

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Markéta Šárová

**Morfologie a motilita spermií u astrildovitých pěvců rodu *Lonchura***

**Sperm morphology and motility in estrildid finches of the genus *Lonchura***

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Radka Reifová, Ph.D.

Konzultant: Prof. Doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Praha, 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a 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: \_\_\_\_\_

Markéta Šárová

## **Poděkování**

Největší poděkování patří mé školitelce Radce Reifové za její cenné rady, připomínky a hlavně trpělivost při psaní mé diplomové práce. Ráda bych poděkovala také Tomášovi Albrechtovi za pomoc při samplování jedinců a zasvěcení do praktické části výzkumu. Ondrovi Kauzálovi děkuji za rady a poskytování informací ohledně panenek a pomoc při odebrání spermií. Velké díky patří hlavně mé rodině, která se mnou měla trpělivost po dobu psaní mé diplomové práce, a po celou dobu studia mě motivovala a podporovala, jak jen to šlo.

## Abstrakt

Pohlavní výběr hraje významnou roli v evoluci živočichů. Dnes již víme, že neprobíhá pouze před kopulací (prekopulační pohlavní výběr), ale také po kopulaci. Tento typ pohlavního výběru nazýváme postkopulační pohlavní výběr, a uplatňuje se převážně u promiskuitních druhů, kde se samice páří s více samci. V takovém případě dochází v samičím reprodukčním traktu ke kompetici spermií. Aby si samci zvýšili pravděpodobnost svého reprodukčního úspěchu, začali si vytvářet překvapivě rozmanité adaptace spermií na morfologické, fyziologické nebo behaviorální úrovni. Tyto adaptace často ovlivňují rychlost spermie (motilitu), která je klíčovým faktorem pro úspěšné oplození vajíčka. Avšak výsledek reprodukčního úspěchu mohou ovlivnit i samice, které mohou v procesu skryté volby samice upřednostňovat spermie s určitým fenotypem, a tím např. získat lepší geny pro potomky. U některých druhů mají samice dokonce schopnost třídít a ukládat spermie do specializovaných orgánů, ve kterých jsou nějakou dobu vyživovány, a následně jsou použity k oplození vajíčka. I v tomto případě často o uskladnění spermie rozhoduje její morfologie. Kvůli těmto mechanismům postkopulačního pohlavního výběru jsou spermie pod silným selekčním tlakem, který může vést k relativně rychlé divergenci v morfologii spermií mezi druhy a následně speciaci. Cílem této práce je prozkoumat morfologii a motilitu spermií u několika blízce příbuzných astrildovitých pěvců rodu *Lonchura*. Na základě analýzy morfologie spermií jsme zjistili, že se jednotlivé druhy liší v délce hlavičky a krčku spermie. Bičík a celková délka spermie se mezi druhy neliší. Jelikož motilita se mezi jednotlivými druhy významně lišila, prověřovali jsme vztah mezi motilitou a morfologií spermií. Výsledky však žádnou vzájemnou závislost nepotvrdily, což mohlo být ovlivněno malým počtem vzorků u některých druhů. Na základě míry variability celkové délky spermie mezi jedinci v rámci druhu jsme odhalili míru postkopulačního pohlavního výběru pro jednotlivé druhy.

**Klíčová slova:** pohlavní výběr, kompetice spermií, skrytá volba samice, morfologie spermie, motilita spermie

## **Abstract**

Sexual selection plays an important role in the evolution of animals. Today we already know that it takes place not only before copulation (precopulatory sexual selection), but also after copulation. This type of sexual selection is called postcopulatory sexual selection, and occurs mainly in promiscuous species, where females mate with multiple males. In this case, sperm competition occurs in the female reproductive tract. To increase the likelihood of their reproductive success, males began to develop surprisingly diverse sperm adaptations at the morphological, physiological, or behavioural levels. These adaptations often affect sperm velocity (motility), which is a key factor for successful egg fertilization. However, the result of reproductive success can also be influenced by females, who may prefer sperm with a certain phenotype in the process of cryptic female choice, and thus, for example, obtain better genes for offspring. In some species, females even can have the ability to sort and store sperm in specialized organs in which the sperms are nourished for some time, and then used to fertilize the egg. Even in this case, the storage of sperm is often affected by sperm morphology. Due to these mechanisms of postcopulatory sexual selection, sperm are under strong selection pressure, which can lead to a relatively rapid divergence in sperm morphology between species and subsequent speciation. The aim of this work is to investigate the morphology and motility of sperm in several closely related estrildid finches of the genus *Lonchura*. Based on the analysis of the sperm morphology, we found that the individual species differ in the length of the head and midpiece. The tail and the total length of the sperm do not differ between species. As motility varied significantly among species, we investigated the relationship between motility and sperm morphology. However, the results did not confirm any relationship between morphology and motility of sperm, which may have been influenced by the small number of samples in some species. Based on the variability in total sperm length between individuals of the same species, we estimated the strength of postcopulatory sexual selection for individual species.

**Key words:** sexual selection, sperm competition, cryptic female choice, sperm morphology, sperm motility

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Pohlavní výběr.....	3
2.1	Prekopulační pohlavní výběr .....	3
2.2	Postkopulační pohlavní výběr.....	4
3	Kompetice spermíí.....	6
3.1	Morfologie spermíí u pěvců.....	7
3.2	Jak kompetice spermíí ovlivňuje morfologii a motilitu spermíí.....	9
4	Skrytá volba samice.....	12
4.1	Reprodukční trakt samice .....	13
4.2	Kopulace a oplození u ptáků.....	14
4.3	Sperm storage tubules .....	15
5	Postkopulační pohlavní výběr a reprodukční izolace .....	18
6	Modelový systém pěvců rodu <i>Lonchura</i> .....	19
7	Cíle práce.....	22
8	Materiál a metody .....	23
8.1	Shromáždění jedinců.....	23
8.2	Odběr vzorků spermíí .....	24
8.3	Příprava preparátů spermíí .....	24
8.4	Měření spermíí.....	25
8.5	Měření motility .....	25
8.6	Statistická analýza dat.....	25
9	Výsledky.....	28
9.1	Liší se morfologie spermíí mezi druhy rodu <i>Lonchura</i> ? .....	28
9.2	Liší se mezi druhy míra vnitrodruhové variability v morfologii spermíí? .....	31
9.3	Motilita spermíí.....	33
9.4	Jaké morfologické charakteristiky ovlivňují motilitu spermíí? .....	34
9.5	Je morfologie a motilita spermíí ovlivněna domestikací? .....	35
10	Diskuze .....	37
10.1	Srovnání morfologie a motility spermíí mezi jednotlivými druhy rodu <i>Lonchura</i> .....	37
10.2	Liší se míra vnitrodruhové variability v délce spermíí mezi druhy? .....	39

10.2	Je variabilita spermií ovlivněna domestikací? .....	39
10.3	Možný vliv rozdílů v morfologii a motilitě spermií na reprodukční izolaci mezi druhy.....	40
11	Závěr.....	42
12	Přehled literatury .....	43

# 1 Úvod

Pohlavní výběr je důležitým hnacím motorem evoluce. Jeho působením vznikají znaky, které zvyšují reprodukční úspěch svého nositele, i když někdy na úkor snížené životaschopnosti (Birkhead & Pizzari 2002). Mezi takové znaky patří např. dlouhá ocasní pera rajek či afrických ptáků rodu *Euplectes* (Peters et al. 2004), pestře zbarvené zobáky samců kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) (Peters et al. 2004) či parohy jelenů. Tyto znaky jsou často nápadné a jejich vytvoření může být velmi nákladné. Protože nezřídka snižují životaschopnost svého nositele např. tím, že zvyšují riziko predace, těžko bychom jejich vznik vysvětlili působením přirozeného výběru, při kterém mají větší pravděpodobnost přežití živočichové, lépe přizpůsobeni svému životnímu prostředí.

Dlouho se předpokládalo, že k pohlavnímu výběru dochází pouze před kopulací. Tento pohlavní výběr nazýváme prekopulační, a má dvě složky – intrasexuální, kdy vzájemně soupeří více samců o samici, a intersexuální, kdy si samice vybírají partnera mezi více samci. K pohlavnímu výběru však může docházet i po kopulaci, tedy od počátku páření až po samotné oplození vajíčka (Andersson 1994). Tento méně známý typ pohlavního výběru je označován jako pohlavní výběr postkopulační. Podobně jako při prekopulačním pohlavním výběru jej dělíme na intrasexuální a intersexuální. Při intrasexuálním postkopulačním pohlavním výběru spolu soupeří spermie více samců o oplození vajíčka (kompetice spermií) (Parker 1970), zatímco postkopulační pohlavní výběr intersexuální zahrnuje skrytou volbu samice (Snook 2005).

Samčí pohlavní buňky neboli spermie jsou morfologicky velice variabilní. Rozdíly v morfologii spermií se objevují mezi druhy, poddruhy, ale dokonce i v rámci jednoho druhu (Laskemoen et al. 2013; Kleven et al. 2008). Předpokládá se, že tato značná variabilita je důsledkem postkopulačního výběru, respektive rychlé koevoluce mezi samčími pohlavními buňkami a reprodukčním traktem samice. Tato koevoluce může vést k rychlé divergenci v morfologii spermií mezi druhy. Vznikající fenotypové adaptace spermií mohou mít vliv na motilitu (pohyblivost), životaschopnost nebo kooperaci spermií (Snook 2005). Všechny tyto jmenované vlastnosti jsou klíčové a hrají důležitou roli při úspěchu oplození vajíčka (Anderson 1994).



Postkopulační pohlavní výběr byl zkoumán u mnoha skupin živočichů s vnějším oplozením, jako jsou třeba mořské ježovky (Fitzpatrick et al. 2010). Mnohem těžší je však jeho výzkum u živočichů s oplozením vnitřním, např. u savců, plazů nebo ptáků. V rámci této diplomové práce se budu zabývat postkopulačním pohlavním výběrem u jedné skupiny živočichů s vnitřním oplozením – u ptáků. Konkrétně u astrildovitých pěvců rodu *Lonchura*.

## 2 Pohlavní výběr

Když Charles Darwin přišel s myšlenkou přírodního výběru, všiml si, že v přírodě existuje mnoho znaků jako je např. pestré zbarvení u živočichů, které svým nositelům evidentně nepřináší žádnou výhodu v přežití a lze je tak jen obtížně vysvětlit přirozeným výběrem (Darwin 1871). Později proto navrhl myšlenku pohlavního výběru, který popsal jako výhodu, kterou mají někteří jedinci oproti jiným jedincům stejného druhu pouze s ohledem na reprodukci. Jedinci s určitými znaky, jako jsou nápadné ozdoby u živočichů, větší velikost těla nebo výrazné zbarvení, mohou mít větší pravděpodobnost úspěchu při získávání partnerů a tím se tyto znaky v populaci šíří, i když mohou přinášet rizika např. zvýšenou viditelnost zvířete v prostředí a tím vyšší riziko predace (Darwin 1871). Ke všemu tyto znaky bývají energeticky nákladné. Díky tomu odrážejí kvalitu jedince, což je pro samici dobrý ukazatel životaschopnosti partnera (Andersson 1994). Dnes je zřejmé, že je v přírodě pohlavní výběr velmi důležitou hybnou silou, která je mnohdy silnější než přirozený výběr (Hosken & House 2011). Z hlediska časové fáze rozmnožování, dělíme pohlavní výběr na prekopulační a postkopulační. Zatímco prekopulačnímu pohlavnímu výběru byla věnována pozornost už od Darwina, význam postkopulačního pohlavního výběru byl po dlouhou dobu přehlížen.

### 2.1 Prekopulační pohlavní výběr

Prekopulační pohlavní výběr probíhá před samotnou kopulací. Dělíme jej na dva typy, intrasexuální a intersexuální. Intrasexuální pohlavní výběr probíhá mezi členy stejného pohlaví, nejčastěji samci. Ti mezi sebou různými způsoby soupeří ve snaze spářit se samicí. U druhů s výraznou sexuální kompeticí samců, můžeme často pozorovat nápadné znaky související s bojem jako jsou např. parohy nebo větší velikost těla (Kawano 2006).

Druhým typem prekopulačního pohlavního výběru je intersexuální pohlavní výběr. Ten spočívá v samičím výběru atraktivnějších samců. Samice si obvykle vybírají podle nápadných znaků jako je např. zbarvení peří u ptáků, které jsou nákladné na vznik a odrážejí tak mimo jiné kvalitu genů svého nositele. Nemusí se ale jednat jen o morfologické znaky, ale také o různé typy chování (Irestedt et al. 2009). Např. podle Thornhill (1976) může hrát roli i poskytnutí kořisti či dárku samici před kopulací, nebo ochota při stavění hnízda. Dále způsob námluv, vábení samice nebo agrese (Petersen

& Warner 1998). Extrémním příkladem intersexuální selekce jsou leky, kdy se v době páření shlukuje na jednom místě velké množství samců, kteří se předvádějí samicím, které si pak mezi samci vybírají toho, se kterým se spáří (Jiguet et al. 2000).

## 2.2 Postkopulační pohlavní výběr

Po dlouhou dobu se vědci domnívali, že k pohlavnímu výběru dochází pouze na výše zmíněné prekopulační úrovni. Avšak u mnoha druhů živočichů je úspěch oplození ovlivněn i postkopulačně (Andersson 1994). Probíhá tedy v časovém úseku od kopulace až po oplození. U organismů s polyspermií, kdy do vajíčka vstupuje více spermií, jako např. u ptáků, by dokonce postkopulační pohlavní výběr mohl fungovat po vniknutí spermií do vajíčka před spojením jader. Stejně tak jako u prekopulačního výběru, tak i u postkopulačního výběru si samci vytvářejí různé adaptace a typy chování, aby zvýšili pravděpodobnost svého reprodukčního úspěchu, v tomto případě však na gametické úrovni.

Mechanismy postkopulačního pohlavního výběru byly nejprve studovány u živočichů s vnějším oplozením (Rosengrave et al. 2008). U těchto živočichů bylo studium poněkud jednodušší, protože jednotlivé interakce probíhají ve vodním prostředí. Například u ryb bylo zjištěno, že pohlavní výběr silně upřednostňuje samce, kteří produkují spermie s maximální rychlostí a energetickými zdroji (ATP) (Fitzpatrick et al. 2009). Stejně tak Rosengrave et al. (2008) popsal, že u druhů s vnějším oplozením je schopnost oplození závislá na rychlosti plavání spermií. Rychlejší spermie se k vajíčku dostanou dříve a mají tak vyšší šanci na oplození. Podle některých studií by rychlost spermií mohla pozitivně korelovat s její délkou. Tento pozitivní vztah, který naznačuje, že by selekční tlak na rychlejší spermie mohl vést k delším spermiím byl pozorován např. u mořské ježovky (*Heliocidaris erythrogramma*) (Fitzpatrick et al. 2010).

Postupem času se ukázalo, že postkopulační pohlavní výběr je důležitým procesem i u organismů s vnitřním oplozením (Birkhead & Pizzari 2002; Forstmeier et al. 2011). Uznání této skryté, ale intenzivní, sexuální soutěže poskytlo nový pohled na překvapivou rozmanitost morfologických, fyziologických a behaviorálních adaptací spermií (Eberhard 2009). Ty jsou modelovány intrasexuálním postkopulačním výběrem, který zahrnuje kompetici spermií, a intersexuálním postkopulačním výběrem, do kterého bychom zařadili skrytou volbu samice (Snook 2005). V nadcházejících kapitolách se

detailněji zaměřím na tyto dva komponenty postkopulačního výběru s důrazem na ptáky, zejména na pěvce, kterým se věnuji v mé diplomové práci.

### 3 Kompetice spermií

Kompetice spermií byla prvně popsána Parkerem (1970), který ji definoval jako soupeření mezi spermiemi dvou nebo více samců o oplodnění samičích vajíček. Aby mohlo tedy ke kompetici vůbec docházet, je nezbytná samičí promiskuita. Přestože se myslelo, že je většina ptáků (alespoň v rámci pěvců, kteří tvoří zhruba polovinu druhů ptáků) sociálně monogamních, nedávné studie ukázaly velkou četnost tzv. mimopárových paternit („extra-pair paternity“, EPP), jejichž přítomnost naznačuje, že i u sociálně monogamních druhů mohou samice kopulovat s více samci a tím pádem může probíhat postkopulační pohlavní výběr (Griffith et al. 2002). Průlom ve studiu EPP nastal s objevem metody DNA fingerprintingu. Ptáci byli jednou z prvních skupin, u kterých byla tato metoda praktikována. Na základě studií provedených na více než 120 druzích ptáků, byla zjištěna různá míra EPP (Birkhead 1998b). Nízkou míru EPP vykazují například ptáci z řádu trubkonosých, brodivých, pelikánů (Quillfeldt et al. 2012), dravců nebo volavek (Birkhead 1998b). U pěvců jsou EPP obecně častější, než u ostatních skupin ptáků (Birkhead 1998b). Podle Westneat & Webster (1994) je pravidelně mimopárově zplozeno přibližně 10-20 % potomků pěvců.

Samice díky své promiskuitě získávají různé výhody, mezi které patří např. dostatečný příjem spermií, rozmanitost a větší životaschopnost potomků, nebo kompatibilita mezi spermatem a samiččím reprodukčním traktem či vajíčky (Birkhead & Pizzari 2002). Avšak s mimopárovými kopulacemi se pojí i značná rizika. Mimo to, že je energeticky náročné najít si partnera, může při kopulacích docházet např. k přenosu ektoparazitů a pohlavních nemocí (Hasselquist et al. 2009).

Jelikož je u promiskuitnějších druhů silnější kompetice spermií, začali si samci v důsledku postkopulačního pohlavního výběru vytvářet různé fenotypové adaptace spermií, které mohou mít vliv na jejich rychlost (motilitu). Vzhledem k tomu že jsou u většiny druhů úspěšnější delší spermie, protože jsou rychlejší (Calhim et al. 2007), vyskytují se u promiskuitních druhů převážně delší spermie (Briskie et al. 1997). Čím je tedy vyšší riziko kompetice spermií, tím delší spermie samci produkují (např. Johnson & Briskie 1999), i když tato závislost není zcela bez výjimek (Hosken 1997).

Mechanismy postkopulačního pohlavního výběru jsou ale rozmanitější. U některých druhů zahrnují například kooperaci spermií (Pizzari & Foster 2008). To by se mohlo zdát divné, protože oplodnit vajíčko může v drtivé většině situací přeci pouze

jedna spermie. Avšak, vzhledem k tomu, že izolované spermie nejsou v některých situacích efektivními plavci, začali se shlukovat do tzv. vláček. Tyto vláčky si můžeme představit, jako souhrn 5–10 spermií, které plavou společně a spolupracují, a toto seskupení jim umožňuje plavat rychleji přímo k vajíčku (Immler et al. 2007). Někteří samci si zase vytváří dva typy spermií, kdy jeden typ slouží pouze jako ochrana spermií prvního typu, jejichž úkolem je oplození vajíčka (Buckland-Nicks 1998). Dalšími typy chování samců, které zvyšují pravděpodobnost oplození, je prodloužení doby kopulace, opakovaná ejakulace se stejnou samicí nebo zvýšení rychlosti přenosu spermií (Wedell et al. 2002).

Faktorem, který by taktéž mohl hrát roli při kompetici spermií je celkové množství spermií, které souvisí s velikostí varlat samců (Briskie & Montgomerie 2007; Lüpold et al. 2009b). Varlata ptáků se zvětšují a zmenšují v závislosti na sezóně. Tudiž v období rozmnožování je produkce spermií větší. Tato zvětšení jsou patrná hlavně u polygamních druhů (Mulder & Cockburn 1993).

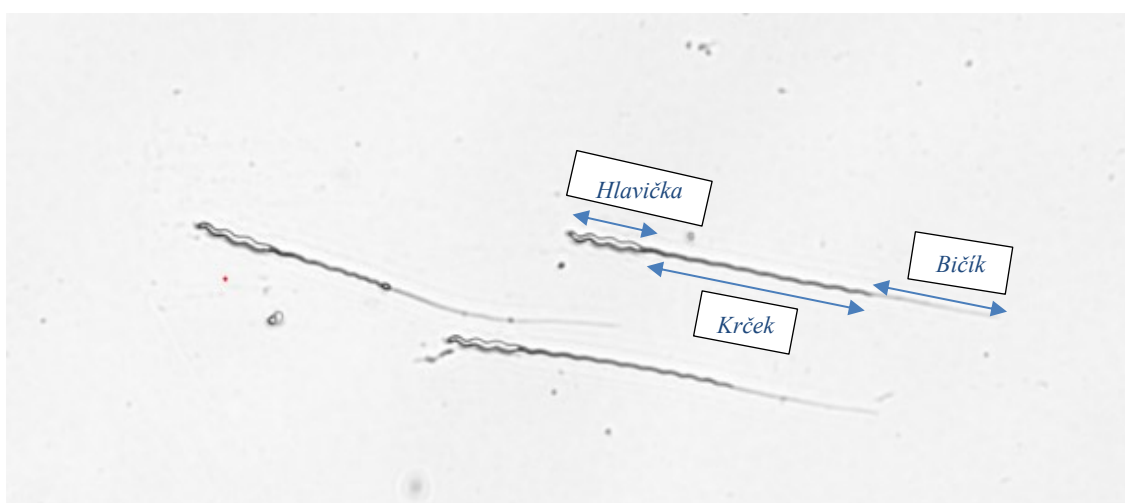
Na kompetiční úspěch samců mohou mít mimo výše zmíněné faktory vliv ještě další aspekty. Těmi jsou např. vlastnosti samičího reprodukčního traktu a ukládání spermií ve specializovaných orgánech. Avšak k pochopení toho, jak spermie fungují a interagují, je důležité se nejprve seznámit s jejich morfologií.

### **3.1 Morfologie spermií u pěvců**

Spermie pěvců, kterými se budu zabývat ve své práci, se skládají ze tří částí. První velmi důležitou část spermie tvoří hlavička. Spermie pěvců je pod mikroskopem viditelně poznatelná díky své šroubovité hlavičce (Briskie & Montgomerie 2007). Ta se dělí na akrozomální a postakrozomální část. V akrozomální části hlavičky se nachází specializovaný lyzozom, nazývaný akrozom. Akrozom obsahuje enzymy, např. hyaluronidázu nebo akrozin. Tyto enzymy jsou nepostradatelné k tomu, aby spermie vnikla do vajíčka a následně došlo k jejich fúzi (Drobnis & Overstreet 1992). Postakrozomální část obsahuje jádro, které je uložištěm genetického materiálu v podobě jedné sady otcovských chromozomů.

Na hlavičku dále navazuje krček, který je u pěvců na první pohled nápadně prodloužený. V krčku jsou umístěny koncentricky uložené mitochondrie, které vytváří energii v podobě molekul ATP (adenosintrifosfátu), a tím umožňují pohyb spermie. Krček bychom tedy mohli považovat jako energetickou složku spermie (Cardullo & Baltz 1991).

V místě zvaném *anulus* krček končí, a navazuje na něj bičík, tedy poslední část spermie, ve které je uložen pohybový aparát spermie (Darszon et al. 2011).



Obrázek 1: Spermie pěvce rodu *Lonchura* (foto: Markéta Šárová)

Ačkoliv jsou v anglicky psané literatuře spermie často rozlišeny pouze na dvě části, tedy hlavičku a flagellum (zahrnuje krček s bičíkem), ve své diplomové práci se zabývám všemi třemi částmi spermie individuálně, a využívám tedy dřívějšího členění na hlavičku, krček a bičík.

V říši pěvců se můžeme setkat s různě dlouhými spermiiemi v rozmezí od 42,7  $\mu\text{m}$  do 291  $\mu\text{m}$  (Dixon & Birkhead 1997). Variabilita v délce spermii však nemusí být vždy jen mezidruhová, ale setkáváme se taktéž s vnitrodruhovou variabilitou ve velikosti spermii. Příčiny této vnitrodruhové variability mohou být různé a mohou zahrnovat různé abnormality způsobené chybami v procesu spermatogeneze. Roli může hrát stáří samce (Møller et al. 2009) nebo složení spermii v ejakulátu, který může obsahovat staré, nové nebo dokonce nezralé spermie (Humphreys 1972).

Přestože se morfologie spermií mezi různými druhy pěvců liší, mají jedno společné, svou unikátní spirálovitou stavbu. Díky tomu se od ostatních skupin živočichů odlišují mechanismem pohybu. Zatímco spermie jiných obratlovců se pohybují vpřed mrskáním bičíku ze strany na stranu (Koehler 1995), u pěvců je pohyb vpřed generován šroubovitým otáčením spermie, která se točí kolem vlastní osy po směru hodinových ručiček (Vernon & Woolley 1999). Poškozené, neživotaschopné spermie mají sníženou pohyblivost a nerotují.

### 3.2 Jak kompetice spermií ovlivňuje morfologii a motilitu spermií

Morfologie spermií a s ní související rychlost pohybu spermií, je jedním z hlavních aspektů, rozhodujících o výsledku kompetice spermií. Jeden z prvních modelů předpokládal, že kompetice spermií vede ke zvýšenému počtu spermií, ale zároveň ke zmenšení jejich velikosti (Laskemoen et al. 2010). Samci si tedy mohou pokusit zvýšit svoje šance větším množstvím spermií v ejakulátu na úkor velikosti spermií (Parker 1982).

Další studie nicméně potvrzují, že v důsledku vzrůstajícího rizika kompetice spermií může také docházet k prodlužování jednotlivých částí spermií nebo jejich celkové délky (Lüpold et al. 2009a). Delší spermie totiž mohou být rychlejší, a dostanou se tak k vajíčku dříve (Gomendio & Roldan 2008; Lüpold et al. 2009a; Snook 2005). Mohly by mít tedy v konkurenčním scénáři výhodu oproti kratším spermím, protože obecně mají: (i) delší bičíky (Immler & Birkhead 2007) poskytující větší dopředný pohon (Cardullo & Baltz 1991), a (ii) relativně větší krčkovou část (Immler & Birkhead 2007), která produkuje více energie ve formě ATP (Vladić et al. 2002; Tourmente et al. 2013). Ačkoli je vztah mezi obsahem ATP spermií a rychlostí plavání nejistý (Tourmente et al. 2013; Rowe et al. 2013), např. podle Fitzpatrick et al. (2010) existují dobré důkazy, že delší spermie plavou rychleji než ty kratší, a to jak uvnitř druhu, tak mezi druhy (Bennison et al. 2015). Lüpold et al. (2009a) svou studii zacílil na pěvce, u kterých potvrdil, že rychlost spermie pozitivně koreluje s délkou spermie. Tento vztah potvrdila i studie Losdat & Helgenstein (2018) u sýkory koňadry (*Parus major*). Zmínit by se měl také výzkum, provedený na zebříčkách pestrých (*Taeniopygia guttata*), ve kterém bylo potvrzeno, že delší spermie jsou úspěšnější v oplození vajíček (Bennison et al. 2015). Mossman et al. (2009), kterému byla modelovým druhem taktéž zebříčka pestrá, tuto



teorii potvrdil, a zároveň popsal, že motilita je závislá i na poměru délky hlavičky a bičíku. Významným faktorem by mohly být tedy i poměry délek jednotlivých částí (Helfenstein et al. 2010). Změny v jednotlivých částech spermie jsou na sobě často závislé. Např. dojde-li u spermie ke zvětšení bičíku, dochází často i ke zvětšení krčku, a to kvůli energetické dynamice spermie (Lüpold et al. 2009a). To je případ i vrabce domácího (*Passer domesticus*), u něhož bylo zjištěno, že rychlost spermií pozitivně koreluje s poměrem hlavičky ku bičíku (Helfenstein et al. 2010).

Anderson & Dixson (2002) potvrzuje, že čím je krček delší, tím více se nachází ve spermii mitochondrií, které vyrábí potřebnou energii pro motilitu spermie. Pozitivní vztah mezi délkou krčku a motilitou potvrzuje i Cardullo & Baltz (1991) nebo Lüpold et al. (2009a).

Výzkum Katz et al. (1989) stejně tak jako Briskie & Montgomerie (1992) zase nepodceňuje úlohu bičíku, který by mohl pozitivně korelovat s motilitou spermie. Podle studie založené na čeledi vlhovcovitých (*Icteridae*), byl nalezen pozitivní vztah mezi délkou bičíku a rychlostí spermie. A zároveň bylo potvrzeno, že se vzrůstající délkou krčku se zvyšuje i délka bičíků (Lüpold et al. 2009a).

Role hlavičky je však sporná, a v některých výzkumech dokonce její délka negativně koreluje s motilitou (Lüpold et al. 2009a). Např. Calhim et al. (2011) tvrdí, že spermie, které mají větší hlavičky, jsou pomalejší, ale jsou schopny v reprodukčním traktu déle přežít.

Avšak, některé studie tyto vztahy vyvrací. Např. Cramer et al. (2015) sledoval vztah mezi délkou spermie a její motilitou u vrabce domácího (*Passer domesticus*) a vrabce pokřovního (*Passer hispaniolensis*) a zjistil, že motilita spermie nekoreluje s délkou krčku. Že rychlejší spermie disponují delším krčkem a delším bičkem nepotvrdila ani studie Kleven et al. (2009). Lifjeld et al. (2012) ve své studii předpokládal, že delší spermie lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*), budou rychlejší. Jejich rychlost však po několika minutách klesla, a rychlejšími se staly kratší spermie. To by mohlo znamenat, že při kompetici spermií není důležitá pouze motilita spermií, ale i doba přežívání spermií (Birkhead et al. 2009). Jedinci, kteří mají spermie s dlouhými krčky, mohou mít zdroje energie rychleji vyčerpány, a tím se může jejich motilita rychleji snížit, stejně tak jako pravděpodobnost reprodukčního úspěchu (Immler & Birkhead 2007).

Velikost spermií souvisí i s počtem spermií v ejakulátu. Zvětšená velikost spermií je obvykle spojena se sníženým počtem spermií. Nicméně, pokud mají delší spermie zvýšenou pravděpodobnost oplodnění, může být tato morfologická změna v postkopulačním pohlavním výběru upřednostňována (Wigby & Chapman 2004). Naopak, pokud je pro samce výhodné vytvořit velké množství spermií, budou selektovány na co nejmenší velikost (Holman & Snook 2006).

Bylo také ukázáno, že druhy se silnějším postkopulačním pohlavním výběrem vykazují nižší variabilitu v celkové délce spermie mezi jedinci v rámci druhu (Lifjeld et al. 2010), čehož lze využít při odhadu míry postkopulačního pohlavního výběru a EPP jednotlivých druhů na základě analýzy morfologie spermií.

Na morfologii spermií a s ní spojenou motilitu by také mohla mít vliv domestikace. Např. Griffith et al. (2002) a Griffith & Buchanan (2010) ve svých studiích testují míru EPP u domestikovaných a divokých populací zebříček. Tyto dvě populace se mezi sebou silně liší v EPP. V divoké populaci jsou EPP cca 2-3 %. V domestikovaných populacích je však míra EPP mnohem větší, cca 12-14 %. S tím vzrůstá riziko kompetice spermií, a tím i selekční tlaky na fenotyp spermie. Spermie u domestikovaných populací by se tedy mohly morfologicky lišit od spermií divokých druhů.

## 4 Skrytá volba samice

Studium postkopulačního pohlavního výběru značně komplikuje fakt, že mimo kompetici spermií se v samičím reprodukčním traktu odehrává ještě skrytá volba samice (Birkhead 1998a). Skrytá volba samice je méně známou formou postkopulačního pohlavního výběru, která se začala zkoumat později než kompetice spermií. Studium tohoto jevu je komplikované, jelikož je těžké rozlišit konkrétní působení těchto dvou mechanismů postkopulačního výběru (Birkhead 1998a).

Nejedná se o klasickou samičí volbu, při které si samice vybírá na základě samčích fenotypových vlastností, ale o cílené třídění spermií od různých samců. Samice může mít kontrolu nad přenosem spermií, a to jak při právě probíhající kopulaci, po kopulaci, včetně přepravy spermií do skladovacích tubulů nebo při oplodnění (Firman et al. 2017).

Skrytá volba samice probíhá v samičím reprodukčním traktu, což je prostředí pro spermie často nepříznivé, a tudíž potenciálně selektivní (Birkhead et al. 1993). Samice je procesem skryté volby schopna získat např. lepší geny pro potomky. Díky této schopnosti může probíhat selekce na určité fenotypové znaky spermií. To může zapříčinit i zvýhodnění některých spermií při jejich kompetici (Thornhill 1983).

Existuje široká škála prostředků, díky nimž mohou samice potenciálně ovlivnit výsledek kopulace. Spadají mezi ně různé chemické bariéry (např. nízké pH a viskózní hlen), anatomické bariéry (např. děložní čípek), spermicidní látky v reprodukčním traktu (Birkhead et al. 1993) a aktivní vypuzení spermií samicí (Pitnick & Hosken 2010). Ta umožňuje samici vypudit spermie nechtěného samce nebo sperma z dřívějších kopulací, a následně kopulovat s preferovaným samcem (Davies 1983). Tímto mechanismem může samice také zapříčinit, že se do jejího pohlavního traktu dostanou nové nedegenerované spermie. Mezi další mechanismy patří schopnost urychlit ovulaci nebo dozrání vajíček po kopulaci se vhodným partnerem (Eberhard 1996).

Podle Milinski (2006) by si samice mohla vybírat spermie na základě histokompatibilního komplexu (MHC). Vzhledem k tomu, že geny MHC jsou zásadní pro imunitní funkci, lze očekávat, že zvýšení heterozygotnosti MHC nebo získání vzácných alel v komplexu MHC povede ke zvýšené rezistenci mezi potomky. V důsledku

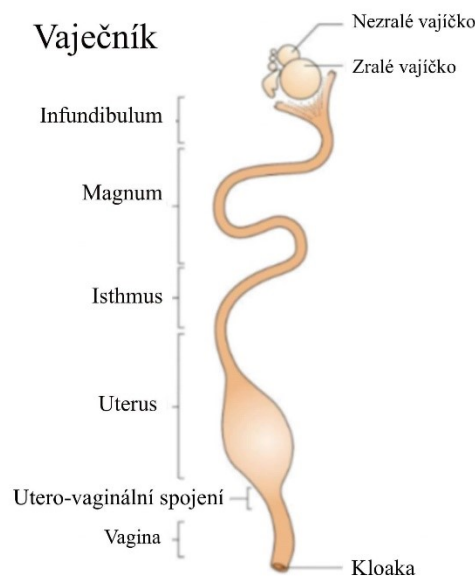
toho lze předpokládat, že mechanismy skryté volby samice zvýhodní spermie buď odlišných samců, nebo samců s „optimální“ podobností MHC.

Podle Eberharta (1996) dochází také k cíleným potratům nebo k tzv. vstřebání embrya. To se často stává, pokud je březí samice v kontaktu s jiným samcem, a je vystavena například jeho chemickým stimulům. V tom případě může dojít k jevu, který se nazývá Bruceův efekt (Heske & Nelson 1984). Tento mechanismus však již nespadá do klasického postkopulačního pohlavního výběru, jelikož k tomu dochází již po oplození.

#### 4.1 Reprodukční trakt samice

Abychom lépe pochopili procesy související s postkopulačním pohlavním výběrem, je důležité si popsat samičí reprodukční trakt a průběh oplození u ptáků.

Reprodukční trakt samice se skládá z několika struktur, které se značně zvětšují v období rozmnožování. Prvními jsou vaječníky (*ovaria*). Samice mají zpravidla aktivní pouze levý vaječník. Ten produkuje vaječné buňky, které během dospívání samice dozrávají. Na vaječníky navazují vejcovody (*oviductus*) hroznovitého tvaru. U ptáků je opět funkční pouze levý vejcovod, který se dělí na několik úseků – nálevku (*infundibulum*), bílkotvornou část (*magnum*) a krček (*isthmus*). V další části reprodukčního traktu se nachází děloha (*uterus*) a pochva (*vagina*) (např. Birkhead & Møller 1992). Vyústění vaginy se nazývá kloaka. Důležitou součástí samičího reprodukčního traktu jsou také tzv. sperm storage tubules (SST), specializované tubuly, ve kterých jsou samice schopny uchovávat spermie. Tyto tubuly jsou umístěny primárně v *lamina propria* slizničních záhybů v utero-vaginálním spojení (UVJ) a v *infundibulu* (Sasanami et. al 2013).



Obrázek 2: Schéma samičího reprodukčního traktu znázorňující umístění utero-vaginálního spojení a infundibulum, kde se vyskytují specializované tubuly pro ukládání spermií (upravené od Birkhead 1996).

## 4.2 Kopulace a oplození u ptáků

Samotný akt kopulace je u ptáků převážně velmi rychlý. Samec vstříkne sperma přitlačením své kloaky na kloaku samice. Odtud se spermie aktivně dostávají do vejcovodu (Birkhead et al. 1999). Jejich pohyb ve směru vajíčka je také podporován stahy vejcovodu. Mimo jiné je v reprodukčním traktu samice produkována tzv. ovariální tekutina, která obsahuje kationty jako je  $Mg^{2+}$  a  $Na^{+}$ . Tyto kationty mohou mít vliv na spermie a to tak, že mohou zvyšovat jejich pohyblivost a životnost (např. Alonzo et al. 2016, Tesařík et al. 1990, Linhart et al. 2002). Spermie se dostávají do horní části vejcovodu, tedy do *infundibula*, kde dochází během 15-30 minut k oplození vajíčka (Birkhead & Fletcher 1994). Oplození je proces, při němž dojde ke splynutí vajíčka a spermie. Avšak, aby mohlo k tomuto splynutí dojít, musí spermie vyvolat tzv. akrozomální reakci. Při této reakci jsou uvolněny akrozomální enzymy, které usnadní projít spermii glykoproteinovým obalem vajíčka, tzv. zónou pellucidou, která slouží k selekci spermií (pouze nepoškozené spermie jsou schopné projít skrz). Následně už dochází k výše zmíněnému splynutí neboli fúzi gamet (Campbell & Reece 2006), což je aktivní proces, často zprostředkovaný specifickými „fusogenními“ proteiny. Po oplození následuje splývání jader tzv. karyogamie (Krawczyk & Jaworska-Adamu 2019).

Ačkoliv vajíčko fúzuje s jediným jádrem spermie, můžeme se u ptáků setkat s takzvanou polyspermií, tedy situací, kdy během oplození proniká do vajíčka hned

několik spermií, ale pouze jedno jádro spermie se spojí s jádrem vajíčka (Harper 1904). Počet spermií v *infundibulu* v době oplození lze odhadnout spočítáním zachycených spermií na vnější vrstvě tzv. perivitellinní membrány (Gilbert 1971; Wishart 1987), kterou si můžeme představit, jako extracelulární matrix obklopující ptačí pohlavní buňky (Sasanami et al. 2007). Počet spermií proniknuvších do vajíčka lze pak odhadnout spočítáním děr v tzv. vnitřní perivitellinní membráně, což je cytoplazmatická membrána vajíčka. Například Birkhead et al. (1993) zaznamenal pozitivní korelaci mezi počty proniklých spermií do vajíčka a počtem spermií zachycených na vnější vrstvě perivitellinní membrány u zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*).

I když má polyspermie u většiny živočichů katastrofální následky, u ptáků je přirozená. Selhání oplození po kopulaci může být právě důsledkem nedostatku spermií, které pronikají do vajíčka (Hemmings & Birkhead 2015) nebo jejich špatnou funkcí (Brillard 1990). Nicméně, pokud dochází k polyspermii, mohli bychom si klást otázku, u které spermie z mnoha dojde ke karyogamii? Touto otázkou se zabývá studie Gorelick et al. (2011), která předpokládá, že nedochází pouze ke klasickému postkopulačnímu výběru, ale i tzv. postplazmogamicko – předkaryogamickému. Ten probíhá ve chvíli, kdy spermie vstupují do vajíčka, ale ještě nedošlo k fúzi jejich jader. Avšak aby mohlo vůbec k tomuto zvláštnímu pohlavnímu výběru docházet, je zapotřebí, aby se spermie chovaly nezávisle na sobě. Studium postplazmogamicko – předkaryogamickým výběru se zabývá málo studií (např. Birkhead 1998b), jelikož studium tohoto děje je velmi komplikované.

Jádro vajíčka může upřednostňovat spermie s určitými rysy. Těmi by mohly být například detekce dobrých genů, prostřednictvím mRNA signálů. Je totiž možné, že mRNA spermií je používána pro manipulaci v oblasti samičí reprodukční investice. Tato tzv. hypotéza trojských genů předpovídá, že spermie fungují jako trojské koně dodávající do vajíčka manipulativní mRNA (Gorelick et al. 2011; Hosken & Hodgson 2014). Další hypotézou je, že by mohly být upřednostňovány geny pro určité vlastnosti (Gorelick et al. 2011).

### 4.3 Sperm storage tubules

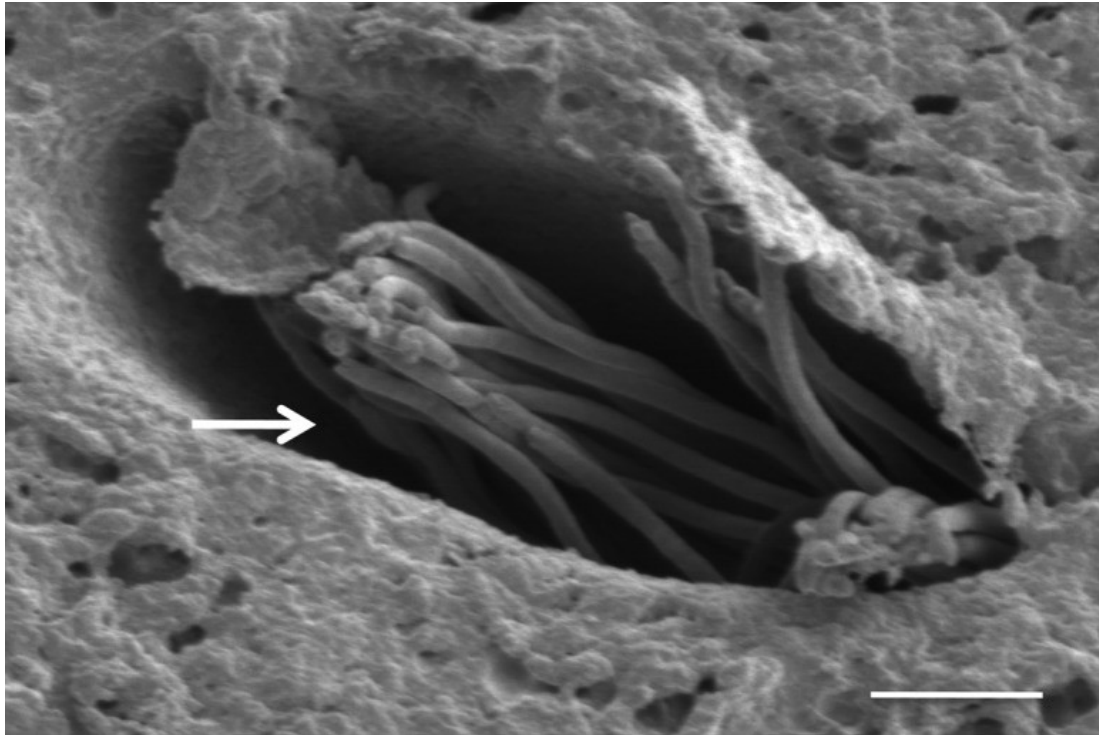
Jak již bylo zmíněno v kapitole o reprodukčním samičím traktu, samice disponují specializovanými tubuly (SST), ve kterých jsou skladovány živé spermie. I v těchto tubulech může docházet k postkopulačnímu pohlavnímu výběru. Roli v tom může hrát

jak morfologie, tak motilita spermií, která je zásadní pro co možná nejrychlejší obsazení volných tubulů v těle samice (Birkhead et al. 1999). To bylo prokázáno např. u kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) (Birkhead et al. 1999).

Spermie po kopulaci vstupují do SST, které se nacházejí v *infundibulu* a utero-vaginálním spojení (Sasanami et al. 2013). Je pro ně velice důležité, aby se do těchto tubulů dostaly v co nejkratší době, jelikož samičí reprodukční trakt je pro ně nepříznivý a nedokážou v něm dlouhodobě přežít. Ty rychlejší mají tedy menší pravděpodobnost poškození. Spermie, které nejsou mobilní, se do tubulů vůbec nedostanou a jsou reprodukčním traktem odstraněny. Uvádí se, že méně než 1 % spermií, které vstupuje do samičího reprodukčního traktu, vstupuje do SST (Bakst et al. 1994). Spermie jsou v SST obnovovány za nové a samice má schopnost dlouho uschované sperma vypudit, aby tím předešla degenerativním poruchám u budoucího potomstva (Wagner et al. 2004).

Délka SST pozitivně koreluje s délkou spermií. To naznačuje, že dochází ke koevoluci mezi velikostí spermií délkou tubulů (např. Briskie et al. 1997). Podle některých studií u pěvců (Briskie & Montgomerie 1992; Briskie & Montgomerie 1993) jsou SST přibližně dvojnásobně delší než spermie, tzn. že se do nich vejdou přibližně dvě vrstvy, ve kterých se promíchávají minimálně. Ve SST jsou spermie ukládány tak, že hlavička směřuje ke slepému konci tubulu (Bobr et al. 1964). Jejich metabolismus a spotřeba ATP je snížena, jelikož se uvnitř tubulu nepohybují. Při teplotě 41 °C (Sasanami et al. 2013) jsou zároveň vyživovány, a díky antioxidantům setrvávají déle aniž by docházelo ke vzniku nových mutací (Bakst & Richards 1985).

V SST mohou být uloženy spermie z různých kopulací. Podle Birkhead & Møller (1993) jsou spermie z poslední kopulace pravděpodobně zvýhodněny tím, že jsou uloženy v poslední vrstvě. Brání tedy ostatním spermiím tubul opustit (Briskie 1996). Na základě toho zplodí převážnou většinu potomstva samec, který kopuloval se samicí jako poslední. Spermie setrvávají v SST několik dnů až týdnů. Když dojde k ovulaci, začnou se v důsledku hormonu progesteronu z SST uvolňovat (Tomomi et al. 2011) a putují oplodnit zralé vajíčko (Briskie et al. 1997).



Obrázek 3: Bílá šipka znázorňuje spermie uložené v SST u křepelky japonské; bílá čára = 2,5  $\mu\text{m}$  (zdroj: Sasanami et al. 2013)

Byla prokázána značná variabilita v délce (Briskie & Montgomerie 1993) a počtu SST (Birkhead & Møller 1992) mezi jednotlivými druhy ptáků. Počty SST závisí na velikosti samice. Pohybují se od 300 – 20 000 tubulů (Briskie et al. 1997), a jsou pozoruhodným východiskem, jak dosáhnout časoprostorové regulace kontaktu spermie a vajíčka během oplodnění.



## 5 Postkopulační pohlavní výběr a reprodukční izolace

Oba aspekty postkopulačního pohlavního výběru podrobují spermie silnému tlaku, který často vede k relativně rychlé divergenci v morfologii spermií mezi druhy. Ta je často způsobena tzv. pohlavním konfliktem, tedy situací, kdy jedno pohlaví neustále odpovídá na nové znaky druhého pohlaví. To bychom mohli nazvat jako intersexuální koevoluci. Tato intersexuální soutěž může vést k velmi rychlé divergenci samčích gamet a samičího reprodukčního traktu mezi druhy (Manier et al. 2013). Ta může v důsledku způsobovat reprodukční izolaci mezi druhy. Buď vzniká vnitřní postzygotická izolace, která je způsobena nekompatibilitou genů od různých druhů, např. hybridní sterilita (Coyne & Orr 2004) nebo dochází ke vzniku postkopulační prezygotické izolace.

Jelikož mají samice schopnost rozlišovat mezi spermii vlastního druhu (konspecifické spermie) a cizího druhu (heterospecifické spermie) (Birkhead 2000), mohou např. upřednostňovat konspecifické spermie nad heterospecifickými (Howard 1999) bez ohledu na pořadí kopulace s konspecifickým a heterospecifickým samcem (Price 1997). Tento tzv. konspecifický „sperm precedence“ (CSP), byl popsán u řady suchozemských i vodních organismů (Klibansky et al. 2014). Funguje jako gametická izolace, která byla prokázána např. ve studiích u kobylek (Hewitt et al. 1989; Bella et al. 1992), cvrčků (Howard & Gregory 1998), moučných brouků (Wade et al. 1994) nebo mořských ježovek (Geyer 2005). Stejně tak jako u bezobratlých, byl tento jev popsán i u obratlovců např. u dvou blízce příbuzných druhů myší (Dean & Nachman 2009). U ptáků byl tento CSP potvrzen např. ve studii Sellier et al. (2005), která zkoumala míru oplodnění u dvou druhů kachen.

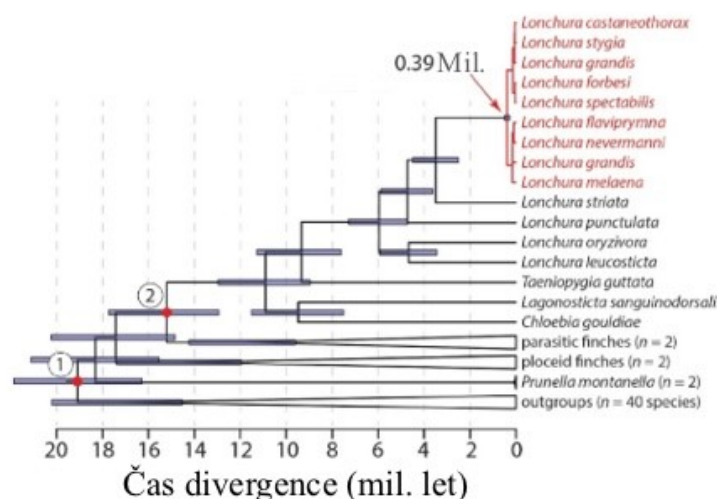
Z výše uvedených studií vyplývá, že postkopulační pohlavní výběr je významným hybatelem evoluce, zodpovědným za rozmanitost na různých úrovních v živočišné říši.

## 6 Modelový systém pěvců rodu *Lonchura*

Výzkum popsáný v této diplomové práci se zaměřuje na modelový systém ptáků rodu *Lonchura* (česky se tyto ptáci nazývají panenky). Panenky jsou dobrým modelovým systémem z důvodu, že existuje relativně hodně různě vzdálených druhů, které je možné v zajetí křížit a tím pádem do budoucna např. studovat morfologii spermií u hybridů nebo mapovat geny odpovědné za odlišnou morfologii spermií u různých druhů.

Tato skupina pěvců je sesterským taxonem zebřiček (*Taeniopygia guttata*), které jsou v řadě studií taktéž využívány jako modelový druh (Mossman et al. 2009; Hemmings et al. 2016). Obě tyto skupiny spadají z hlediska systematiky do čeledi astrildovitých pěvců (*Estrildidae*). Panenky v současnosti zahrnují zhruba 37 druhů a mnoho poddruhů, i když údaje o počtu druhů se v literatuře můžou trochu lišit (Restall 2010). Rozdíly v počtech druhů jsou způsobeny uznáváním nebo naopak neuznáváním některých druhů.

Panenky žijí v Africe, jižní Asii, od Indie až po Indonésii a Filipíny, avšak dva druhy nalezneme i v Austrálii. Zahrnují jeden z příkladů nedávné a rychlé radiace u ptáků (Stryjewski & Sorenson 2017). Uvnitř této skupiny proběhla diverzifikace přibližně před 5 miliony lety, ale některé druhy jsou mladší, diverzifikovaly před sty tisíci lety. Některé druhy v přírodě vzájemně hybridizují. Panenky lze chovat v zajetí a tam je i křížit. Např. Hopkinson (1938) pozoroval křížení v zajetí u panenky černohlavé (*Lonchura atricapilla*) a chuvičky japonské (*Lonchura striata domestica*).



Obrázek 4: Fylogenetický strom znázorňující příbuznost nými studovaných druhů rodu *Lonchura* a diverzifikaci jednotlivých druhů (upravené od Stryjewski et al. 2017)

Nejznámějším a často chovaným druhem z této skupiny je pravděpodobně *Lonchura striata domestica*, kterou můžeme také znát pod českým názvem jako chůvička japonskou (Obr. 5). Jde o domestikovaný druh, který se nevyskytuje ve volné přírodě. Proces domestikace začal asi před 250 lety v Japonsku a došlo k několika modifikacím zbarvení a chování (Honda 2009). Poprvé se objevil v zoologických zahradách v šedesátých letech minulého století. Tento druh byl chován po mnoho let v Japonsku, než byl importován do Evropy, kde se stal oblíbeným chovným ptákem. Byl vyšlechtěn z několika volně žijících druhů panenek rodu *Lonchura*. Výchozím druhem byla hlavně *Lonchura striata*, ale na vzniku se podíleli i *Lonchura leucogastroides*, *Lonchura malabarica* či *Lonchura acuticauda* (Svanberg 2008). Chůvička japonská dostala své české jméno na základě skutečnosti, že sedí na vejcích cizích ptáků, pokud ji jsou podstrčeny a zároveň je stejně jako chůva odchovává. Je tedy tzv. pomocným ptákem, při dochovu vzácných druhů, které nechtějí sedět na vejcích nebo mláďata krmit (Honda 2009). Latinské druhové jméno je založeno na faktu, že je tento druh chován již po mnohé generace v zajetí. Na rozdíl od následujících druhů panenek, které jsou chovány v zajetí pouze v několika málo generacích. Tyto druhy jsou blízcí příbuzné divokým populacím.

Jedním z těchto druhů je *Lonchura atricapilla* (Obr. 6). Označována také jako panenka černohlavá. Jedná se o hnědého ptáka s černou hlavou a cihlově červenou skvrnou na zádech, která je vidět pouze v letu. Panenka černohlavá v době hnízdění žije v párech, po vylétnutí mláďat z hnízda se sdružuje v malých rodinných skupinkách, ale po zbytek roku tvoří velká hejna.

Velmi podobnou *L. atricapilla* je *L. malacca* (Obr.7), která se od ní liší přítomností bílé barvy. Kvůli tomuto zbarvení je pojmenována jako panenka tříbarvá.

Dalším zástupcem zahrnutým do této diplomové práce je *Lonchura castaneothorax*, neboli panenka hnědoprsá (Obr.8). Mezi chovateli je panenka hnědoprsá velice populární.

Pestře zbarvená *L. punctulata*, známá jako panenka muškátová (Obr. 9), je stejně jako *L. castaneothorax* velmi oblíbeným ptákem chovaným ve voliérách nejenom českých chovatelů.

Posledním druhem, kterého se naše studie týká je *L. flaviptymna*, panenka žlutobřichá (Obr.10). Tento druh je poměrně vzácný a není běžně chovaným ptákem.



Obrázek 5: *Lonchura striata domestica*  
(zdroj: en.wikipedia.org)



Obrázek 6: *L. atricapilla*  
(zdroj: en.wikipedia.org)



Obrázek 7: *L. malacca*  
(zdroj: en.wikipedia.org)



Obrázek 8: *L. castaneothorax*  
(zdroj: https: cs.wikipedia.org)



Obrázek 9: *L. punctulata*  
(zdroj: cs.wikipedia.org)



Obrázek 10: *L. flaviprymna*  
(zdroj: en.wikipedia.org)

## 7 Cíle práce

Hlavním cílem tohoto výzkumu je srovnání morfologie a motility spermií mezi jednotlivými druhy panenek, zahrnující *L. striata domestica*, *L. punctulata*, *L. castaneothorax*, *L. atricapilla*, *L. malacca* a *L. flaviprymna*. Tato práce se zaměřuje na následující otázky:

1. Liší se morfologie spermií mezi druhy rodu *Lonchura*?
2. Liší se mezi druhy míra vnitrodruhové variability v morfologii spermií?
3. Liší se motilita spermií mezi druhy rodu *Lonchura*?
4. Jaké morfologické charakteristiky spermií ovlivňují jejich motilitu?
5. Je morfologie a motilita spermií ovlivněna domestikací?

## 8 Materiál a metody

### 8.1 Shromáždění jedinců

Od roku 2018 byly shromažďovány jednotlivé druhy panenek. V ideálním případě jsme se je pokusili získat od různých chovatelů, aby se maximalizovala nepříbuznost jedinců v rámci druhu. Jedinci byli umístěni do chovů v Ústavu biologie obratlovců ve Studenci. Zde byli na počátku sezóny samci připuštěni k samicím.

Do výzkumu byli zahrnuti dospělí jedinci 6 druhů panenek - *L. striata domestica*, *L. punctulata*, *L. castaneothorax*, *L. atricapilla*, *L. malacca*, *L. flaviprymna*. Kromě *L. flaviprymna* a *L. malacca* jsme sampovali spermie u minimálně 4 jedinců na druh. U *L. flaviprymna* bylo obtížné získat spermie, a proto je v našem vzorku pouze jeden jedinec na druh. U *L. malacca* se nám nepodařilo osamplovat dostatek jedinců, jelikož tento druh není v české republice běžně chovaný a během covid pandemie bylo obtížné provést další sampoování v zahraničí. Celkem se účastnilo výzkumu 36 jedinců rodu *Lonchura* (Tabulka 1).

Tabulka 1: Tabulka znázorňuje všechny jedince, kteří jsou ve výzkumu zahrnuti, jejich původ a využití vzorku spermatu

Druh	ID jedince	Původ	Využití vzorku
<i>L. striata domestica</i>	CZ194401	Vysočina (Studeneč)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ181781 1	Vysočina (Náměšť nad Oslavou)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ181782	Vysočina (Náměšť nad Oslavou)	Morfologie
<i>L. str. domestica</i>	CZ181798	Vysočina (Třebíč)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ181800	Vysočina (Třebíč)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ183890	Středočeský kraj (Hradištiko)	Morfologie
<i>L. str. domestica</i>	CZ183891	Středočeský kraj (Hradištiko)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ183904	Středočeský kraj (Hradištiko)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ183906	Středočeský kraj (Hradištiko)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ190955	Středočeský kraj (Hradištiko)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ190956	Středočeský kraj (Hradištiko)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ190958	Středočeský kraj (Hradištiko)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ1818611	Jihomoravský kraj (Brno)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ1818613	Jihomoravský kraj (Brno)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ190957	Jihomoravský kraj (Brno)	Morfologie/motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ181799	Vysočina (Třebíč)	Motilita
<i>L. str. domestica</i>	IVB0029	Vysočina (Studeneč)	Motilita
<i>L. str. domestica</i>	IVB1022	Vysočina (Studeneč)	Motilita
<i>L. str. domestica</i>	CZ194403	Vysočina (Studeneč)	Motilita
<i>L. punctulata</i>	NB18116	Polsko	Morfologie
<i>L. punctulata</i>	NB17008	Polsko	Morfologie
<i>L. punctulata</i>	NB17015	Polsko	Morfologie/motilita
<i>L. punctulata</i>	NB18019 1	Polsko	Morfologie/motilita
<i>L. castaneothorax</i>	CZ163759	Liberecký kraj (Stružnice)	Morfologie/motilita
<i>L. castaneothorax</i>	CZ180088	Zlínský kraj (Rožnov pod Radhoštěm)	Morfologie/motilita
<i>L. castaneothorax</i>	CZ160495 1	Liberecký kraj (Stružnice)	Morfologie/motilita
<i>L. castaneothorax</i>	CZ173988	Vysočina (Stařeč)	Motilita
<i>L. castaneothorax</i>	CZ163168 1	Liberecký kraj (Stružnice)	Morfologie/motilita
<i>L. atricapilla</i>	6AHP233	Nizozemsko (Almelo)	Morfologie/motilita
<i>L. atricapilla</i>	CZ177519	Vysočina (Výskytňá)	Morfologie/motilita
<i>L. atricapilla</i>	EPN168	Nizozemsko (Almelo)	Morfologie/motilita
<i>L. atricapilla</i>	EPN179	Nizozemsko (Almelo)	Morfologie/motilita
<i>L. atricapilla</i>	CZ177520 1	Vysočina (Výskytňá)	Morfologie/motilita
<i>L. malacca</i>	CZ181791	Plzeňský kraj (Plzeň)	Morfologie
<i>L. malacca</i>	CZ181790	Plzeňský kraj (Plzeň)	Morfologie/motilita
<i>L. flaviprymna</i>	CZ15036	Zlínský kraj (Rožnov pod Radhoštěm)	Morfologie

## 8.2 Odběr vzorků spermií

Ejakulát byl odebírán v jednotlivých obdobích v letech 2018 až 2020 neinvazivní metodou kloakální masáže (Albrecht et al. 2013) pomocí tenké skleněné kapiláry. Bohužel se nám nepodařilo vždy při prvních pokusech získat vzorek spermatu od všech jedinců. U některých druhů panenek (*L. striata domestica*) bylo poměrně lehké vzorek spermatu pomocí kloakální masáže získat. U jiných byla situace opačná (*L. flaviprymna*) a i po několika pokusech jsme neuspěli. V těchto případech jsme odebírání vzorku opakovali po několika měsících.

Odebraný ejakulát byl vložen do 5  $\mu$ l vyhřátého (40 °C) media DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Advanced D-MEM, Invitrogen, Carlsbad, CA). Ihned po smíchání byla z této směsi odebrána kapka, která byla kápnuta na předem vyhřátá vícekomůrková mikroskopická Leja sklíčka (20  $\mu$ m hluboká, čtyř komorová, Leja, Nieuw-Vennep, The Netherlands). Pod mikroskopem bylo okamžitě zjišťováno, zda jsou ve vzorku přítomny spermie a zda se pohybují. V případě, že spermie nebyly přítomny, kloakální masáž a stejný postup pod mikroskopem se opakovaly. V případě přítomnosti spermií byl zhotoven videozáznam pod světelným mikroskopem Olympus CX41 s fázovým kontrastem a digitální kamerou UI1540-C, při 100násobném zvětšení, který byl použit pro následné měření motility. S cílem zachytit motilitu většího množství spermií, bylo na tomto krátkém videu (5-6 sec.) natočeno několik oblastí.

## 8.3 Příprava preparátů spermií

Zbytek spermií v DMEM byl konzervován přidáním 20  $\mu$ l 5% roztoku formalínu. Následně byla jeho část využita na přípravu preparátů pro měření morfologie spermií. Na podložní sklíčka jsem nanasla pomocí automatické pipety 10  $\mu$ l směsi odebraných spermií v roztoku formalínu. Po zaschnutí jsem opláchla sklíčka pod destilovanou vodou za účelem odstranění krystalků formalínu a lepší viditelnosti pod mikroskopem. Takto připravené preparáty jsem prohlížela pod světelným mikroskopem se zvětšením 40x. V první části výzkumu jsem od každého jedince nafotila minimálně 10 spermií, ale kvůli větší průkaznosti dat, jsem v dalším samplování fotila alespoň 20 spermií na jedince v programu QuickPhoto Industrial. 2.3.

## 8.4 Měření spermií

Od každého jedince jsem změřila 10 spermií (u 5 jedinců) nebo později 20 spermií (u 26 jedinců, viz Tabulka 2). Spermie s poničeným krčkem, ulomeným bičíkem, i jinými abnormalitami jsem vyjmula z měření. Měření jsem prováděla pro individuální části spermií. Jednotlivě jsem tedy změřila délku hlavičky, krčku a bičíku každé spermie s přesností na desetiny mikrometrů ( $\mu\text{m}$ ). Na základě těchto tří hodnot byla v programu QuickPhoto Industrial 2.3 vypočtena celková délka spermie. Veškerá měření jsem prováděla sama, abych předešla případným chybám či rozdílům způsobených odlišným typem měření jinou osobou.

## 8.5 Měření motility

Videozáznamy pohybujících se spermií byly vyhodnoceny v programu CASA (Computer Assisted Sperm Analysis, CEROS, Hamilton Thorne, Inc. USA). Motilita spermií byla měřena jako rychlost na celkové trajektorii, která se skládá ze všech bodů, kterými spermie proplavala. Tato hodnota, která odráží reálnou dráhu spermie nejlépe, je označována jako VCL (velocity curvilinear) (Fitzpatrick et al. 2007). Motilita byla naměřena u 30 jedinců (Tabulka 3). Ve většině případů šlo o stejné jedince jako v případě morfologie spermií, několik málo jedinců bylo jiných (Tabulka 1). Všechny hodnoty byly měřeny v  $\mu\text{m/s}$ . U *L. flaviprymna* nebylo možné motilitu změřit z důvodu absence mobilních spermií. Stejně tak u *L. punctulata* a *L. malacca* nebylo získáno dostatečné množství pohybujících se spermií.

## 8.6 Statistická analýza dat

Jedinci, kterým byly vzorky spermatu odebrány opakovaně, byly do statistiky zařazeni pouze jednou. Ke statistické analýze byly použity statistické programy Minitab a R. Počítala jsem proměnlivost morfologie spermií (i) v rámci jedince, (ii) mezi jedinci stejného druhu, a (iii) mezi druhy.

Pro znázornění variability morfologie spermie v rámci jedince jsem použila koeficient variance (CV), který se udává v % - viz níže vzorec pro výpočet. CV byl počítán z naměřených hodnot morfologie spermií na základě 10 či 20 spermií pro každého jedince podle vzorečku:



$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

kde  $\sigma$  je směrodatná odchylka a  $\bar{x}$  je aritmetický průměr z naměřených hodnot

K určení míry variability mezi jedinci v rámci druhu jsem spočítala CV obdobně jak je uvedeno výše. CV ale byl počítán z průměrných hodnot morfologie spermií na jedince přes všechny jedince daného druhu. Kromě CV, jsem ještě spočítala CV index, který na rozdíl od CV bere v potaz počet analyzovaných jedinců v rámci druhu.

$$CV \text{ index} = (\sigma/\bar{x}) * 100 * (1 - 1/4 N)$$

kde  $N$  je počet jedinců v rámci druhu.

Protože míra variability celkové délky spermie odráží míru EPP (Lifjeld et al. 2010), odhadla jsem na základě CV index míru EPP u jednotlivých druhů panenek dle vzorce:

$$SIN(0,8614 - 1,08826 * LOG(spermCV))^2$$

K testování, zda se průměrná délka jednotlivých částí spermií a celkové délky spermií liší mezi druhy, jsem použila statistické metody ANOVA (Analysis of variance), stejně tak ke zhodnocení rozdílů motility mezi druhy. Abych zjistila, které druhy vybočují, použila jsem posthoc Tukey test. Pro zjištění vztahu mezi motilitou a morfologií spermie jsem použila mixed effect model, kde druh byl použit jako random faktor. Pro všechny analýzy byly za signifikantní považovány výsledky s  $p < 0,05$ .

Tabulka 2: Přehled hodnot průměrných délek individuálních částí spermií (hlavičky, krčku a bičíku) a celkových délek spermií u jednotlivých druhů rodu *Lonchura* ( $\mu\text{m}$ ). Koeficienty variance pro individuální části spermií a celkovou délku spermie v rámci jedince.

Druh	ID jedince	Datum samplování	Počet spermií	průměr				koeficient variance			
				Hlavička	Krček	Bičik	Celková délka spermie	Hlavička	Krček	Bičik	Celková délka spermie
<i>L. striata domestica</i>	CZ194401	12.07.2019	20	11,570	34,040	22,620	68,230	4,954	7,938	11,133	2,727
<i>L. str. domestica</i>	CZ181781_1	30.10.2018	10	12,070	35,080	20,620	67,770	5,593	10,038	21,934	3,968
<i>L. str. domestica</i>	CZ181782	09.10.2019	10	11,930	34,090	19,380	65,400	9,839	11,667	24,939	3,659
<i>L. str. domestica</i>	CZ181798	09.10.2019	20	11,150	32,755	21,565	65,470	6,651	7,490	14,653	2,259
<i>L. str. domestica</i>	CZ181800	09.10.2019	20	11,595	33,025	21,290	65,910	2,662	7,430	11,048	3,603
<i>L. str. domestica</i>	CZ183890	09.10.2019	20	11,890	37,810	16,385	66,085	7,437	6,874	18,811	4,109
<i>L. str. domestica</i>	CZ183891	09.10.2019	20	12,515	38,890	16,420	67,825	4,077	6,581	20,648	4,586
<i>L. str. domestica</i>	CZ183904	09.10.2019	20	11,560	33,780	15,985	61,325	9,687	6,186	17,965	4,493
<i>L. str. domestica</i>	CZ183906	09.10.2019	20	11,805	32,475	21,600	65,880	7,190	14,188	23,144	5,190
<i>L. str. domestica</i>	CZ190955	09.10.2019	20	11,595	37,840	17,245	66,680	6,499	5,851	12,788	3,744
<i>L. str. domestica</i>	CZ190956	09.10.2019	20	11,980	33,545	23,580	69,105	13,599	16,742	21,206	5,999
<i>L. str. domestica</i>	CZ190958	09.10.2019	20	11,835	39,970	18,955	70,760	7,327	7,041	16,775	5,123
<i>L. str. domestica</i>	CZ1818611	09.10.2019	20	11,830	35,380	19,655	66,865	5,831	6,080	10,211	3,548
<i>L. str. domestica</i>	CZ1818613	09.10.2019	20	10,960	35,740	23,120	69,820	6,515	6,388	9,492	2,715
<i>L. str. domestica</i>	CZ190957	09.10.2019	20	12,735	32,645	23,450	68,830	6,880	11,292	23,322	6,794
<i>L. punctulata</i>	NB18116	12.07.2019	20	10,435	39,995	20,635	71,065	4,278	5,147	10,637	1,923
<i>L. punctulata</i>	NB17008	12.07.2019	20	12,005	35,350	21,225	68,580	6,466	4,506	9,377	2,426
<i>L. punctulata</i>	NB17015	12.07.2019	20	11,635	40,305	21,695	73,635	4,268	5,531	13,533	2,718
<i>L. punctulata</i>	NB18019_1	30.10.2018	20	11,300	35,805	18,100	65,205	3,106	7,904	14,744	3,132
<i>L. castaneothorax</i>	CZ163759	12.07.2019	20	10,355	34,190	19,650	64,195	5,105	6,793	14,482	4,409
<i>L. castaneothorax</i>	CZ180088	12.07.2019	20	10,960	34,040	18,000	63,000	7,199	5,560	8,827	3,257
<i>L. castaneothorax</i>	CZ160495_1	30.10.2018	10	12,150	36,890	19,870	68,910	3,747	7,957	15,199	1,567
<i>L. castaneothorax</i>	CZ163168_1	30.10.2018	10	11,660	34,900	18,510	65,070	8,813	5,151	17,627	4,680
<i>L. atricapilla</i>	6AHP233	12.07.2019	20	11,400	34,040	24,505	69,945	3,933	9,472	18,200	3,551
<i>L. atricapilla</i>	CZ177519	12.07.2019	20	10,505	36,365	17,565	64,435	5,961	6,479	12,636	1,939
<i>L. atricapilla</i>	EPN168	12.07.2019	20	12,175	33,795	21,265	67,235	4,751	6,127	10,662	2,446
<i>L. atricapilla</i>	EPN179	12.07.2019	20	11,440	31,085	24,315	66,840	5,209	8,332	11,600	3,087
<i>L. atricapilla</i>	CZ177520_1	30.10.2018	10	11,200	36,340	19,610	67,150	11,972	5,894	20,974	4,939
<i>L. malacca</i>	CZ181791	9.10.2019	20	12,530	38,900	16,290	67,720	4,103	6,213	21,913	4,739
<i>L. malacca</i>	CZ181790	09.10.2019	20	11,940	38,435	16,065	66,440	6,967	5,037	16,072	3,351
<i>L. flaviprymna</i>	CZ15036	30.10.2018	10	13,340	30,730	19,510	63,580	6,373	13,888	18,874	3,191

Tabulka 3: Naměřené hodnoty motility spermií mezi druhy *Lonchura* ( $\mu\text{m/s}$ ).

Druh	ID jedince	Datum	VCL	Počet spermií
<i>L. striata domestica</i>	CZ181798	2020	58,46598	97
<i>L. str. domestica</i>	CZ181799	2020	78,22519	270
<i>L. str. domestica</i>	CZ181800	2020	93,81765	170
<i>L. str. domestica</i>	CZ183891	2020	94,55231	195
<i>L. str. domestica</i>	CZ183904	2020	70,46351	74
<i>L. str. domestica</i>	CZ183906	2020	85,79541	218
<i>L. str. domestica</i>	CZ1818611	2020	83,06986	219
<i>L. str. domestica</i>	CZ1818613	2020	78,99375	352
<i>L. str. domestica</i>	CZ190955	2020	39,91732	127
<i>L. str. domestica</i>	CZ190956	2020	47,86122	196
<i>L. str. domestica</i>	CZ190957	2020	71,59925	398
<i>L. str. domestica</i>	CZ190958	2020	85,69675	338
<i>L. str. domestica</i>	IVB0029	2020	93,10429	350
<i>L. str. domestica</i>	IVB1022	2020	79,42342	333
<i>L. str. domestica</i>	CZ181781	2019	41,25000	356
<i>L. str. domestica</i>	CZ194401	2019	34,24444	198
<i>L. str. domestica</i>	CZ194403	2019	55,25692	253
<i>L. punctulata</i>	NB17015	2019	32,13678	454
<i>L. punctulata</i>	NB18016	2019	35,36400	300
<i>L. castaneothorax</i>	CZ160495	2019	33,30000	16
<i>L. castaneothorax</i>	CZ163168	2019	34,90312	385
<i>L. castaneothorax</i>	CZ163759	2019	31,40000	47
<i>L. castaneothorax</i>	CZ173988	2019	34,60323	402
<i>L. castaneothorax</i>	CZ180088	2019	48,26434	129
<i>L. atricapilla</i>	6AHP233	2019	44,67527	186
<i>L. atricapilla</i>	CZ177519	2019	67,90630	524
<i>L. atricapilla</i>	CZ177520	2019	46,59098	133
<i>L. atricapilla</i>	EPN168	2019	34,51946	149
<i>L. atricapilla</i>	EPN179	2019	65,41536	306
<i>L. malacca</i>	CZ181790	2020	42,69588	194

## 9 Výsledky

### 9.1 Liší se morfologie spermií mezi druhy rodu *Lonchura*?

Prvním cílem bylo porovnat délky jednotlivých částí spermií a jejich celkové délky mezi druhy rodu *Lonchura*. Morfologie byla změřena u 560 spermií od 31 jedinců náležících do 6 různých druhů (Tabulka 2).

Prvním posuzovaným parametrem byla celková délka spermie. Nejdelší spermie vykazovala *L. punctulata* (69,64  $\mu\text{m}$ ) a nejkratší *L. flaviprymna* (63,58  $\mu\text{m}$ ) (Obrázek 11). Variabilita v délce spermií v rámci druhu však byla značná. Na základě statistiky bylo zjištěno, že se celková délka spermie mezi druhy významně neliší (ANOVA:  $p=0,171$ ) (Tabulka 4).

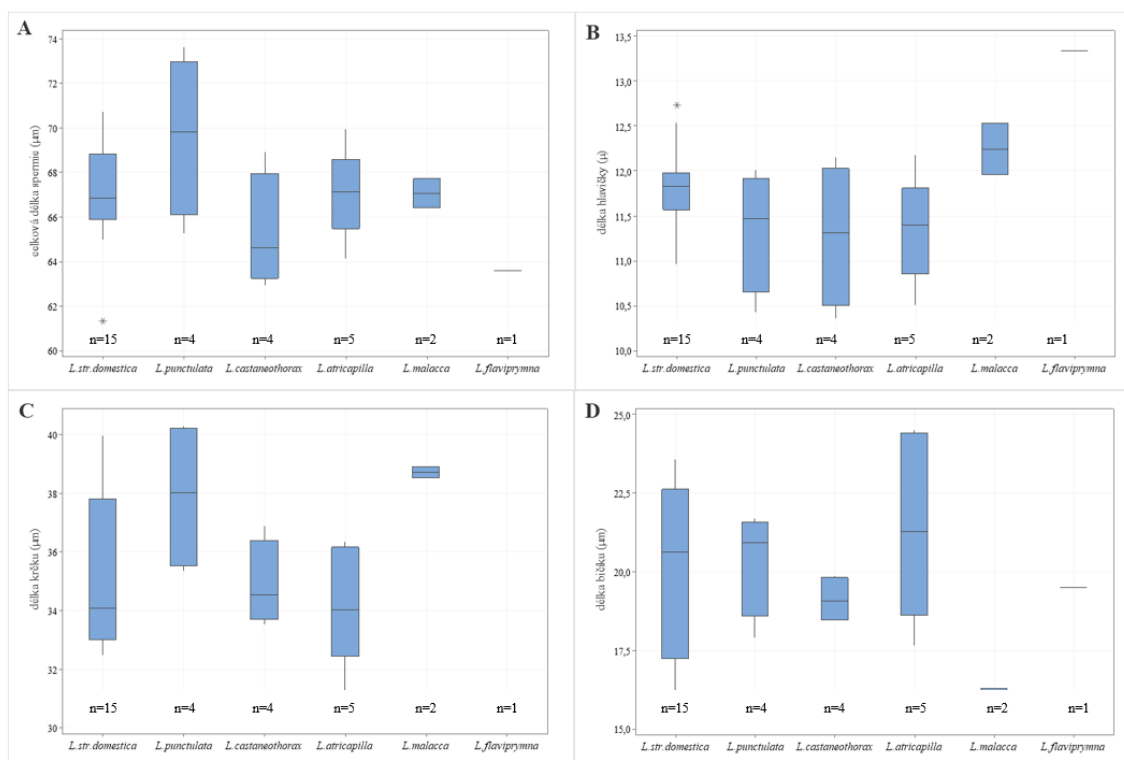
Další posuzovanou částí byla délka hlavičky spermie. Nejkratší hlavičku měla *L. castaneothorax* (11,281 $\mu\text{m}$ ), nejdelší hlavičkou se vyznačovala *L. flaviprymna* (13,34  $\mu\text{m}$ ). Analýza variance ukázala, že se délka hlavičky mezi druhy signifikantně liší (ANOVA:  $p= 0,018$ ) (Tabulka 4, Obr. 11). Pro detailnější porovnání byl použit Tukey test, na základě kterého bylo zjištěno, že rozdíly délek hlaviček jsou signifikantní mezi *L. flaviprymna* a *L. punctulata*, *L. flaviprymna* a *L. castaneothorax*, a dále *L. flaviprymna* a *L. atricapilla* (Obr. 12). Tyto výsledky je ale třeba brát s rezervou, protože pro *L. flaviprymna* byly spermie měřeny jen u jednoho jedince.

Krček byl další částí spermie, která byla hodnocena. Bylo zjištěno, že se délka krčku mezi druhy signifikantně liší (ANOVA:  $p=0,027$ ) (Tabulka 4). Nejkratším krčkem disponovala *L. flaviprymna* (30,73  $\mu\text{m}$ ), naopak nejdelší krček měla *L. malacca* (38,715  $\mu\text{m}$ ) (Obr. 11). Bohužel i u obou druhů bylo měření založeno na málo jedincích. Dle Tukey testu však nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými dvojicemi druhů (Obr. 13).

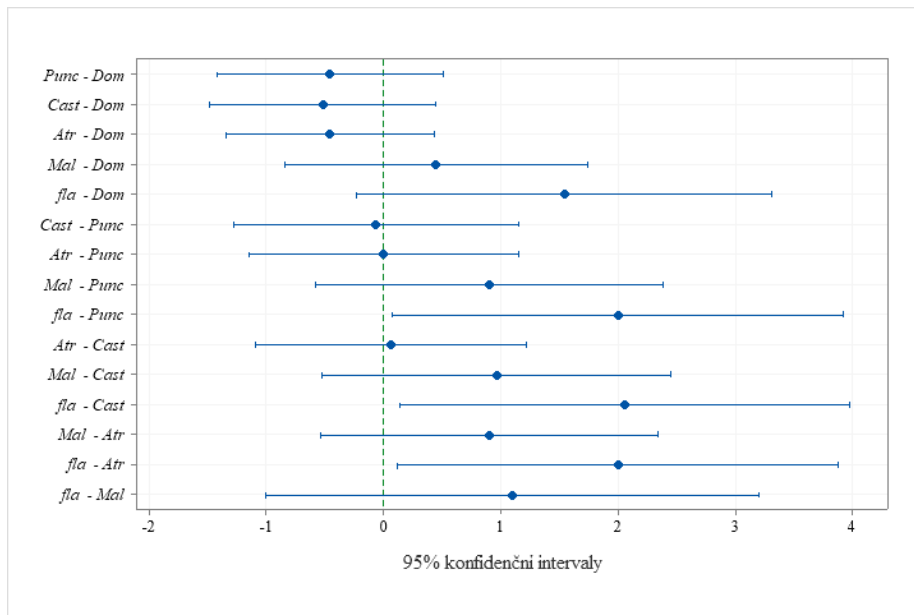
Poslední částí, která byla mezi druhy srovnávána, byla délka bičíku spermie. Nejdelší bičík se vyskytoval u *L. atricapilla* (21,47  $\mu\text{m}$ ), nejkratší měla *L. malacca* (16,115  $\mu\text{m}$ ) (Obr. 11). V této části spermie však nebyly shledány žádné signifikantní rozdíly mezi druhy (ANOVA:  $p= 0,206$ ) (Tabulka 4).

Tabulka 4: Analýza variance (ANOVA) pro celkovou délku spermie, délku hlavičky, krčku a bičíku, kde druh byl vysvětlujícím faktorem. DF je počet stupňů volnosti, Adj SS je součet čtverců odchylek od průměru, Adj MS je průměrný čtverec, F-Value je hodnota testového kritéria, které porovnává dvojici modelů a P-Value určuje, na jaké hladině významnosti je možné zamítnout nulovou hypotézu ( $H_0$ ).

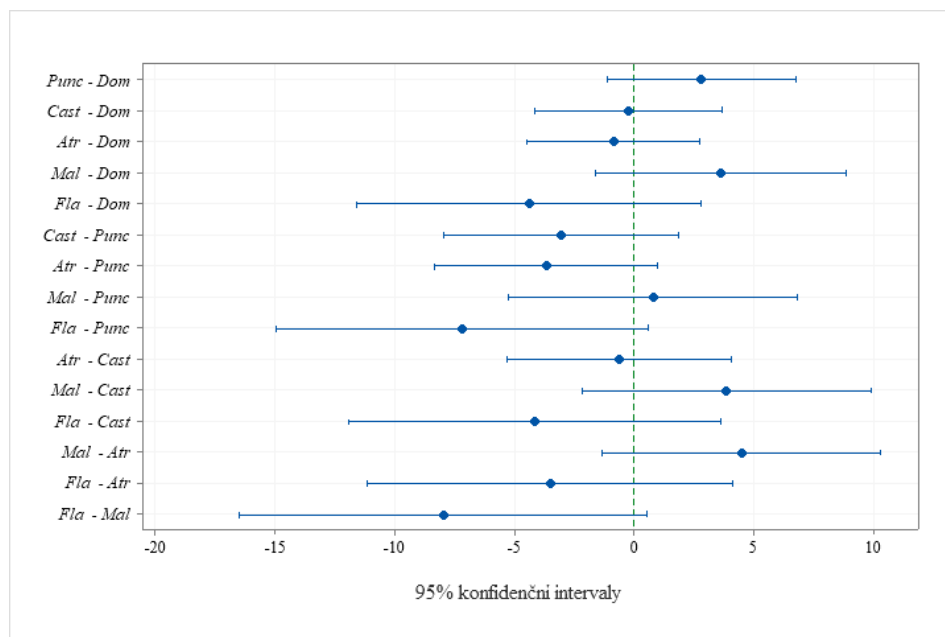
	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
<b>Celková délka spermie</b>					
Factor (druh)	5	51,42	10,285	1,70	0,171
Error	25	150,92	6,037		
Total	30	202,34			
<b>Délka hlavičky</b>					
Factor (druh)	5	5,263	1,0526	3,40	<b>0,018</b>
Error	25	7,737	0,3095		
Total	30	12,999			
<b>Délka krčku</b>					
Factor (druh)	5	78,24	15,648	3,08	<b>0,027</b>
Error	25	127,02	5,081		
Total	30	205,26			
<b>Délka bičíku</b>					
Factor (druh)	5	44,97	8,993	1,57	0,206
Error	25	143,55	5,742		
Total	30	188,51			



Obrázek 11: A) Celková délka spermie, B) délka hlavičky, C) délka krčku, D) délka bičíku u jednotlivých druhů *Lonchura*. Horní a spodní hranice boxplotů označují 3. a 1. kvartil, vodorovná čára uvnitř boxplotu značí medián, fousky signalizují polohu hodnot více vzdálených od mediánu, hvězdička označuje odlehlou hodnotu.



Obrázek 12: Grafické vyjádření Tukey testu zobrazujícího 95% konfidenční intervaly pro rozdíly v délce hlavičky mezi druhy. Pokud 95% konfidenční interval neobsahuje 0, odpovídající průměry v délce hlaviček spermií jsou signifikantně odlišné.



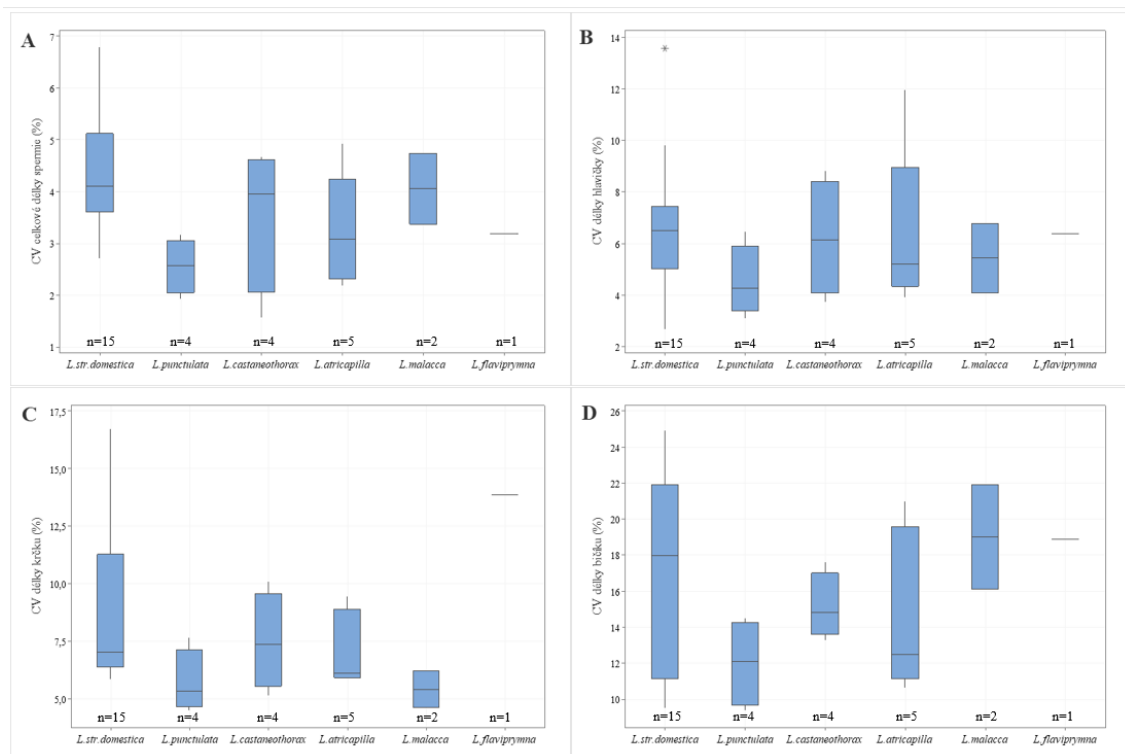
Obrázek 13: Grafické vyjádření Tukey testu zobrazujícího 95% konfidenční intervaly pro rozdíly v délce krčků mezi druhy. Pokud 95% konfidenční interval neobsahuje 0, odpovídající průměry v délce krčků spermií jsou signifikantně odlišné.

## 9.2 Liší se mezi druhy míra vnitrodruhové variability v morfologii spermii?

Pro vyjádření míry variability v délce spermie a jejích součástí v rámci jedince jsem použila CV (variační koeficient). Na základě analýzy variance bylo zjištěno, že CV v rámci jedince pro celkovou délku spermie se signifikantně neliší mezi druhy (ANOVA:  $p=0,102$ ) (Tabulka 5). Stejně tak koeficient variance pro délku hlavičky (ANOVA:  $p=0,718$ ), délku krčku (ANOVA:  $p=0,091$ ) a délku bičíku (ANOVA:  $p=0,321$ ) se signifikantně nelišily (Tabulka 5, Obr. 14), což naznačuje, že je variabilita spermii v rámci jedince obdobná pro jednotlivé druhy *Lonchur*.

Tabulka 5: Analýza variance (ANOVA) pro koeficient variance (CV) celkové délky spermie, délky hlavičky, krčku a bičíku v rámci jedince. Vysvětlujícím faktorem byl druh. DF je počet stupňů volnosti, Adj SS je součet čtverců odchylek od průměru, Adj MS je průměrný čtverec, F-Value je hodnota testového kritéria, které porovnává dvojici modelů a P-Value určuje, na jaké hladině významnosti je možné zamítnout nulovou hypotézu ( $H_0$ ).

	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
<b>Celková délka spermie</b>					
Factor (druh)	5	12,53	2,505	2,08	0,102
Error	25	30,11	1,204		
Total	30	42,64			
<b>Délka hlavičky</b>					
Factor (druh)	5	18,94	3,788	0,58	0,718
Error	25	164,65	6,586		
Total	30	183,59			
<b>Délka krčku</b>					
Factor (druh)	5	80,84	16,168	2,16	0,091
Error	25	186,74	7,470		
Total	30	267,58			
<b>Délka bičíku</b>					
Factor (druh)	5	126,8	25,37	1,24	0,321
Error	25	512,3	20,49		
Total	30	639,1			



Obrazek 14: Koefficient variance (CV) A) celkové délky spermie, B) hlavičky, C) krčku a D) bičíku spermie. Horní a spodní hranice boxplotů označují 3. a 1. kvartil, vodorovná čára uvnitř boxplotu značí medián, fousky signalizují polohu hodnot více vzdálených od mediánu, hvězdička označuje odlehlou hodnotu.

Pro odhad variability celkové délky spermie v rámci druhu jsem spočítala (i) CV, (ii) CV index a na jejich základě spočítala míru EPP pro jednotlivé druhy. Nejvyšší CV index měla *L. punctulata* (4,799) což reflektuje nejnižší hodnotu EPP (0,014), tzn. že pouze 1,4 % mláďat může být zplozeno mimopárově. Opakem je druh *L. malacca*, u kterého CV index vykazoval nejnižší hodnotu (1,190) a zároveň i nejvyšší úroveň EPP (0,494) což představuje 49,4 % mimopárových mláďat. To by znamenalo, že *L. malacca* je ve srovnání s ostatními druhy *Lonchura* promiskuitnější. Pro potvrzení toho předpokladu by bylo nezbytné zahrnout do výzkumu větší množství jedinců, jelikož byla morfologie v rámci této studie změřena pouze u 2 jedinců *L. malacca*, což může vést k nepřesnému odhadu.

Tabulka 6: Hodnoty CV, CV indexu a míry EPP pro jednotlivé druhy rodu *Lonchura*.

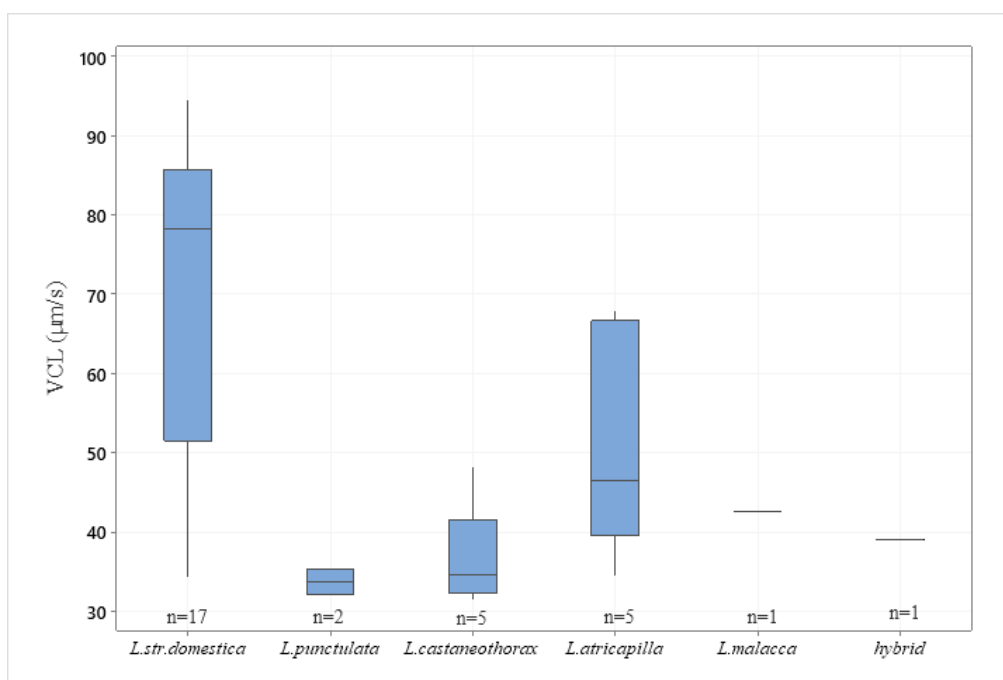
Druh	CV druh	CV index druh	EPP
	celková délka spermie	celková délka spermie	celková délka spermie
<b>L. str. domestica</b>	3,455	3,398	0,0781
<b>L. punctulata</b>	5,119	4,799	0,014
<b>L. castaneothorax</b>	3,943	3,696	0,058
<b>L. atricapilla</b>	3,071	2,918	0,121
<b>L. malacca</b>	1,360	1,190	0,494

### 9.3 Motilita spermií

Motilita byla změřena u 30 jedinců. Výsledky ANOVY ukazují, že se motilita, měřena jako VCL, mezi druhy signifikantně liší ( $p=0,005$ ) (Tabulka 7). Nejrychlejší spermie měla *L. str. domestica* ( $70,10 \mu\text{m/s}$ ), nejpomalejší *L. punctulata* ( $33,75 \mu\text{m/s}$ ) (Obr. 15). Následný Tukey test odhalil statisticky významný rozdíl v motilitě spermií mezi *L. str. domestica* a *L. castaneothorax* (Obr.16).

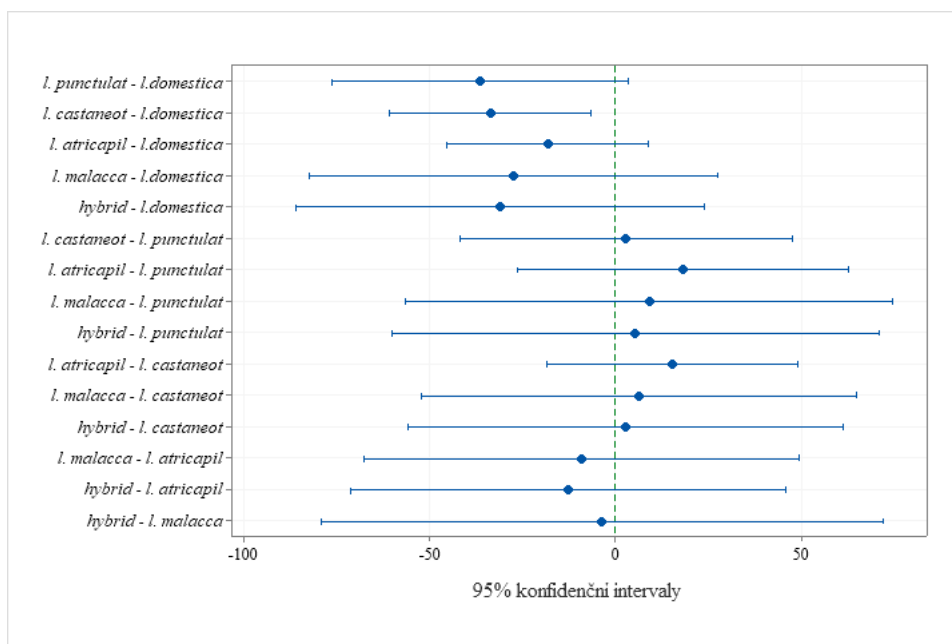
Tabulka 7: Tabulka vyjadřuje statistické výsledky ANOVA pro motilitu spermií mezi druhy *Lonchura*. DF je počet stupňů volnosti, Adj SS je součet čtverců odchylek od průměru, Adj MS je průměrný čtverec, F-Value je hodnota testového kritéria, které porovnává dvojici modelů a P-Value určuje, na jaké hladině významnosti je možné zamítnout nulovou hypotézu ( $H_0$ ).

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor (druh)	5	6755	1351,0	4,52	<b>0,005</b>
Error	25	7468	298,7		
Total	30	14224			



Obrázek 15: Motilita spermií mezi druhy *Lonchura*. Horní a spodní hranice boxplotů označují 3. a 1. kvartil, vodorovná čára uvnitř boxplotu značí medián, fousky signalizují polohu hodnot více vzdálených od mediánu.





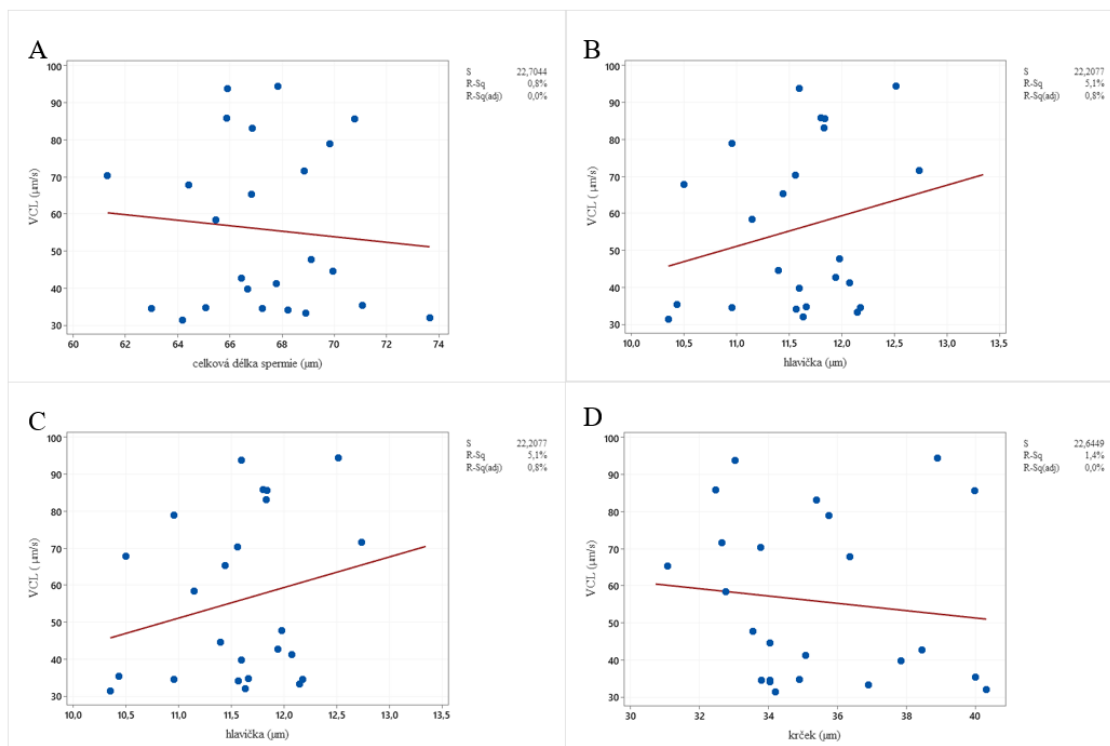
Obrázek 16: Grafické vyjádření Tukeyho testu zobrazujícího 95% konfidenční intervaly rozdílů v motilitě spermií mezi druhy. Pokud 95% konfidenční interval neobsahuje 0, odpovídající průměry v motilitě spermií jsou signifikantně odlišné.

#### 9.4 Jaké morfologické charakteristiky ovlivňují motilitu spermií?

Pro zjištění možného vztahu mezi motilitou spermií a jejich morfologií, byl použit mixed efekt model, kde VCL byla vysvětlovanou proměnnou a vysvětlujícími proměnnými byly: (i) délka hlavičky, krčku a bičíku a (ii) celková délka spermie. Kvůli korelaci mezi celkovou délkou spermie a jejími součástmi byla celková délka spermie testovaná v separátním modelu. Druh byl použit jako random faktor. Nebyl nalezen žádný signifikantní vztah mezi celkovou délkou spermie a motilitou spermie ( $p=0,560$ ) (Tabulka 8). Stejně tak nebyl nalezen vztah mezi délkou jednotlivých částí spermie a motilitou spermie (Tabulka 8). Tyto výsledky naznačují, že morfologie spermie nemá u *Lonchur* vliv na rychlost pohybu spermie (Obr.17).

Tabulka 8: Výstup mixed efekt modelu pro motilitu celkové délky spermie, délky hlavičky, krčku a bičíku, kde SE je přibližná standardní odchylka populace, DF je počet stupňů volnosti, t-value měří velikost rozdílu vzhledem k odchylce a P-Value určuje, na jaké hladině významnosti je možné zamítnout nulovou hypotézu ( $H_0$ ).

Proměnná	Koeficient	SE	DF	t-value	P-value
<b>Celková délka spermie</b>	-0,93	1,56	18	-0,59	0,560
<b>Délka hlavičky</b>	1,24	7,04	16	0,18	0,862
<b>Délka krčku</b>	-0,68	2,03	16	-0,34	0,741
<b>Délka bičíku</b>	-1,44	1,92	16	-0,75	0,466



Obrázek 17: Vztah motility a A) celkové délky spermie, B) délky hlavičky, C) délky krčku a D) délky bičíku spermie získaný lineární regresí. R-Sq představuje podíl rozptylu pro závislou proměnnou, která je vysvětlena nezávislou proměnnou nebo proměnnými v regresním modelu.

## 9.5 Je morfologie a motilita spermii ovlivněna domestikací?

Morfologie a motilita spermii u *L. striata domestica* by mohla být ovlivněna dlouhodobou domestikací a odchovem tohoto druhu v zajetí, jelikož jsou míry EPP u domestikovaných druhů astrildovitých ptáků mnohem vyšší než u divokých (Griffith et al. 2002; Griffith & Buchanan 2010). Díky zvýšené kompetici spermii, by jejich morfologie v rámci populace mohla být méně variabilní a spermie by mohly být rychlejší, případně delší. Na druhou stranu mohou být v zajetí uvolněné některé selekční tlaky.

Výsledky v této diplomové práci ukazují, že *L. str. domestica* má ze všech druhů nejrychlejší spermie. Nicméně statisticky signifikantně odlišná rychlost je jen vůči *L. castaneothorax* (Obr. 16). Koeficient variance v rámci jedince v celkové délce spermie, její hlavičky, krčku či bičíku se u *L.str. domestica* signifikantně neodlišuje od

ostatních druhů (Obr.14). Stejně tak celková délka spermie, délka hlavičky, krčku a bičíku není signifikantně odlišná u *L. str. domestica* od ostatních druhů (Obr.11). Taktéž CV mezi jedinci v rámci druhu a z něj odhadnutá míra EPP byla srovnatelná u *L. domestica* a jinými druhy (Tabulka 6), i když odhady u některých druhů mohou být nepřesné kvůli malému počtu analyzovaných jedinců. Naše výsledky tedy nenaznačují, že by domestikace měla výrazný vliv na morfologii spermií u panenek, ale mohla by vést k rychlejší motilitě.

## 10 Diskuze

V rámci diplomové práce jsem zkoumala variabilitu v morfologii a motilitě spermií mezi šesti blízce příbuznými druhy astrildovitých pěvců rodu *Lonchura*, a vliv jednotlivých morfologických charakteristik spermií na jejich motilitu. Naše výsledky ukazují, že se zkoumané druhy liší délkou hlavičky spermie a délkou krčku spermie. Délka bičíku a celková délka spermie se mezi druhy nelišila. Jednotlivé druhy se sice signifikantně lišily motilitou spermií, nicméně jsme nenalezli žádnou souvislost mezi motilitou a morfologickými charakteristikami spermií. Míra variability v délce jednotlivých částí spermie a její celkové délky v rámci jedince se mezi druhy signifikantně nelišila. Na základě míry variability celkové délky spermie mezi jedinci v rámci druhu jsme odhadli míru EPP pro jednotlivé druhy, která odráží míru postkopulačního pohlavního výběru. Nicméně, tyto odhady mohou být u některých druhů nepřesné z důvodu nízkého počtu analyzovaných jedinců na druh. Domestikovaný druh *L. str. domestica* vykazoval oproti ostatním druhům rychlejší spermie, nicméně morfologicky se od ostatních druhů výrazně nelišily. Níže naše zjištění podrobněji diskutuji.

### 10.1 Srovnání morfologie a motility spermií mezi jednotlivými druhy rodu

#### *Lonchura*

Výsledky prezentované v této diplomové práci potvrzují, že morfologie spermií se často liší i mezi blízce příbuznými druhy. Podobné zjištění bylo pozorováno např. mezi blízce příbuznými druhy slavíků (Albrecht et al. 2019). U dvou poddruhů pěnkavy dlouhoocasé (*Poephila acuticauda*) (Rowe et al. 2015) byly nalezeny také rozdíly v délce spermie, stejně tak u blízce příbuzných druhů, vrabce domácího (*Passer domesticus*) a vrabce pokřovního (*Passer hispaniolensis*) (Cramer et al. 2015). Nejvýrazněji se mezi druhy panenek lišila délka krčku a hlavičky, naopak délka bičíku se nelišila. Podobné morfologické změny se objevily i u jiných studií na pěvcích (např. Schmoll & Kleven 2011; Lüpold et al. 2009a). Např. u dvou druhů slavíků byl rozdíl v morfologii spermií mezi druhy dán zejména délkou krčku, a v menší míře délkou hlavičky, délka bičíku se mezi druhy nelišila (Albrecht et al. 2019). To naznačuje, že hlavička a krček jsou v evoluci pod silnějším evolučním tlakem než délka bičíků.

Krček spermie, který u pěvců tvoří nejdelší část spermie, obsahuje mitochondrie tvořící energii ve formě ATP. Publikované studie potvrzují, že kvůli většímu množství ATP jsou spermie schopny plavat rychleji (např. Briskie & Montgomerie 1992; Cardullo & Baltz 1991; Rowe et al. 2013; Tourmente et al. 2013; Vladić et al. 2002). Proto jsme na základě těchto studií očekávali, že by délka krčku mohla pozitivně korelovat s motilitou. To bylo zjištěno např. u savců (Cardullo & Baltz 1991). V našem případě se ovšem vztah mezi délkou krčku a rychlostí spermie nepotvrdil. K podobnému závěru došel Rowe et al. (2013), který zkoumal morfologii a energetiku spermií u 23 druhů pěvců, např. u lindušky luční (*Anthus pratensis*), zvonka zeleného (*Carduelis chloris*), sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*) nebo strnada rákosníka (*Emberiza schoeniclus*) a ukázal, že délka krčku má sice vliv na produkci ATP, avšak nenalezl korelaci mezi délkou krčku a motilitou. Ani délka hlavičky, která např. u čeledi vlhovicovitých (*Icteridae*) negativně koreluje s motilitou spermie (Lüpold et al. 2009b), v případě našeho modelového systému motilitu spermií neovlivňovala. Ostatní morfologické charakteristiky spermií také s motilitou nesovisely. Přitom se motilita spermií mezi druhy významně lišila. Je tedy otázkou, co způsobuje rozdíly v rychlosti spermií mezi druhy panenek, když ne jejich morfologie.

Ačkoli délka jednotlivých částí spermie neměla vliv na rychlost pohybu spermie v roztoku DMEM, který jsme v naší práci použili, a který se standardně používá v *in vitro* studiích motility spermií (např. Tomášek et al. 2017; Opatová et al. 2015), nemůžeme vyloučit, že by se vliv morfologie spermií na jejich pohyblivost neprojevil v reprodukčním traktu samic, které má mnohem komplexnější složení a odlišnou viskozitu než DMEM. To potvrzuje Schmoll et al. (2020) ve studii, která zkoumala rychlost spermie v různě viskózních médiích ve srovnání s roztokem DMEM. Média obohacená o 1 % nebo 2 % methylcelulózu, která zvýšila viskozitu roztoku, snížila rychlost spermií až o přibližně 50 %. Čistý DMEM by tedy mohl představovat kvalitativně odlišné prostředí od prostředí samičího reprodukčního traktu a budoucích studiích by bylo dobré testovat rychlost spermií v médiích více připomínající prostředí samičího reprodukčního traktu.

Morfologie spermií nemusí ovlivnit jen motilitu spermií, ale může mít vliv na uskladnění spermií v SST, jelikož velikost spermií koreluje s velikostí skladovacích tubulů samice (Briskie et al. 1997). Případně by velikost hlavičky mohla hrát roli při fúzi vajíčka a spermie. Např. protože by větší hlavička mohla mít větší akrozom. Ačkoli jsme

neznamenali vztah mezi rychlostí spermií a jejich morfologií, je možné, že pozorovaná variabilita v morfologii spermií je důležitá v postkopulačním pohlavním výběru.

## **10.2. Liší se míra vnitrodruhové variability v délce spermií mezi druhy?**

Předchozí studie na ptácích naznačily, že míra variability v délce spermií mezi jedinci jednoho druhu, stejně jako celková délka spermie, mohou odrážet míru promiskuity druhů. Promiskuitní druhy s vyšší kompeticí spermií vykazují nižší variabilitu v délce spermií mezi jedinci v rámci druhu (Calhim et al. 2007; Kleven et al. 2008; Lifjeld et al. 2010, Janoušek et al. 2019) a zároveň mají častěji delší spermie (Gomendio & Roldan 2008; Kleven et al. 2009, Lifjeld et al. 2010). Lifjeld et al. (2010) dokonce ukázal, že míru variability v celkové délce spermie mezi jedinci jednoho druhu lze využít k odhadu EPP pro daný druh. Všechny zkoumané druhy panenek, které jsme studovali jsou sociálně monogamní, a ačkoli míra EPP v přírodě nebyla zkoumaná, předpokládá se, že je nízká, podobně jako u zebřičky (Griffith et al. 2002; Griffith & Buchanan). Tomu odpovídá i relativně malá délka spermie u *Lonchur* (61,3-73,64  $\mu\text{m}$ ) srovnatelná s délkou spermie u zebřičky (43 - 69  $\mu\text{m}$ ) (Bennison et al. 2015). Ve srovnání s tím např. spermie slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*), který má relativně vysokou míru EPP (Janoušek et al. 2019) má podstatně delší spermie (272,28  $\mu\text{m}$ ). Podle našich výsledků je nejvyšší míra vnitrodruhové variability v celkové délce spermie u *L. punctulata* a odpovídá EPP 1,4%, což znamená, že u tohoto druhu má 1,4% mláďat jiného než sociálního otce. U *L. str. domestica*, *L. castaneothorax* a *L. atricapilla* se odhadovaná míra EPP pohybovala mezi 5,8 a 12%. Nejnižší hodnotu vnitrodruhové variability v délce spermie a tím pádem nejvyšší hodnotu EPP dosahující 49% vykazovala *L. malacca*, nicméně, zde je odhad nejspíš velmi nepřesný a nadhodnocený z důvodu malého množství jedinců ve vzorku (pouze 2). Tyto hodnoty můžeme porovnat s mírou EPP u zebřiček, která se odhaduje na 2-14% v závislosti, zda se jedná o domestikovanou nebo divokou polpulaci (Griffith et al. 2002 a Griffith & Buchanan 2010).

## **10.2 Je variabilita spermií ovlivněna domestikací?**

V rámci diplomové práce byl zkoumán vliv domestikace na morfologii a motilitu spermií. V našem případě byla posuzována morfologie a motilita spermie u *L. str. domestica*, tedy u jediného domestikovaného druhu účastnícího se našeho výzkumu, ve srovnání s 5 druhy, které jsou chovány v zajetí z evolučního hlediska relativně krátkou dobu. Na základě studií Griffith et al. (2002) a Griffith & Buchanan (2010), kterým byla

modelovým druhem zebřička pestrá (*Taeniopygia guttata*), spadající stejně tak jako rod *Lonchura* do čeledi astrildovití, bylo zjištěno, že EPP jsou u domestikovaných jedinců (12-14 %) mnohem vyšší než u divokých (2-3 %). Jelikož s EPP stoupá míra kompetice spermií, mohly by mít domestikované druhy méně variabilní spermie v rámci druhu, delší spermie, případně rychlejší spermie.

*L. str. domestica* vykazovala největší variabilitu v celkové délce spermie v rámci jedince, i když ANOVA neodhalila signifikantní rozdíly ve variabilitě celkové délky spermie v rámci jedince mezi druhy. Míra variability celkové délky spermie mezi jedinci stejného druhu ani odhadovaná míra EPP však u *L. str. domestica* oproti ostatním druhům nikterak nevybočovala. To by tedy nenasvědčovalo tomu, že *L. str. domestica* má vyšší míru kompetice spermií ve srovnání s nedomestikovanými druhy.

Na druhou stranu motilita spermií u *L. str. domestica* byla nejvyšší ze všech studovaných druhů, i když signifikantně se lišila pouze od *L. castaneothorax*. Celková délka spermie *L. domestica* nebyla signifikantně odlišná od ostatních druhů. Zdá se tedy, že domestikace může mít pozitivní vliv na motilitu spermií, ale zároveň nevede ke snížení vnitrodruhové variability v morfologii spermií ani ke zvětšení spermií, jak bychom očekávali v případě zvýšení míry postkopulačního pohlavního výběru.

### **10.3 Možný vliv rozdílů v morfologii a motilitě spermií na reprodukční izolaci mezi druhy.**

Pozorované rozdíly v morfologii a motilitě spermií mezi druhy by mohly hrát potenciálně roli v reprodukční izolaci mezi druhy *Lonchur*, ať už na postkopulační prezygotické úrovni nebo na postzygotické úrovni (hybridní sterilita). Tak tomu je např. u blízké příbuzných druhů lejsků, lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) a lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*), mezi kterými dochází k hybridizaci (Cramer et al. 2016a). Hybridi těchto dvou lejsků jsou sterilní, a pokud se v ejakulátu nacházejí spermie, jsou abnormální (Ålund et al. 2013). Nám se bohužel do diplomové práce nepodařilo získat dostatek dat z hybridů mezi jednotlivými druhy *Lonchur*, ale minimálně jedno pozorování u hybridů mezi *L. domestica* a *L. punctullata* naznačilo, že hybridy mají spermie motilní podobně jako rodičovské druhy, což naznačuje, že rozdíly v morfologii spermií nevedou k postzygotické izolaci (hybridní sterilita).

Vznik postkopulační prezygotické izolace (conspecific sperm precedence) byl potvrzen u bezobratlých (Fricke & Arnqvist 2004; Price et al. 2000). U ptáků se touto problematikou zabývá např. studie Cramer et al. (2016b), ve které testovali rychlost spermií v samičích tekutinách u dvojic blízkce příbuzných pěvců, např. mezi vlaštovkou obecnou (*Hirundo rustica*) a břehulí říční (*Riparia riparia*) nebo sýkorou koňadrou (*Parus major*) a sýkorou modřinkou (*Cyanistes caeruleus*), které se liší morfologií spermií. Navzdory očekávání se však motilita spermií nelišila v tekutině z konspecifické (stejný druh) a heterospecifické (jiný druh) samice. V jiné studii, kde se autoři zaměřili na dva blízkce příbuzné druhy lejsků, lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) a lejska černohlavého (*F. hypoleuca*), už byla snižená motilita spermií v heterospecifickém prostředí zaznamenána (Cramer et al. 2016a). Bohužel studií s touto problematikou u ptáků je málo. Zda může vést rozdílná morfologie spermií k postkopulační prezygotické izolaci u panenek rodu *Lonchura* nevíme, ale bylo by to zajímavé do budoucna studovat.



## 11 Závěr

Práce ukázala signifikantní variabilitu v morfologii spermií (délka krčku a hlavičky) a motilitě spermií mezi druhy panenek rodu *Lonchura*. Nezaznamenali jsme ale žádný vztah mezi motilitou a morfologií spermií. To může být ale způsobeno i malým počtem vzorků pro některé druhy. Díky tomu, že lze panenky relativně snadno chovat a křížit v zajetí, mohly by tyto druhy být vhodným modelovým systémem pro studium postkopulačního pohlavního výběru u ptáků. Nabízejí např. možnost studovat vliv divergence v morfologii spermií na reprodukční izolaci mezi druhy, nebo pomocí genetického mapování nalézt geny odpovědné za odlišnou morfologii spermií mezi druhy. Poskopulační prezygotická bariéra je u obratlovců včetně ptáků často opomíjena a tato diplomové práce poukazuje na to, že panenky nabízí vhodný modelový systém pro její studium.

## 12 Přehled literatury

Albrecht, T., Kleven, O., Kreisinger, J., Laskemoen, T., Omotoriogun, T. C., Ottosson, U., ... & Lifjeld, J. T. (2013). Sperm competition in tropical versus temperate zone birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1752), 20122434.

Albrecht, T., Opletalová, K., Reif, J., Janoušek, V., Piálek, L., Cramer, E.R.A., Johnsen, A., and Reifová, R. (2019). Sperm divergence in a passerine contact zone: Indication of reinforcement at the gametic level. *Evolution* 73, 202–213.

Alonzo, S. H, Stiver, K. A., & Marsh-Rollo, S. E. (2016). Variational fluid allows directional cryptic female choice despite external fertilization. *Nat Commun*, 7, 12452.

Ålund, M., Immler, S., Rice, A. M., & Qvarnström, A. (2013). Low fertility of wild hybrid male flycatchers despite recent divergence. *Biology Letters* 9, 169.

Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 599 p.

Anderson, M. J., & Dixson, A. F. (2002). Motility and the midpiece in primates. *Nature*, 416(6880), 496-496.

Bakst, M. R., & Richards, M. P. (1985). Concentrations of selected cations in turkey serum and oviductal mucosae. *Poultry science*, 64(3), 555-563.

Bakst, M. R., Wishart, G., & Brillard, J. P. (1994). Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev*, 5, 117-143.

Bella, J. L., Butlin, R. K., Ferris, C., & Hewitt, G. M. (1992). Asymmetrical homogamy and unequal sex ratio from reciprocal mating-order crosses between *Chorthippus parallelus* subspecies. *Heredity*, 68(4), 345-352.

- 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), 20141897.
- Birkhead, T. R. (1998a). Cryptic female choice: criteria for establishing female sperm choice. *Evolution* 52, 1212–1218.
- Birkhead, T. R. (1998b). Sperm competition in birds. *Reviews of Reproduction* 3, 123–129.
- Birkhead, T. R. (2000). Defining and demonstrating postcopulatory female choice—again. *Evolution*, 1057-1060.
- Birkhead, T. R., Hosken, D. J. & Pitnick, A. S. (2009). *Sperm biology: an evolutionary perspective*. Amsterdam: Academic Press, xxxii, 642 s.
- Birkhead, T. R., Martínez, J. G., Burke, T. & Froman, D. P. (1999). Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 266, 1759-1764.
- Birkhead, T. R., & Møller, A. P. (1992). Numbers and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: a comparative study. *Biological Journal of the Linnean Society*, 45(4), 363-372.
- Birkhead, T. R., & Møller, A. P. (1993). Sexual selection and the 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., & Pizzari, T. (2002). Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics*, 3(4), 262-273.
- Birkhead, T. R., Sheldon, B. C., & Fletcher, F. (1994). A comparative study of sperm–egg interactions in birds. *Reproduction*, 101(2), 353-361.
- Bobr, L. W., Ogasawara, F. X., & Lorenz, F. W. (1964). Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. *Reproduction*, 8(1), 49-58.
- Briskie, J. V. (1996). Spatiotemporal patterns of sperm storage and last-male sperm precedence in birds. *Functional Ecology*, 375-383.

Briskie, J. V., & Montgomerie, R. (1992). Sperm size and sperm competition in birds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: 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. (2007). Testis size, sperm size and sperm competition. *Reproductive biology and phylogeny of birds*, Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA.

Briskie, J. V., Montgomerie, R., & Birkhead, T. R. (1997). The evolution of sperm size in birds. *Evolution*, 51(3), 937-945.

Buckland-Nicks, J. (1998). Prosobranch parasperm: sterile germ cells that promote paternity? *Micron*, 29(4), 267-280.

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), e28809.

Calhim, S., Immler, S., & Birkhead, T. R. (2007). Postcopulatory sexual selection is associated with reduced variation in sperm morphology. *PLoS one*, 2(5), e413.

Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2006). *Biologie*. Brno.

Cardullo, R. A. & Baltz, J. M. (1991). Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 19, 180-188.

Cramer, E. R., 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., Laskemoen, T., Stensrud, E., Rowe, M., Haas, F., Lifjeld, J. T., ... & Johnsen, A. (2015). Morphology-function relationships and repeatability in the sperm of Passer sparrows. *Journal of Morphology*, 276(4), 370-377.

- Cramer, E. R., Stensrud, E., Marthinsen, G., Hogner, S., Johannessen, L. E., Laskemoen, T., ... & Johnsen, A. (2016b). Sperm performance in conspecific and heterospecific female fluid. *Ecology and Evolution*, 6(5), 1363-1377.
- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (2004). *Speciation* (Vol. 37). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological reviews*, 91(4).
- Darwin, C. (1871). Principles of sexual selection.
- Davies, N. B. (1983). Polyandry, cloaca-pecking and sperm competition in dunnocks. *Nature*, 302(5906), 334-336.
- Dean, M. D., & Nachman, M.W. (2009). Faster Fertilization Rate in Conspecific Versus Heterospecific Matings in House Mice. *Evolution* 63, 20–28.
- Dixon, A., & Birkhead, T. R. (1997). Reproductive anatomy of the reed bunting: a species which exhibits a high degree of sperm competition through extra-pair copulations. *Condor*, 99, 966-969.
- 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.
- Eberhard, W. G. (1996). Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 501 p.
- Eberhard, W. G. (2009). Postcopulatory sexual selection: Darwin's omission and its consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(Supplement 1), 10025-10032.
- Firman, R. C., Gasparini, C., Manier, M. K., & Pizzari, T. (2017). Postmating female control: 20 years of cryptic female choice. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(5), 368-382.
- Fitzpatrick, J. L., Desjardins, J. K., Milligan, N., Montgomerie, R., & Balshine, S. (2007). Reproductive-tactic-specific variation in sperm swimming speeds in a shell-brooding cichlid. *Biology of Reproduction*, 77(2), 280-284.
- Fitzpatrick, J. L., Garcia-Gonzalez, F., & Evans, J. P. (2010). Linking sperm length and velocity: the importance of intramale variation. *Biology Letters*, 6(6), 797-799.

- 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 of the United States of America*, *106*(4), 1128–1132.
- Forstmeier, W., Martin, K., Bolund, E., Schielzeth, H., & Kempenaers, B. (2011). Female extrapair mating behavior can evolve via indirect selection on males. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(26), 10608-10613.
- Fricke, C., & Arnqvist, G. (2004). Conspecific sperm precedence in flour beetles. *Anim. Behav.* *67*, 729–732.
- Geyer, L. B., & Palumbi, S. R. (2005). Conspecific sperm precedence in two species of tropical sea urchins. *Evolution*, *59*(1), 97-105.
- Gilbert, A. B. (1971). The ovary. In *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, Vol. III, pp. 1163- 1208. Eds D. J. Bell & B. M. Freeman. Academic Press, London.
- Gomendio, M., & Roldan, E. R. S. (1991). Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* *243*, 181–185.
- Gorelick, R., Derraugh, L. J., Carpinone, J., & Bertram, S. M. (2011). Post-plasmogamic pre-karyogamic sexual selection: mate choice inside an egg cell. *Ideas in Ecology and Evolution*, *4*.
- Griffith, S. C., & Buchanan, K. L. (2010). The zebra finch: the ultimate Australian supermodel. *Emu*, *110*(3), v-xii.
- Griffith, S. C., Owens, I. P., & Thuman, K. A. (2002). Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular ecology*, *11*(11), 2195-2212.
- Harper, E. H. (1904). The fertilisation and early development of the pigeon's egg. *American Journal of Anatomy* *3*, 349-386.
- Hasselquist, D., & Nilsson, J. Å. (2009). Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1513), 51-60.

- Helfenstein, F., Podelvin, 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., and Wagner, R.H. (2008). Between-male variation in sperm size, velocity and longevity in sand martins *Riparia riparia*. *J. Avian Biol.* 39, 647–652.
- Hemmings, N., Bennison, C., & Birkhead, T. R. (2016). Intra-ejaculate sperm selection in female zebra finches. *Biology Letters*, 12(6), 20160220.
- Hemmings, N., & Birkhead, T. R. (2015). Polyspermy in birds: sperm numbers and embryo survival. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1818), 20151682.
- Heske, E. J., & Nelson, R. J. (1984). Pregnancy interruption in *Microtus ochrogaster*: laboratory artifact or field phenomenon? *Biology of Reproduction*, 31(1), 97-103.
- Hewitt, G., Mason, P. & Nichols, R. (1989). Sperm precedence and homogamy across a hybrid zone in the alpine grasshopper *Podisma pedestris*. *Heredity* 62, 343–353.
- Holman, L., & Snook, R. R. (2006). Spermicide, cryptic female choice and the evolution of sperm form and function. *Journal of evolutionary biology*, 19(5), 1660-1670.
- Honda, E. (2009). Acoustical and Syntactical Comparisons between Songs of the White-backed Munia (*Lonchura striata*) and Its Domesticated Strain, the Bengalese Finch (*Lonchura striata* var. *domestica*). *Zoological Science*. 16. 319-326.
- Hopkinson, E. (1938). Breeding records: Summary II. Weavers. *Avicultural Magazine*, 5th Ser., 3: 239–245.
- Hosken, D. J. (1997). Sperm competition in bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264(1380), 385–392.
- Hosken, D. J., & Hodgson, D. J. (2014). Why do sperm carry RNA? Relatedness, conflict, and control. *Trends in ecology & evolution*, 29(8), 451–455.

- Hosken, D. J., & House, C. M. (2011). Sexual selection. *Current Biology*, 21(2), R62-R65.
- Howard, D. J. (1999). Conspecific sperm and pollen precedence and speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30(1), 109-132.
- Howard, D. J., Gregory, P. G., Chu, J., & Cain, M. L. (1998). Conspecific sperm precedence is an effective barrier to hybridization between closely related species. *Evolution*, 52(2), 511-516.
- Humphreys, P. N. (1972). Brief observations on the semen and spermatozoa of certain passerine and non-passerine birds. *Reproduction*, 29(3), 327-336.
- 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.
- Irestedt, M., Jönsson, K. A., Fjeldså, J., Christidis, L., & Ericson, P. G. (2009). An unexpectedly long history of sexual selection in birds-of-paradise. *BMC evolutionary biology*, 9(1), 1-11.
- Janoušek, V., Fischerová, J., Mořkovský, L., Reif, J., Antczak, M., Albrecht, T., & Reifová, R. (2019). Postcopulatory sexual selection reduces Z-linked genetic variation and might contribute to the large Z effect in passerine birds. *Heredity*, 122(5), 622-635.
- Jiguet, F., Arroyo, B., & Bretagnolle, V. (2000). Lek mating systems: a case study in the Little Bustard *Tetrax tetrax*. *Behavioural Processes*, 51(1-3), 63-82.
- Johnson, D. D. P., & Briskie, J. V. (1999). Sperm Competition and Sperm Length in Shorebirds. *The Condor*, 101(4), 848-854.
- Katz, D. F., Drobni, E. Z., & Overstreet, J. W. (1989). Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete research*, 22(4), 443-469.
- Kawano, K. (2006). Sexual dimorphism and the making of oversized male characters in beetles (Coleoptera). *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 327-341.



- Kleven, O., Fossøy, F., Laskemoen, T., Robertson, R. J., Rudolfsen, G., and Lifjeld, J. T. (2009). Comparative evidence for the evolution of sperm swimming speed by sperm competition and female sperm storage duration in passerine birds. *Evolution* 63, 2466–2473.
- 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: International Journal of Organic Evolution*, 62(2), 494-499.
- Klibansky, L. K., & McCartney, M. A. (2014). Conspecific sperm precedence is a reproductive barrier between free-spawning marine mussels in the northwest Atlantic *Mytilus* hybrid zone. *PLoS One*, 9(9), e108433.
- Koehler, L. D. (1995). Diversity of avian spermatozoa ultrastructure with emphasis on the members of the order Passeriformes. *Memoir Mus Natl Hist*, 166, 437-444.
- Krawczyk, A. & Jaworska-Adamu, J. (2019). Oocyte-sperm interactions in the fertilization of birds. *Medycyna Weterynaryjna*. 75. 6181-2019.
- Laskemoen, T., Albrecht, T., ... & Bonisoli-Alquati, A. (2013). Variation in sperm morphometry and sperm competition among barn swallow (*Hirundo rustica*) populations. *Behav Ecol Sociobiol* 67, 301–309.
- Laskemoen, T., Kleven, O., Fossøy, F., Robertson, R. J., Rudolfsen, 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.
- 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), e13456.
- Lifjeld, J. T., Laskemoen, T., Kleven, O., Pedersen, A. T. M., Lampe, H. M., Rudolfsen, G., ... & Slagsvold, T. (2012). No evidence for pre-copulatory sexual selection on sperm length in a passerine bird. *PLoS One*, 7(2), e32611.

- Linhart, O., Cosson, J., Mims, S. D., Shelton, W. L., & Rodina, M. (2002). Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, *124*(5), 713-719.
- 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., 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., Rivers, J. W., Westneat, D. F. & Birkhead, T. R. (2009b). Sperm competition selects beyond relative testes size in birds. *Evolution*, *63*, (2), 391-402.
- Manier, M.K., Lüpold, S., Belote, J.M., Starmer, W.T., Berben, K.S., Ala-Honkola, O., Collins, W.F., Pitnick, S. (2013). Postcopulatory sexual selection generates speciation phenotypes in *Drosophila*. *Curr Biol*. Oct 7;23(19):1853-62.
- Milinski, M. (2006). The major histocompatibility complex, sexual selection, and mate choice. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, *37*, 159-186.
- Mossman, J., Slate, J., Humphries, S., & Birkhead, T. (2009). Sperm morphology and velocity are genetically codetermined in the zebra finch. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, *63*(10), 2730-2737.
- Møller, A. P., Mousseau, T. A., Rudolfson, G., Balbontin, J., Marzal, A., Hermosell, I., & De Lope, F. (2009). Senescent sperm performance in old male birds. *Journal of Evolutionary Biology*, *22*(2), 334-344.
- Mulder, R. A., & Cockburn, A. (1993). Sperm competition and the reproductive anatomy of male superb fairy-wrens. *The Auk*, *110*(3), 588-593.
- Opatová, P., Ihle, M., Albrechtová, J., Tomášek, O., Kempnaers, B., Forstmeier, W., & Albrecht, T. (2015). 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 the insect. *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(2), 281-294.
- Petersen, C.W. & Warner, R. R. (1998). Sperm competition in fishes. In: Sperm Competition and Sexual Selection (T. R. Birkhead & A. P. Møller, eds), pp. 435–463. Academic Press, CA.
- Peters, A., Denk, A. G., Delhey, K., & Kempenaers, B. (2004). Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards. *Journal of evolutionary biology*, 17(5), 1111-1120.
- Pitnick, S., & Hosken, D. J. (2010). Postcopulatory sexual selection. *Evolutionary behavioral ecology*, 379-399.
- Pizzari, T., & Foster, K. R. (2008). Sperm sociality: cooperation, altruism, and spite. *PLoS biology*, 6(5), e130.
- Price, C. S. (1997). Conspecific sperm precedence in *Drosophila*. *Nature*, 388(6643), 663-666.
- Price, C. S., Kim, C. H., Posluszny, J., & Coyne, J. A. (2000). Mechanisms of conspecific sperm precedence in *Drosophila*. *Evolution*, 54(6), 2028-2037.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., & Segelbacher, G. (2012). Extra-pair paternity in seabirds: a review and case study of Thin-billed Prions *Pachyptila belcheri*. *Journal of Ornithology*, 153(2), 367-373.
- Restall, R. (2010). *Munias and mannikins*. Bloomsbury Publishing.
- Rosengrave, P., Gemmell, N. J., Metcalf, V., McBride, K., & Montgomerie, R. (2008). A mechanism for cryptic female choice in chinook salmon. *Behavioral Ecology*, 19(6), 1179-1185.
- 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), 1-10.
- 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), 20122616.

Sasanami, T., Matsuzaki, M., Mizushima, S., & Hiyama, G. (2013). Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *Journal of Reproduction and Development*, *59*(4), 334-338.

Sasanami, T., Murata, T., Ohtsuki, M., Matsushima, K., Hiyama, G., Kansaku, N., & Mori, M. (2007). Induction of sperm acrosome reaction by perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Reproduction*, *133*(1), 41-49.

Schmoll, T., & Kleven, O. (2011). Sperm dimensions differ between two Coal Tit *Parus ater* populations. *Journal of Ornithology*. *152*. 515-520.

Schmoll, T., Rudolfson, G., Schielzeth, H., & Kleven, O. (2020). Sperm velocity in a promiscuous bird across experimental media of different viscosities. *Proceedings. Biological sciences*, *287*(1931), 20201031.

Sellier, N., Brun, J.-M., Richard, M.-M., Batellier, F., Dupuy, V., and Brillard, J.-P. (2005). Comparison of fertility and embryo mortality following artificial insemination of common duck females (*Anas Platyrhynchos*) with semen from common or Muscovy (*Cairina Moschata*) drakes. *Theriogenology* *64*, 429–439.

Snook, R. R. (2005). Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in ecology & evolution*, *20*(1), 46–53.

Stryjewski, K. F., & Sorenson, M. D. (2017). Mosaic genome evolution in a recent and rapid avian radiation. *Nature Ecology & Evolution*, *1*(12), 1912-1922.

Svanberg, I. (2008). Towards a cultural history of the Bengalese Finch (*Lonchura domestica*). *Der Zoologische Garten*. *77*. 334-344.

Tesařík, J., Drahorad, J. O. S. E. F., Testart, J. A. C. Q. U. E. S., & Mendoza, C. A. R. M. E. N. (1990). Acrosin activation follows its surface exposure and precedes membrane fusion in human sperm acrosome reaction. *Development*, *110*(2), 391-400.

Thornhill, R. (1976). Sexual selection and paternal investment in insects. *The American Naturalist*, *110*(971), 153-163.

Thornhill, R. (1983). Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *The American Naturalist*, *122*(6), 765-788.

- Tomášek, O., Albrechtová, J., Němcová, M., Opatová, P., & Albrecht, T. (2017). Trade-off between carotenoid-based sexual ornamentation and sperm resistance to oxidative challenge. *Proceedings. Biological sciences*, 284(1847), 20162444.
- Tomomi, I., Norio, Y., Toshinobu, T., Takashi, Y., Akira, T., Norio, K., & Tomohiro, S. (2011). Progesterone Is a Sperm-Releasing Factor from the Sperm-Storage Tubules in Birds. *Endocrine*.
- 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. (2013). Postcopulatory sexual selection increases ATP content in rodent spermatozoa. *Evolution; international journal of organic evolution*, 67(6), 1838–1846.
- Vernon, G. G., & Woolley, D. M. (1999). Three-dimensional motion of avian spermatozoa. *Cell motility and the cytoskeleton*, 42(2), 149-161.
- Vladic, T. V., Afzelius, B. A., & Bronnikov, G. E. (2002). Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. *Biology of Reproduction*, 66(1), 98-105.
- Wade, M., Patterson, H., Chang, N. *et al.* (1994). Postcopulatory, prezygotic isolation in flour beetles. *Heredity* 72, 163–167.
- Wagner, R. H., Helfenstein, F., & Danchin, E. (2004). Female choice of young sperm in a genetically monogamous bird. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(suppl\_4), S134-S137.
- Wedell, N., Gage, M. J., & Parker, G. A. (2002). Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in ecology & evolution*, 17(7), 313-320.
- 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* (pp. 91-126). Birkhäuser, Basel.

Wigby, S., & Chapman, T. (2004). Sperm competition. *Current biology:CB*, 14(3), R100–R102.

Wishart, G. J. (1987). Regulation of the length of the fertile period in the domestic fowl by numbers of oviducal spermatozoa, as reflected by those trapped in laid eggs. *Reproduction*, 80(2), 493-498.