. W., Beveridge, M., & Evans, J. P. (2010). Sperm swimming velocity predicts competitive fertilization success in the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *PLoS ONE*, *5*(8).
- Gil, D., Slater, P. J. B., & Graves, J. A. (2007). Extra-pair paternity and song characteristics in the willow warbler *Phylloscopus trochilus*. *Journal of Avian Biology*, *38*(3), 291–297.
- Goodrich-Smith, M. A., & Marquez, B. J. (1978). Estimation of numbers of sperm storage tubules located at uterovaginal junction in turkey oviduct. *Poultry Science*, *57*(4), 1139
- Gomendio, M., & Roldan, E. R. S. (1991). Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, *243*(1308), 181–185.
- Gomendio, M., & Roldan, E. R. S. (1993). Mechanisms of sperm competition: Linking physiology and behavioural ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, *8*(3), 95–100.
- Griffith, S. C., Owens, I. P. F., & Thuman, K. A. (2002). Extra pair paternity in birds: A review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology*, *11*(11), 2195–2212.
- Grunst, A. S., & Grunst, M. L. (2014). Multiple sexual pigments, assortative social pairing, and genetic paternity in the yellow warbler (*Setophaga petechia*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *68*(9), 1451–1463.

- Guzick, D. S., Overstreet, J. W., Factor-Litvak, P., Brazil, C. K., Nakajima, S. T., Coutifaris, C., Carson, S. A., Cisneros, P., Steinkampf, M. P., Hill, J. A., Xu, D., & Vogel, D. L. (2001). Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New England Journal of Medicine*, *345*(19), 1388–1393.
- Hamilton, W. D. (1966). The moulding of senescence by natural selection. *Journal of Theoretical Biology*, *12*(1), 12–45.
- Helfenstein, F., Podevin, M., & Richner, H. (2010). Sperm morphology, swimming velocity, and longevity in the house sparrow *Passer domesticus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *64*(4), 557–565.
- Helfenstein, F., Szép, T., Nagy, Z., Kempenaers, B., & Wagner, R. H. (2008). Between-male variation in sperm size, velocity and longevity in sand martins *Riparia riparia*. *Journal of Avian Biology*, *39*(6), 647–652.
- Hemberger, M. Y., Hospes, R., & Bostedt, H. (2001). Semen collection, examination and spermogram in ostriches. *Reproduction in Domestic Animals*, *36*, 241–243.
- Hemmings, N., & Birkhead, T. (2017). Differential sperm storage by female zebra finches *Taeniopygia guttata*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *284*(1860).
- Henley, C., Feduccia, A., & Costello, D. P. (1978). Oscine spermatozoa: a light- and electron-microscopy study. *Condor*, *80*, 41–48.
- Hermosell, I. G., Laskemoen, T., Rowe, M., Møller, A. P., Mousseau, T. A., Albrecht, T., & Lifjeld, J. T. (2013). Patterns of sperm damage in Chernobyl passerine birds suggest a trade-off between sperm length and integrity. *Biology Letters*, *9*(5).
- Hoset, K. S., Espmark, Y., Fosøy, F., Stokke, B. G., Jensen, H., Wedege, M. I., & Moksnes, A. (2014). Extra-pair paternity in relation to regional and local climate in an Arctic-breeding passerine. *Polar Biology*, *37*(1), 89–97.
- Hosken, D. J. (1997). Sperm competition in bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *264*(1380), 385–392.
- Hsu, Y. H., Schroeder, J., Winney, I., Burke, T., & Nakagawa, S. (2015). Are extra-pair males different from cuckolded males? A case study and a meta-analytic examination. *Molecular Ecology*, *24*(7), 1558–1571.
- Hsu, Y.-H., Simons, M. J. P., Schroeder, J., Girndt, A., Winney, I. S., Burke, T., & Nakagawa, S. (2017). Age-dependent trajectories differ between within-pair and extra-pair paternity success. *Journal of Evolutionary Biology*, *39*, 951–959.
- Humphreys, P. N. (1972). Brief observation on the semen and spermatozoa of certain passerine and non-passerine birds. *Journal of Reproduction and Fertility*, *29*(3), 327–336.

- Hunter, F. M., & Birkhead, T. R. (2002). Sperm viability and sperm competition in insects. *Current Biology*, *12*(2), 121–123.
- Hunter, F. M., Burke, T., & Watts, S. E. (1992). Frequent copulation as a method of paternity assurance in the northern fulmar. *Animal Behaviour*, *44*, 149–156.
- Huxley, J. S. (1912). A "disharmony" in the reproductive habits of the wild duck (*Anas boschas*, L.). *Biologisches Zentralblatt*, *32*, 621–623.
- Chemes, H. E., & Rawe, V. Y. (2010). The making of abnormal spermatozoa: Cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis. *Cell and Tissue Research*, *341*(3), 349–357.
- Immler, S., & Birkhead, T. R. (2007). Sperm competition and sperm midpiece size: no consistent pattern in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *274*(1609), 561–568.
- Immler, S., Calhim, S., & Birkhead, T. R. (2008). Increased postcopulatory sexual selection reduces the intramale variation in sperm design. *Evolution*, *62*(6), 1538–1543.
- Immler, S., Moore, H. D. M., Breed, W. G., & Birkhead, T. R. (2007). By hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm. *PLoS ONE*, *2*(1), 1–5.
- Immler, S., Pryke, S. R., Birkhead, T. R., & Griffith, S. C. (2010). Pronounced within-individual plasticity in sperm morphometry across social environments. *Evolution*, *64*(6), 1634–1643.
- Jamieson, B. G. M. (2007). Reproductive biology and phylogeny of birds. Science Publishers.
- Jennions, M. D., & Passmore, N. (1993). Sperm competition in frogs: testis size and a 'sterile male' experiment on *Chiromantis xerampelina* (Rhacophoridae). *Biological Journal of the Linnean Society*, *50*(3), 211–220.
- Johnsen, A., Lifjeld, J. T., Andersson, S., Örnborg, J., & Amundsen, T. (2001). Male characteristics and fertilisation success in bluethroats. *Behaviour*, *138*(11–12), 1371–1390.
- Johnson, D. D. P., & Briskie, J. V. (1999). Sperm Competition and Sperm Length in Shorebirds. *The Condor*, *101*(4), 848–854.
- Jones, T. M., Balmford, A., & Quinnell, R. J. (2000). Adaptive female choice for middle-aged mates in a lekking sand fly. *Proceedings of the Royal Society B*, *267*(1444), 681–686.
- Kamar, G. A. R., & Badreldin, A. L. (1959). Seasonal Variations in Semen Characteristics of Adult Fayomi Cocks. *Poultry Science*, *38*(2), 301–315.
- Kamar, G. A. R., & Rizik, M. A. A. (1972). Semen characteristics of two breeds of turkeys. *Journal of Reproduction and Fertility*, *29*, 317–325.

- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, *16*(5), 1099–1106.
- Kenagy, A. G. J., & Trombulak, S. C. (1986). Size and Function of Mammalian Testes in Relation to Body Size. *American Society of Mammalogists*, *67*(1), 1–22.
- Kim, K. W., Bennison, C., Hemmings, N., Brookes, L., Hurley, L. L., Griffith, S. C., Burke, T., Birkhead, T. R., & Slate, J. (2017). A sex-linked supergene controls sperm morphology and swimming speed in a songbird. *Nature Ecology and Evolution*, *1*(8), 1168–1176.
- King, L. M., Brillard, J. P., Garrett, W. M., Bakst, M. R., & Donoghue, A. M. (2002). Segregation of spermatozoa within sperm storage tubules of fowl and turkey hens. *Reproduction*, *123*(1), 79–86.
- Kirkwood, T. B. L., & Austad, S. N. (2000). Why do we age? *Nature*, *408*(6809), 233–238.
- Kleven, O., Fossøy, F., Laskemoen, T., Robertson, R. J., Rudolfsen, G., & Lifjeld, J. T. (2009a). Comparative evidence for the evolution of sperm swimming speed by sperm competition and female sperm storage duration in passerine birds. *Evolution*, *63*(9), 2466–2473.
- Kleven, O., Jacobsen, F., Izadnegahdar, R., Robertson, R. J., & Lifjeld, J. T. (2006a). Male tail streamer length predicts fertilization success in the North American barn swallow (*Hirundo rustica erythrogaster*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *59*(3), 412–418.
- Kleven, O., Laskemoen, T., Fossøy, F., Robertson, R. J., & Lifjeld, J. T. (2008). Intraspecific variation in sperm length is negatively related to sperm competition in passerine birds. *Evolution*, *62*(2), 494–499.
- Kleven, O., Laskemoen, T., & Lifjeld, J. T. (2009b). Sperm length in sand martins *Riparia riparia*: A comment on Helfenstein et al. *Journal of Avian Biology*, *40*(3), 241–242.
- Kleven, O., Marthinsen, G., & Lifjeld, J. T. (2006b). Male extraterritorial forays, age and paternity in the socially monogamous reed bunting (*Emberiza schoeniclus*). *Journal of Ornithology*, *147*(3), 468–473.
- Knief, U., Forstmeier, W., Pei, Y., Ihle, M., Wang, D., Martin, K., Opatová, P., Albrechtová, J., Wittig, M., Franke, A., Albrecht, T., & Kempnaers, B. (2017). A sex-chromosome inversion causes strong overdominance for sperm traits that affect siring success. *Nature Ecology and Evolution*, *1*(8), 1177–1184.
- Koehler, L. D. (1995). Diversity of avian spermatozoa ultrastructure with emphasis on the members of the order Passeriformes. *Mémoires du Muséum National d'Historie Naturelle*, *166*, 437–444.
- Kojima, W., Kitamura, W., Kitajima, S., Ito, Y., Ueda, K., Fujita, G., & Higuchi, H. (2009). Female barn swallows gain indirect but not direct benefits through social mate choice. *Ethology*, *115*(10), 939–947.

- Korn, N., Thurston, R. J., Pooser, B. P., & Scott, T. R. (2000). Ultrastructure of spermatozoa from Japanese Quail. *Poultry Science*, 79(3), 407–414.
- Lack, D. (1968). Ecological adaptations for breeding in birds. Methuen and Company, London
- LaMunyon, C. W., & Ward, S. (1998). Larger sperm outcompete smaller sperm in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1409), 1997–2002.
- LaMunyon, C. W., & Ward, S. (2002). Evolution of larger sperm in response to experimentally increased sperm competition in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1496), 1125–1128.
- Langen, K., Bakker, T. C. M., Baldauf, S. A., Shrestha, J., & Thünken, T. (2017). Effects of ageing and inbreeding on the reproductive traits in a cichlid fish I: The male perspective. *Biological Journal of the Linnean Society*, 120(4), 752–761.
- Laskemoen, T., Albrecht, T., Bonisoli-Alquati, A., Cepak, J., de Lope, F., Hermosell, I. G., Johannessen, L. E., Kleven, O., Marzal, A., Mousseau, A., Møller, A. P., Robertson, R. J., Rudolfson, G., Saino, N., Vortman, Y., & Lifjeld, J. T. (2013a). Variation in sperm morphometry and sperm competition among barn swallow (*Hirundo rustica*) populations. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67(2), 301–309.
- Laskemoen, T., Kleven, O., Fossøy, F., Robertson, R. J., Rudolfson, G., & Lifjeld, J. T. (2010). Sperm quantity and quality effects on fertilization success in a highly promiscuous passerine, the tree swallow *Tachycineta bicolor*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(9), 1473–1483.
- Laskemoen, T., Kleven, O., Johannessen, L. E., Fossøy, F., Robertson, R. J., & Lifjeld, J. T. (2013b). Repeatability of sperm size and motility within and between seasons in the Barn Swallow (*Hirundo rustica*). *Journal of Ornithology*, 154(4), 955–963.
- Lector, C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1, 78–86.
- Lehtonen, P. K., Primmer, C. R., & Laaksonen, T. (2009). Different traits affect gain of extrapair paternity and loss of paternity in the pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*. *Animal Behaviour*, 77(5), 1103–1110.
- Levitan, D. R., terHorst, C. P., & Fogarty, N. D. (2007). The risk of polyspermy in three congeneric sea urchins and its implications for gametic incompatibility and reproductive isolation. *Evolution*, 61(8), 2007–2014.
- Lifjeld, J. T., Hoenen, A., Johannessen, L. E., Laskemoen, T., Lopes, R. J., Rodrigues, P., & Rowe, M. (2013). The Azores bullfinch (*Pyrrhula murina*) has the same unusual and size-variable sperm morphology as the Eurasian bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 108(3), 677–687.

- Lifjeld, J. T., Laskemoen, T., Kleven, O., Albrecht, T., & Robertson, R. J. (2010). Sperm length variation as a predictor of extrapair paternity in passerine birds. *PLoS ONE*, 5(10), 1–8.
- Lifjeld, J. T., Laskemoen, T., Kleven, O., Pedersen, A. T. M., Lampe, H. M., Rudolfson, G., Schmoll, T., & Slagsvold, T. (2012). No evidence for pre-copulatory sexual selection on sperm length in a passerine bird. *PLoS ONE*, 7(2), 1–5.
- Lloyd, R. E., Elliott, R. M. A., Fazeli, A., Watson, P. F., & Holt, W. V. (2009). Effects of oviductal proteins, including heat shock 70 kDa protein 8, on survival of ram spermatozoa over 48 h in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(3), 408–418.
- Losdat, S., & Helfenstein, F. (2018). Relationships between sperm morphological traits and sperm swimming performance in wild Great Tits (*Parus major*). *Journal of Ornithology*, 159(3), 805–814.
- Lüpold, S., Birkhead, T. R., & Westneat, D. F. (2012). Seasonal variation in ejaculate traits of male red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66, 1607–1617.
- Lüpold, S., Calhim, S., Immler, S., & Birkhead, T. R. (2009a). Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1659), 1175–1181.
- Lüpold, S., Linz, G. M., & Birkhead, T. R. (2009b). Sperm design and variation in the New World blackbirds (*Icteridae*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63(6), 899–909.
- Madsen, T., Shine, R., Loman, J., & Håkansson, T. (1992). Why do female adders copulate so frequently? *Nature*, 355(6359), 440–441.
- Malo, A. F., Garde, J. J., Soler, A. J., García, A. J., Gomendio, M., & Roldan, E. R. S. (2005). Male fertility in natural population of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 72, 822–829.
- Martin, P. A., Reimers, T. J., Lodge, J. R., & Dziuk, P. J. (1974). The effect of ratios and numbers of spermatozoa mixed from two males on proportions of offspring. *Journal of Reproduction and Fertility*, 39(2), 251–258.
- McGraw, K. J., Safran, R. J., Evans, M. R., & Wakamatsu, K. (2004). European barn swallows use melanin pigments to color their feathers brown. *Behavioral Ecology*, 15(5), 889–891.
- McKinney, F., Cheng, K. M., & Bruggers, D. J. (1984). Sperm competition in apparently monogamous birds. In *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*, 523–546, ed. Smith, R. L., Academic Press, London.
- McNutt, T., Rogowski, L., Vasilatos - Younken, R., & Killian, G. (1992). Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation. *Molecular Reproduction and Development*, 33(3), 313–323.

- Møller, A. P. (1989). Ejaculate Quality, Testes Size and Sperm Production in Mammals. *Functional Ecology*, 3(1), 91–96.
- Møller, A. P. (1991). Sperm competition, sperm depletion, paternal care, and relative testis size in birds. *The American Naturalist*, 137(6), 882–906.
- Møller, A. P. (1992). Sexual selection in the monogamous barn swallow (*Hirundo rustica*). II. Mechanisms of sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 45, 603–624.
- Møller, A. P. (1995). Sexual selection in the barn swallow (*Hirundo rustica*). V. Geographic variation in ornament size. *Journal of Evolutionary Biology*, 8(1), 3–19.
- Møller, A. P., Barbosa, A., Cuervo, J. J., de Lope, F., Merino, S., & Saino, N. (1998). Sexual selection and tail streamers in the barn swallow. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 265, 409–414.
- Møller, A. P., & Briskie, J. (1995). Extra-pair paternity, sperm competition and the evolution of testis size in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36(5), 357–365.
- Møller, A. P., Brohede, J., Cuervo, J. J., De Lope, F., & Primmer, C. (2003). Extrapair paternity in relation to sexual ornamentation, arrival date, and condition in a migratory bird. *Behavioral Ecology*, 14(5), 707–712.
- Møller, A. P., Mousseau, T. A., & Rudolfson, G. (2008). Females affect sperm swimming performance: a field experiment with barn swallows *Hirundo rustica*. *Behavioral Ecology*, 19(6), 1343–1350.
- Møller, A. P., Mousseau, T. A., Rudolfson, G., Balbontín, J., Marzal, A., Hermosell, I., & De Lope, F. (2009). Senescent sperm performance in old male birds. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(2), 334–344.
- Møller, A. P., Surai, P., & Mousseau, T. A. (2005). Antioxidants, radiation and mutation as revealed by sperm abnormality in barn swallows from Chernobyl. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272, 247–252.
- Møller, A. P., & Tegelstrom, H. (1997). Extrapair paternity and tail ornamentation in the barn swallow *Hirundo rustica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41(5), 353–360.
- Monfort, S. L., Brown, J. L., Bush, M., Wood, T. C., Wemmer, C., Vargas, A., Williamson, L. R., Montali, R. J., & Wildt, D. E. (1993). Circannual inter-relationship among reproductive hormones, gross morphometry, behaviour, ejaculate characteristics and testicular histology in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 98, 471–480.
- Morales, P., Katz, D. F., Overstreet, J. W., Samuels, S. J., & Chang, R. J. (1988). The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in human semen. *Journal of Andrology*, 9(4), 241–247.
- Morrow, E. H., & Gage, M. J. G. (2000). The evolution of sperm length in moths. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1440), 307–313.

- Morrow, E. H., & Gage, M. J. G. (2001). Consistent significant variation between individual males in spermatozoal morphometry. *Journal of Zoology*, 254(2), 147–153.
- Mossman, J., Slate, J., Humphries, S., & Birkhead, T. (2009). Sperm morphology and velocity are genetically codetermined in the zebra finch. *Evolution*, 63(10), 2730–2737.
- O'Brien, S. J., Roelke, M. E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C. A., Meltzer, D., Colly, L., Evermann, J. F., Bush, M., & Wildt, D. E. (1985). Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*, 227(4693), 1428–1434.
- Opatová, P., Ihle, M., Albrechtová, J., Tomášek, O., Kempenaers, B., Forstmeier, W., & Albrecht, T. (2016). Inbreeding depression of sperm traits in the zebra finch *Taeniopygia guttata*. *Ecology and Evolution*, 6(1), 295–304.
- Parker, G. A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 45(4), 525–567.
- Parker, G. A. (1982). Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. *Journal of Theoretical Biology*, 96, 281–294.
- Parker, G. A. (1984). Sperm competition and the evolution of animal mating strategies. In *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*, 1–60, ed. Smith, R. L., Academic Press, London.
- Parker, G. A. (1990). Sperm competition games: raffles and roles. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 242, 120–126.
- Pasqualotto, F. F., Sobreiro, B. P., Hallak, J., Pasqualotto, E. B., & Lucon, A. M. (2005). Sperm concentration and normal sperm morphology decrease and follicle-stimulating hormone level increases with age. *BJU International*, 96(7), 1087–1091.
- Paul, C., Nagano, M., & Robaire, B. (2011). Aging Results in Differential Regulation of DNA Repair Pathways in Pachytene Spermatocytes in the Brown Norway Rat. *Biology of Reproduction*, 85(6), 1269–1278.
- Penfold, L. M., Wildt, D. E., Herzog, T. L., Lynch, W., Ware, L., Derrickson, S. E., & Monfort, S. L. (2000). Seasonal patterns of LH, testosterone and semen quality in the Northern pintail duck (*Anas acuta*). *Reproduction, Fertility, and Development*, 12, 229–235.
- Perreault, S., Lemon, R. E., & Kuhnlein, U. (1997). Patterns and correlates of extrapair paternity in American redstarts (*Setophaga ruticilla*). *Behavioral Ecology*, 8(6), 612–621.
- Petrželková, A., Michálková, R., Albrechtová, J., Cepák, J., Honza, M., Kreisinger, J., Muclinger, P., Soudková, M., Tomášek, O., & Albrecht, T. (2015). Brood parasitism and quasi-parasitism in the European barn swallow *Hirundo rustica rustica*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69(9), 1405–1414.



- Pitcher, T. E., Dunn, P. O., & Whittingham, L. A. (2005). Sperm competition and the evolution of testes size in birds. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(3), 557–567.
- Pitnick, S. (1996). Investment in testes and the cost of making long sperm in *Drosophila*. *The American Naturalist*, 148(1), 57–80.
- Pitnick, S., & Markow, T. A. (1994). Male gametic strategies: sperm size, testes size, and the allocation of ejaculate among successive mates by the sperm-limited fly *Drosophila Pachea* and its relatives. *The American Naturalist*, 143(5), 785–819.
- Pizzari, T., & Birkhead, T. R. (2000). Female feral fowl eject sperm of subdominant males. *Nature*, 405(6788), 787–789.
- Pizzari, T., Cornwallis, C. K., Løvlie, H., & Birkhead, T. R. (2003). Sophisticated sperm allocation in male fowl. *Nature*, 426, 70–74.
- Pizzari, T., Dean, R., Pacey, A., Moore, H., & Bonsall, M. B. (2008). The evolutionary ecology of pre- and post-meiotic sperm senescence. *Trends in Ecology and Evolution*, 23(3), 131–140.
- Pizzari, T., Lo, H., & Cornwallis, C. K. (2004). Sex-specific, counteracting responses to inbreeding in a bird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1553), 2115–2121.
- Potter, H., & Kramer, C. R. (2000). Ultrastructural observations on sperm storage in the ovary of the platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: Poeciliidae): The role of the duct epithelium. *Journal of Morphology*, 245(2), 110–129.
- Presgraves, D. C., Baker, R. H., & Wilkinson, G. S. (1999). Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1423), 1041.
- Price, C. S. C. (1997). Conspecific sperm precedence in *Drosophila*. *Nature*, 388, 663–666.
- Primmer, C. R., Møller, A. P., & Ellegren, H. (1995). Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Molecular Ecology*, 4(4), 493–498.
- Promerová, M., Vinkler, M., Bryja, J., Poláková, R., Schnitzer, J., Munclinger, P., & Albrecht, T. (2011). Occurrence of extra-pair paternity is connected to social male's MHC-variability in the scarlet rosefinch *Carpodacus erythrinus*. *Journal of Avian Biology*, 42(1), 5–10.
- Ramm, S. A., & Stockley, P. (2007). Ejaculate allocation under varying sperm competition risk in the house mouse, *Mus musculus domesticus*. *Behavioral Ecology*, 18(2), 491–495.
- Reitsma, L. R., Jukosky, J. A., Kimiatek, A. J., Goodnow, M. L., & Hallworth, M. T. (2018). Extra-pair paternity in a long-distance migratory songbird beyond neighbors' borders and across male age classes. *Canadian Journal of Zoology*, 96(1), 49–54.

- Retzius, G. (1909). Die spermien der Voegel. *Biologische Untersuchungen, Neue Folge* 14(10), 98–122.
- Reyer, H. U., Frei, G., & Som, C. (1999). Cryptic female choice: frogs reduce clutch size when amplexed by undesired males. *Proceedings: Biological Sciences*, 266(1433), 2101–7.
- Richardson, D. S., & Burke, T. (2001). Extrapair paternity and variance in reproductive success related to breeding density in Bullock's orioles. *Animal Behaviour*, 62(3), 519–525.
- Richardson, D. S., Komdeur, J., Burke, T., & von Schantz, T. (2005). MHC-based patterns of social and extra-pair mate choice in the Seychelles warbler. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272, 759–767.
- Rijsselaere, T., Maes, D., Hoflack, G., De Kruif, A., & Van Soom, A. (2007). Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne analyser. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(2), 143–148.
- Rosengrave, P., Gemmill, N. J., Metcalf, V., McBride, K., & Montgomerie, R. (2008). A mechanism for cryptic female choice in chinook salmon. *Behavioral Ecology*, 19(6), 1179–1185.
- Rosivall, B., Szöllosi, E., Hasselquist, D., & Török, J. (2009). Effects of extrapair paternity and sex on nestling growth and condition in the collared flycatcher, *Ficedula albicollis*. *Animal Behaviour*, 77(3), 611–617.
- Rowe, M., Griffith, S. C., Hofgaard, A., & Lifjeld, J. T. (2015). Subspecific variation in sperm morphology and performance in the Long-tailed Finch (*Poephila acuticauda*). *Avian Research*, 6(1).
- Rowe, M., Laskemoen, T., Johnsen, A., & Lifjeld, J. T. (2013). Evolution of sperm structure and energetics in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1753).
- Rowe, M., & Pruett-Jones, S. (2011). Sperm competition selects for sperm quantity and quality in the Australian Maluridae. *PLoS ONE*, 6(1).
- Rubenstein, D. R. (2007). Territory quality drives intraspecific patterns of extrapair paternity. *Behavioral Ecology*, 18(6), 1058–1064.
- Rudolfson, G., Figenschou, L., Folstad, I., & Kleven, O. (2008). Sperm velocity influence paternity in the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, 39(2), 212–216.
- Sætre, C. L. C., Johnsen, A., Stensrud, E., & Cramer, E. R. A. (2018). Sperm morphology, sperm motility and paternity success in the bluethroat (*Luscinia svecica*). *PLoS ONE*, 13(3).

- Safran, R. J., Vortman, Y., Jenkins, B. R., Hubbard, J. K., Wilkins, M. R., Bradley, R. J., & Lotem, A. (2016). The maintenance of phenotypic divergence through sexual selection: An experimental study in barn swallows *Hirundo rustica*. *Evolution*, *70*(9), 2074–2084.
- Saino, N., Primmer, C. R., Ellegren, H., & Møller, A. P. (1997). An experimental study of paternity and tail ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Evolution*, *51*(2), 562–570.
- Sakaluk, S. K. (1997). Cryptic female choice predicated on wing dimorphism in decorated crickets. *Behavioral Ecology*, *8*(3), 326–331.
- Sardell, R. J., & DuVal, E. H. (2014). Small and variable sperm sizes suggest low sperm competition despite multiple paternity in a lekking suboscine bird. *The Auk*, *131*(4), 660–671.
- Sasson, D. A., Johnson, S. L., & Brockmann, H. J. (2012). The role of age on sperm traits in the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Animal Behaviour*, *84*(4), 975–981.
- Sever, D. M., Halliday, T., Waights, V., Brown, J., Davies, H. A., & Moriarty, E. C. (1999). Sperm storage in females of the smooth Newt (*Triturus v. vulgaris* L.): I. Ultrastructure of the spermathecae during the breeding season. *Journal of Experimental Zoology*, *283*(1), 51–70.
- Sheldon, B. C., & Ellegren, H. (1999). Sexual selection resulting from extrapair paternity in collared flycatchers. *Animal Behaviour*, *57*(2), 285–298.
- Sheldon, B. C., Merilä, J., Qvarnström, A., Gustafsson, L., & Ellegren, H. (1997). Paternal genetic contribution to offspring condition predicted by size of male secondary sexual character. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *264*, 297–302.
- Schmoll, T., & Kleven, O. (2016). Functional infertility in a wild passerine bird. *Ibis*, *158*, 670–673.
- Schmoll, T., Mund, V., Dietrich-Bischoff, V., Winkel, W., & Lubjuhn, T. (2007). Male age predicts extrapair and total fertilization success in the socially monogamous coal tit. *Behavioral Ecology*, *18*(6), 1073–1081.
- Simmons, L. W., & Siva-Jothy, M. T. (1984). Sperm competition in insects: Mechanisms and the potential for selection. In *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*, 341–434, ed. Smith, R. L., Academic Press, London.
- Siva-Jothy, M. T. (2000). The young sperm gambit. *Ecology Letters*, *3*(3), 172–174.
- Sloter, E., Nath, J., Eskenazi, B., & Wyrobek, A. J. (2004). Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. *Fertility and Sterility*, *81*(4), 925–943.
- Smith, H. G., & Boag, P. T. (1991). DNA fingerprinting reveals relation between tail ornaments and cuckoldry in barn swallows, *Hirundo rustica*. *Behavioral Ecology*, *2*(1), 90–98.

- Soukup, S. S., & Thompson, C. F. (1997). Social mating system affects the frequency of extra-pair paternity in house wrens. *Animal Behaviour*, *54*, 1089–1105.
- Steele, M. G., & Wishart, G. J. (1992). Evidence for a species-specific barrier to sperm transport within the vagina of the chicken hen. *Theriogenology*, *38*(6), 1107–1114.
- Stockley, P., Gage, M. J. G., Parker, G. A., & Moller, A. P. (1996). Female Reproductive Biology and the Coevolution of Ejaculate Characteristics in Fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *263*(1369), 451–458.
- Stoffel, M. A., Nakagawa, S., & Schielzeth, H. (2017). rptR: repeatability estimation and variance decomposition by generalized linear mixed-effects models. *Methods in Ecology and Evolution*, *8*(11), 1639–1644.
- Storrie, M. T., Walker, T. I., Laurenson, L. J., & Hamlett, W. C. (2008). Microscopic organization of the sperm storage tubules in the oviducal gland of the female gummy shark (*Mustelus antarcticus*), with observations on sperm distribution and storage. *Journal of Morphology*, *269*(11), 1308–1324.
- Stutchbury, B. J. M., Piper, W. H., Neudorf, D. L., Tarof, S. A., Rhymer, J. M., Fuller, G., & Fleischer, R. C. (1997). Correlates of Extra-Pair Fertilization Success in Hooded Warblers. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *40*(2), 119–126.
- Syntin, P., & Robaire, B. (2001). Sperm structural and motility changes during aging in the Brown Norway rat. *Journal of Andrology*, *22*(2), 235–244.
- Šandera, M., Albrecht, T., & Stopka, P. (2013). Variation in apical hook length reflects the intensity of sperm competition in murine rodents. *PLoS ONE*, *8*(7).
- Tabatabaei, S., Chaji, M., & Mohammadabadi, T. (2010). Correlation between age of rooster and semen quality in Iranian indigenous broiler breeder chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *9*(1), 195–198.
- Tesarik, J., Oltras, M., & Testar, J. (1990). Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, *88*, 665–675.
- Thornhill, R. (1983). Cryptic Female Choice and Its Implications in the Scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *The American Naturalist*, *122*(6), 765–788.
- Thuman, K. A., & Griffith, S. C. (2005). Genetic similarity and the nonrandom distribution of paternity in a genetically highly polyandrous shorebird. *Animal Behaviour*, *69*(4), 765–770.
- Tomkins, J. L., & Simmons, L. W. (2000). Sperm competition games played by dimorphic male beetles: fertilization gains with equal mating access. *Proceedings: Biological Sciences*, *267*(1452), 1547–1553.
- Tourmente, M., Gomendio, M., & Roldan, E. R. S. (2011). Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evolutionary Biology*, *11*(1), 12.

- Tourmente, M., Rowe, M., González-Barroso, M. M., Rial, E., Gomendio, M., & Roldan, E. R. S. (2013). Postcopulatory sexual selection increases ATP content in rodent spermatozoa. *Evolution*, *67*(6), 1838–1846.
- Tsyusko, O. V., Peters, M. B., Hagen, C., Tuberville, T. D., Mousseau, T. A., Møller, A. P., & Glenn, T. C. (2007). Microsatellite markers isolated from barn swallows (*Hirundo rustica*). *Molecular Ecology Resources*, *7*(5), 833–835.
- Turner, E., & Montgomerie, R. (2002). Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr. *Journal of Fish Biology*, *60*(6), 1570–1579.
- Václav, R., Hoi, H., & Blomqvist, D. (2003). Food supplementation affects extrapair paternity in house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology*, *14*(5), 730–735.
- Varea-Sánchez, M., Montoto, L. G., Tourmente, M., & Roldan, E. R. S. (2014). Postcopulatory sexual selection results in spermatozoa with more uniform head and flagellum sizes in rodents. *PLoS ONE*, *9*(9).
- Varea-Sánchez, M., Tourmente, M., Bastir, M., & Roldan, E. R. S. (2016). Unraveling the sperm bauplan: relationships between sperm head morphology and sperm function in rodents. *Biology of Reproduction*, *95*(1).
- Velando, A., Eiroa, J., & Domínguez, J. (2008). Brainless but not clueless: earthworms boost their ejaculates when they detect fecund non-virgin partners. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *275*(1638), 1067–1072.
- Vladić, T. V., Afzelius, B. A., & Bronnikov, G. E. (2002). Sperm Quality as Reflected Through Morphology in Salmon Alternative Life Histories<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, *66*(1), 98–105.
- Vortman, Y., Lotem, A., Dor, R., Lovette, I., & Safran, R. J. (2013). Multiple sexual signals and behavioral reproductive isolation in a diverging population. *The American Naturalist*, *182*(4), 514–523.
- Wagner, R. H., Helfenstein, F., & Danchin, E. (2004). Female choice of young sperm in a genetically monogamous bird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *271*, 134–137.
- Wagner, R. H., Schug, M. D., & Morton, E. S. (1996). Condition-dependent control of paternity by female purple martins: implication for coloniality. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *38*(6), 379–389.
- Ward, P. I. (2000). Cryptic Female Choice in the Yellow Dung Fly *Scathophaga stercoraria* (L.). *Evolution*, *54*(5), 1680–1686.
- Webster, M. S., Pruett-Jones, S., Westneat, D. F., & Arnold, S. J. (1995). Measuring the effects of pairing success, extra-pair copulations and mate quality on the opportunity for sexual selection. *Evolution*, *49*(6), 1147–1157.

- Wedell, N., & Cook, P. A. (1999). Butterflies tailor their ejaculate in response to sperm competition risk and intensity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1423), 1033–1039.
- Westneat, D. F., & Webster, M. S. (1994). Molecular analysis of kinship in birds: interesting questions and useful techniques. In *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*, 91–126, ed. Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P., & DeSalle R., Birhauser Verlag, Basel.
- Wetton, J. H., Burke, T., Parkin, D. T., & Cairns, E. (1995). Single-locus DNA fingerprinting reveals that male reproductive success increases with age through extra-pair paternity in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 260, 91–98.
- Wildt, D. E., Bush, M., Howard, J. G., O'Brien, S. J., Meltzer, D., Van Dyk, A., Ebedes, H., & Brand, D. J. (1983). Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 29, 1019–1025.
- Wilson, N., Tubman, S., Eady, P., & Robertson, G. (1997). Female genotype affects male success in sperm competition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264(1387), 1491–1495.
- Wolf, K. N., Wildt, D. E., Vargas, A., Marinari, P. E., Kreeger, J. S., Ottinger, M. A., & Howard, J. G. (2000). Age-dependent changes in sperm production, semen quality, and testicular volume in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*). *Biology of Reproduction*, 63, 179–187.
- Wolfson, A. (1952). The cloacal protuberance: A means for determining breeding condition in live male passerines. *Bird-Banding*, 23(4), 159-165.
- Yániz, J. L., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., & Mullins, K. J. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *The Anatomical Record*, 260, 268–278.
- Yeates, S. E., Diamond, S. E., Einum, S., Emerson, B. C., Holt, W. V., & Gage, M. J. G. (2013). Cryptic choice of conspecific sperm controlled by the impact of ovarian fluid on sperm swimming behavior. *Evolution*, 67(12), 3523–3536.
- Zahavi, A. (1975). Mate selection-A selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, 53(1), 205–214.

## 7. Přílohy

*Tabulka S1. Výsledky univariátních analýz vlivu proměnných na reprodukční úspěch samců*

Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	z	p
VCL	-0,033	0,038	-0,875	0,382
Celková délka spermie (lineární)	-0,105	0,484	-0,217	0,828
Celková délka spermie (polynom)	0,759	0,475	1,598	0,110
Délka krčku (lineární)	-0,324	0,515	-0,629	0,530
Délka krčku (polynom)	-0,451	0,533	-0,846	0,398
Rel. délka krčku	-0,018	0,038	-0,471	0,638
Přítomnost abnormálních spermií	-0,039	0,084	-0,471	0,638
Délka ocasních per	0,014	0,038	0,370	0,712
Věk	0,040	0,037	1,054	0,292

*Tabulka S2. Výsledky univariátních analýz vlivu proměnných na poměr vlastních a cizích mláďat v hnízdě samců*

Proměnná	Sklon	SE <sup>1</sup>	z	p
VCL	-0,040	0,123	-0,328	0,743
Celková délka spermie (lineární)	2,560	1,650	1,551	0,121
Celková délka spermie (polynom)	0,094	1,572	0,060	0,952
Délka krčku (lineární)	-2,160	1,657	-1,303	0,192
Délka krčku (polynom)	-0,180	1,681	-0,107	0,915
Rel. délka krčku	-0,261	0,125	-2,096	0,036*
Přítomnost abnormálních spermií	-0,108	0,262	-0,413	0,679
Délka ocasních per	0,097	0,125	0,774	0,439
Věk	0,032	0,115	0,277	0,782

*Tabulka S3. Výsledky univariátních analýz vlivu proměných na schopnost samce uspět v mimopárových kopulacích*

<b>Proměnná</b>	<b>Sklon</b>	<b>SE<sup>1</sup></b>	<b>z</b>	<b>p</b>
<b>VCL</b>	0,026	0,161	0,159	0,874
<b>Celková délka spermie (lineární)</b>	-5,725	2,258	-2,536	0,011*
<b>Celková délka spermie (polynom)</b>	1,491	2,247	0,664	0,507
<b>Délka krčku (lineární)</b>	3,362	2,416	1,391	0,164
<b>Délka krčku (polynom)</b>	-1,466	2,769	-0,530	0,596
<b>Rel. délka krčku</b>	0,473	0,178	2,659	0,008*
<b>Přítomnost abnormálních spermií</b>	0,121	0,357	0,338	0,736
<b>Délka ocasních per</b>	-0,093	0,161	-0,575	0,565
<b>Věk</b>	0,198	0,146	1,358	0,174