

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra ekologie



**Neinvazivní měření stresových hormonů  
a vliv hormonální manipulace na chování  
madagaskarského gekona (*Paroedura picta*)**

(Noninvasive measurement of steroid hormones  
and effect of hormonal manipulation on behaviour  
in the gecko *Paroedura picta*)

Diplomová práce

**Bc. Lucie Matušková**

Školitel: Doc. Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Praha 2011

Děkuji svému školiteli docentu Lukáši Kratochvílovi za pomoc při psaní této práce. Dále bych ráda poděkovala profesoru Rupertu Palmemu, který mi umožnil analyzovat vzorky na špičkovém pracovišti, doktoru Lukáši Kubičkovi za pomoc při jejich přípravě a samozřejmě všem, kteří mě v mém úsilí podporovali.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

Bc. Lucie Matušková

V Praze, dne 29. 8. 2011





# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>7</b>
1.1. Madagaskarský Gekon ( <i>Paroedura picta</i> ).....	8
<b>2. Neinvazivní měření stresových hormonů u <i>Paroedura picta</i>.....</b>	<b>9</b>
2.1. Problematika měření stresových hormonů.....	9
2.1.1. Metody odběru a jejich úskalí.....	10
2.1.2. Imunochemické metody.....	11
2.2. Metodika.....	14
2.2.1. Podmínky experimentu.....	14
2.2.2. Experimentální skupiny zvířat.....	15
2.2.3. Příprava vzorků před analýzou.....	16
2.2.4. Statistické zpracování.....	17
2.3. Výsledky.....	18
2.4. Diskuze.....	23
2.5. Závěr.....	25
<b>3. Vliv hormonální manipulace na chování <i>Paroedura picta</i>.....</b>	<b>26</b>
3.1. Uvedení do problematiky.....	26
3.2. Hormonální kontrola chování u plazů.....	28
3.3. Metodika.....	32
3.3.1. Experimentální skupiny zvířat.....	32
3.3.2. Podmínky natáčení.....	33
3.3.3. Vyhodnocení videozáznamů.....	34
3.3.4. Statistické zpracování výsledků.....	35
3.4. Výsledky.....	37
3.4.1. Fokální zvíře – samec.....	37
3.4.1.1. Fokální samec versus stimulus samice v aréně.....	37
3.4.1.2. Fokální samec versus stimulus samice v domácím prostředí.....	43
3.4.1.3. Porovnání chování fokálního samce vs. samičí stimuly mezi arénou a domácím prostředí.....	47
3.4.1.4. Fokální samec versus stimulus samec v domácím prostředí.....	48
3.4.1.5. Fokální samec versus stimulus samice a stimulus samec v domácím prostředí.....	52

3.4.2. Fokální zvíře – samice.....	55
3.4.2.1. Fokální samice versus stimulus samec v domácím prostředí.....	55
3.4.2.2. Fokální samice versus stimulus samice v domácím prostředí.....	57
3.4.2.3. Srovnání chování <i>T</i> samic a kontrolních samců natáčených v domácím prostředí .....	59
3.5. Diskuze.....	60
3.5.1. Prvky chování a jejich vzájemná korelace.....	60
3.5.2. Vliv prostředí a pohlaví stimulu na chování zvířat.....	60
3.5.3. Vliv hormonální manipulace na chování fokálních zvířat.....	61
3.6. Závěr.....	63
<b>4. Seznam literatury.....</b>	<b>64</b>

# 1. Úvod

Hormony jsou esenciální látky ovlivňující život každého jedince, ať už člověka nebo zvířete. Podílí se na regulaci řady důležitých procesů v organismu, jako je např. udržení homeostázy. Předmětem této práce jsou dvě skupiny steroidních hormonů: glukokortikoidy a pohlavní hormony.

Glukokortikoidy jsou stresové hormony, jejichž účinek vede k mobilizaci energetických rezerv a následné přípravě na obranou reakci jedince. Na živočichy působí řada stresových faktorů a možnost měřit hladiny stresových hormonů z médií, jejichž odběr zvířeti nijak neublíží, je velmi cenná. Tyto metody se označují jako neinvazivní a jejich aplikace je dnes naprosto běžná u savců a ptáků (Romero et al., 2000; Ohe & Servheen, 2002; Nakagawa et al., 2003). U plazů se hladiny stresových hormonů stále ještě monitorují metodami invazivními, při kterých je třeba zvířatům odebírat krev. Popřípadě se užívají neinvazivní metody ale bez přesné validace. Proto se první část této práce věnuje aplikaci neinvazivního měření kortikosteronu u zástupce skupiny plazů – madagaskarského gekona (*Paroedura picta*).

Druhá část je zaměřena na pohlavní hormony, díky nimž dochází například k růstu pohlavních orgánů. Jednu z podskupin pohlavních hormonů představují androgeny. K těm nejvýznamnějším se řadí testosteron, který kromě produkce spermií ovlivňuje i samčí sexuální chování (Moore & Lindzey, 1992). Manipulace s hladinami této látky může značně ovlivnit chování pokusného jedince, např. snížit nebo naopak zvýšit jeho agresivitu (Tokarz et al., 2001) či úplně potlačit sexuální chování. V řadě studií je důraz kladen na otázku, jak je sexuální a agonistické chování androgeny kontrolováno. Zda se jedná o aktivaci či organizaci (Flores & Crews, 1995; Hews & Moore, 1996; Rhen et al., 1999). V případě organizace by zvýšení hladin androgenů dospělým samicím nemělo navodit typicky samčí chování, ať sexuální, nebo agresivní. I zde se řeší otázka vlivu hormonální manipulace na chování u modelového druhu *Paroedura picta*.

## 1.1. Madagaskarský gekon (*Paroedura picta*)

Madagaskarský gekon (*Paroedura picta*) patří do čeledi *Gekkonidae*, infrařádu Gekkota. Rod *Paroedura* je monofyletický endemický rod žijící na Madagaskaru a Komorských ostrovech (Dixon & Kroll, 1974). Tato skupina zahrnuje malé až středně velké gekony, kteří mohou být arboreální či saxikolní, ale převážně jsou terestriční (Zaaf & Van Damme, 2001).

Druh *Paroedura picta* patří mezi velké terestrické zástupce. Vyskytuje se v suchých lesích, na savanách či v trnitém buši jižního a centrálního Madagaskaru. Řadí se mezi noční živočichy (Röll, 2000). Tato zvířata dorůstají délky až 150 mm včetně ocasu a mohou dosahovat hmotnosti kolem 20 gramů. U tohoto druhu je nápadný pohlavní dimorfismus projevující se velikostí jedinců. Samci dorůstají větších rozměrů než samice, jsou robustnější a mají větší hlavu.

Pohlavně dospívá gekon *Paroedura picta* relativně brzy – ve věku kolem šesti měsíců – a rychle se rozmnožuje. Samička klade snůšku dvou vajec každé tři až čtyři týdny (Blumberg et al., 2002).

Chov těchto zvířat v laboratorních podmínkách dnes nepředstavuje žádný problém a můžeme jej najít i u mnoha teraristů. Tato zvířata vystupují v řadě studií jako modelový druh (Kratochvil et al., 2006; Kubicka & Kratochvil, 2009; Starostova et al., 2010), a proto byla vybrána pro laboratorní výzkum biologie gekonů.



## 2. Neinvazivní měření stresových hormonů u *Paroedura picta*

### 2.1. Problematika měření stresových hormonů

Hormony ovlivňují celou řadu fyziologických reakcí v těle živých organismů. Jsou to látky nezbytné pro život, díky nimž dochází k řadě změn v organismu či k ovlivnění chování atd. Tato část diplomové práce je zaměřena na stresové hormony, mezi které patří glukokortikoidy. Při uvolnění těchto látek do organismu dochází k mobilizaci energetických rezerv a vzrůstá připravenost k obranému chování jedince, kterým může být útěk nebo útok.

Možnost sledovat změny v hladinách glukokortikoidů je velmi cenná a otázka jejich měření se objevuje v řadě prací (Wallner et al., 1999; Kotrschal et al., 2000; Teskey-Gerstl et al., 2000; Wasser et al., 2000; Mathies et al., 2001; Morrow et al., 2002; Denhard et al., 2003; Meylan et al., 2003; Frigerio et al., 2004; Schwarzenberger et al., 2004). Mezi tyto látky patří kortikosteron a kortisol, jejichž hladiny je možné analyzovat ze vzorků získaných dvěma způsoby: invazivní nebo neinvazivní cestou. A právě neinvazivní způsob se v poslední době stává velice oblíbeným a hojně využívaným. Jeho aplikace je možná v celé řadě oborů, jako jsou např. ekologie, etologie, ochrannářská biologie, biomedicína i oblast *welfare* zvířat (Schwarzenberger et al., 1996; Cavigelli, 1999; Dehnhard et al., 2001; Millsbaugh & Washburn, 2004; Gorgasser et al., 2007).

Používání této metody začalo na konci sedmdesátých let (Czekala & Lasley, 1977 podle Palme, 2005). Dnes existuje celá řada prací, které tyto postupy při zjišťování hladin hormonů využívají (Heistermann et al., 1996; Foley et al., 2001; Sands & Creel, 2004). Jejich aplikace je běžná u ptáků i savců v nejrozmanitějším prostředí, kterým může být např. laboratoř (Bamberg et al., 2001), farma (Palme et al., 1996), zoologická zahrada (Goymann et al., 1999) či terén (Strier et al., 1999). Jen mizivé množství se v této souvislosti věnovalo přímo plazům (Atkins et al., 2002), což je hlavní důvod, proč se tato práce orientuje na využití neinvazivního měření hladin glukokortikoidů u již zmíněného madagaskarského gekona (*Paroedura picta*). Proč nejsou tyto metody běžně používané i u plazů? Největší komplikaci představuje fakt, že plazi patří mezi poikilotermní zvířata na rozdíl od savců a ptáků, kteří jsou homeotermní. Rychlost metabolismu plazů totiž úzce závisí na teplotě okolí. Nízký metabolismus má za následek, že k exkreci jeho produktů nedochází tak často, jako u savců a ptáků. To představuje jeden z hlavních problémů aplikace těchto metod u plazů, protože nejčastějšími médii, ze kterých se hladiny hormonů měří, jsou moč nebo trus a doba prodlení při jejich exkreci může výsledky měření ovlivnit. Před zavedením této metody do praxe je

nutná nejprve její validace, díky níž se ověří spolehlivost měření.

Cíle této práce jsou následující:

1. Stanovit vliv teploty na frekvenci defekace u madagaskarského gekona.
2. Validace neinvazivního měření hladin kortikosteronu u téhož druhu.

### **2.1.1. Metody odběru a jejich úskalí**

Hladiny sledovaných hormonů lze analyzovat ze vzorků, které se liší ve způsobu získání od pokusného zvířete. Při jednom z postupů se odebírá sledovanému jedinci krev. Následná analýza se poté provádí z krevní plazmy. Tato metoda se označuje jako invazivní a je jistě patrné proč. Odběr krve samozřejmě vyžaduje, aby byl experimentátor v přímém kontaktu se sledovaným zvířetem. U laboratorních či ochočených zvířat to nepředstavuje až takový problém, který by vlastní výsledek mohl výrazně ovlivnit. Podstatně horší situace nastává u jedinců, kteří žijí ve volné přírodě a nejsou zvyklí na přítomnost člověka. Takové je třeba před odběrem krve odchytit nebo uspat.

Vlastní odběr měřeného média je pro pokusného živočicha značně stresující. To tvoří hlavní nevýhodu invazivních metod, obzvlášť jsou-li předmětem pokusu právě stresové hormony. Při vyrušení zvířete se během několika minut do krve uvolní glukokortikoidy v reakci na stresový podnět. Z toho vyplývá, že manipulace před odběrem vzorků či během něj vede k umělému zvýšení naměřené hladiny stresových hormonů (Kobelt et al., 2003).

Navíc ztráta objemu krve, který je potřebný pro získání adekvátního množství krevní plazmy pro analýzu, může být zejména pro malá zvířata, jako jsou například hlodavci a ptáci (Touma & Palme, 2005), natolik fatální, že není možné tento proces provádět opakovaně. A na konec uvedený způsob sledování hladin stresových hormonů může být obtížně aplikovatelný u divoce žijících či chráněných živočichů.

Jednu nespornou výhodu však tyto metody práce přece jen mají. Pokud se pro analýzu používá krevní plazma, měří se přímo hladiny sledovaného hormonu a není třeba řešit, zda došlo k jeho degradaci a přeměně v některý z jeho metabolitů, jako je tomu u metod neinvazivních.

Na rozdíl od postupů invazivních nevyžadují neinvazivní téměř žádnou manipulaci se sledovanými zvířaty. Samozřejmě záleží také na tom, jaké médium se pro analýzu používá. Dnes už je běžné zjišťovat hladiny hormonů z trusu (Pereira et al., 2005), moči (Bamberg et al., 2001), slin (Greenwood & Shutt, 1992), mléka (Rabiee et al., 2002a) ale i z peří (Bortolotti et al., 2008). Pokud je třeba odebrat např. sliny nebo mléko, určité manipulaci se

nelze vyhnout, ale rozhodně nedochází k žádné fyzické újmě zvířete. Tyto postupy lze provádět s minimálním vyrušením či zásahem do života sledovaného živočicha. A jestliže je pro analýzu použit trus, nemusí experimentátor v některých případech ani přijít do kontaktu s objektem svého zkoumání (Barja et al., 2007).

Neinvazivní postupy mohou být použity při sledování dlouhodobějšího trendu změn hladin fokálních hormonů. Navíc díky těmto metodám jsou měření opakovatelná, jednoduchá a není zde žádná zpětná vazba ve srovnání s postupy invazivními.

Na první pohled se tedy zdá, že neinvazivní metody jsou ideální pro zjišťování endokrinního stavu zvířat. I tento způsob má ale několik podstatných nevýhod, díky nimž je měření obtížné:

- Fokální hormon se mění v druhově specifický metabolit, který je vylučován v moči nebo trusu (Palme et al., 2005).
- Druhově specifická je i doba mezi uvolněním hormonu do krve a jeho projevením v exkrettech (Palme et al., 1995).
- Stejně na tom je i cesta exkretovaných látek. U některých živočichů se větší množství hormonů či jejich metabolitů vylučuje močí, u jiných zase trusem (Palme et al., 1996).

Tyto body představují hlavní problematiku neinvazivních metod. Sledovaný hormon se může před exkrecí přeměnit v celou škálu metabolitů, které nemusí být snadné identifikovat. Proto je třeba neinvazivní metody před aplikováním do praxe pečlivě validovat, aby se předešlo chybným výsledkům. K analýze vzorků se používá enzymová imunoesej.

### **2.1.2. Imunochemické metody**

Pro stanovení hladin sledovaných hormonů se nejčastěji používají dvě metody, a to radioenzymová analýza (*RIA*) a enzymová imunoanalýza (*EIA*), které jsou založené na reakci antigenu s vazebným místem protilátky. Hlavní rozdíl mezi nimi spočívá ve způsobu jejího značení. U radioenzymových analýz bývá značena radioaktivně, zatímco u enzymových imunoanalýz enzymem (Möstl et al., 2005). Dále bude pozornost věnována pouze enzymové imunoanalýze.

Jedná se o jednu z nejčastěji aplikovaných imunochemických metod, které se používají při měření koncentrace hormonů. Pomocí této analýzy se stanovují hladiny sledovaných látek v krvi, moči i trusu (Bamberg et al., 2001; Koch et al., 2009). Její přednosti této metody spočívají v rychlé analýze sledovaných látek, jednoduchém postupu práce a relativní finanční

nenáročnosti (Touma & Palme, 2005). Navíc není při jejím použití třeba manipulovat s radioaktivně značeným materiálem jako v případě *RIA*.

Princip *EIA* není nijak složitý. K měření zkoumaných hladin se využívá mikrotitrační destička, na jejímž povrchu jsou navázané polyklonální protilátky s volným vazebným místem. O navázání na toto místo spolu kompetují tzv. konjugát, což je enzymem označený hormon, jehož množství je známé, a sledovaný steroidní hormon či jeho metabolit, jehož množství známé není (Möstl et al., 2005) a který je předmětem analýzy.

Tato metoda funguje tak, že konjugát i sledovaný hormon se váží na protilátku ve stejném poměru, v jakém se vyskytovaly v původní směsi. To znamená, že čím více sledovaného hormonu se v ní nachází, tím méně konjugátu se na protilátku naváže. Za těchto podmínek je pravděpodobnost vazby protilátky s konjugátem nepřímo úměrná koncentraci měřeného steroidního hormonu. S rostoucím množstvím sledovaného hormonu zůstává více volného konjugátu (Möstl et al., 2007).

Dále následuje inkubace a promytí mikrotitrační destičky. Tím dojde k odstranění zbytků nenavázaného hormonu, konjugátu i přidaného séra. Poté se přidá chromogenní substrát. Ten se užívá k prokázání enzymové aktivity vázaného konjugátu. Jakmile proběhne reakce mezi substrátem a konjugátem, dojde ke změně zabarvení konjugátu, jehož intenzita je nepřímo úměrná koncentraci měřeného hormonu. Čím vyšší je jeho hladina, tím slabší je zabarvení a naopak. Výsledek se nakonec odečte z kalibrační křivky, která je vytvořena na základě standardních roztoků o známé koncentraci hormonu (Möstl et al., 2005).

Vlastní enzymová imunoanalýza není nikterak obtížná. Komplikovanější je to ale s její validací. Ta je nástrojem sloužícím k ověření použité metody. Její problém představuje skutečnost, že pokud se měří hladiny hormonů z exkretů, zejména z trusu, je nutné brát v úvahu fakt, že mnohdy nesledujeme fokální hormon, ale jeho metabolity. Samozřejmě rychlost metabolismu a exkrece se u zvířat liší nejen mezi druhy, ale i mezi pohlavími (Palme, 2005). Z toho důvodu je třeba před použitím ověřit funkčnost této metody.

Princip validace spočívá v tom, že se sledovanému zvířeti aplikuje stresující manipulace či chemická látka, která by měla vést k vzestupu či poklesu hladin hormonů cirkulujících v krvi. Následně by se tyto změny měly odrazit v koncentraci měřených látek v odebíraném vzorku (Touma & Palme, 2005). Už z podstaty věci vyplývá, že vzorky se musí sbírat určitou dobu před a po manipulaci či injekci látky, která ovlivní endokrinní stav zvířete.

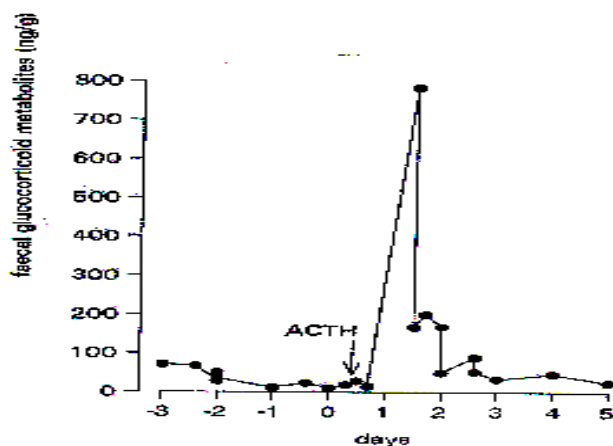
K validaci hladin glukokortikoidů se běžně používají dvě základní metody, které se ve výsledku zcela odlišují. Jde o „*dexamethasone suppression test*“ (dále jen *Dex*) a „*ACTH challenge test*“ (Touma & Palme, 2005). Pro snadnější porozumění procesům, na jejichž základě tyto testy fungují, je níže rámcově uvedena posloupnost dějů při uvolňování

stresových hormonů.

Pokud je živý organismus vystaven nějakému stresovému podnětu, dojde k uvolnění kortikotropního hormonu z hypotalamu. Tento hormon působí na hypofýzu a vyvolá aktivaci adrenokortikotropního hormonu (*ACTH*), jehož účinky vedou k vylití glukokortikoidů z kůry nadledvin do krve (Touma & Palme, 2005).

Použije-li se k validaci *Dex*, mělo by ve výsledku dojít ke snížení koncentrace glukokortikoidů v krvi. Dexametazon je totiž umělý steroid působící na hypotalamo-hypofyzární komplex prostřednictvím negativní zpětné vazby, což vede právě k poklesu hladin glukokortikoidů v organismu (Touma & Palme, 2005).

Aplikace „*ACTH challenge test*“ má opačný účinek. Injikace *ACTH* či jeho analogu do těla sledovaného zvířete vyvolá prudké uvolnění glukokortikoidů do krve. Tento nárůst by měl být po určité době detekovatelný i v měřeném médiu (obr. č. 1). Teprve po úspěšné validaci enzymové imunoanalýzy je možné ji bez obav použít k běžnému měření sledovaných látek u určitého živočišného druhu.



Obr. č. 1: Graf ukazuje nárůst glukokortikoidových metabolitů v krátké době po aplikaci ACTH u hyeny skvrnitě (*Crocota crocuta*; převzato z Goymann et al., 1999).

## 2.2. Metodika

Při pokusu o validaci neinvazivního měření stresových hormonů byl jako modelový organismus použit madagaskarský gekon (*Paroedura picta*). Jeho přednost spočívá v tom, že jde o druh poměrně velký. Další jeho nespornou výhodou představuje zařazení mezi suchomilné gekony (Dixon & Kroll, 1974). Tato skutečnost je pro měření velice důležitá, jelikož případná vlhkost může hladiny sledovaných metabolitů značně ovlivnit (Washburn & Millspaugh, 2002).

Celkem se pokusu účastnilo 33 dospělých samců. Jejich průměrný věk se pohyboval mezi dvěma a třemi roky. Samci byli zvoleni záměrně, protože u samic některých zvířat bylo dokázáno, že reprodukční stav může ovlivnit naměřené hladiny glukokortikoidů (Cavigelli, 1999). U juvenilních jedinců se zase mohou projevat výkyvy v koncentracích hormonů, protože jejich hladiny ještě nemají ustálené.

### 2.2.1. Podmínky experimentu

Zvířata byla po dobu experimentu chována samostatně v boxech o rozměrech 20 x 20 x 10 cm. Jako podestýlka sloužil písek, který je možné poměrně dobře odstranit z odebíraných vzorků. Tím se předchází jejich znečištění a ovlivnění výsledků. Součástí vybavení boxu byla miska s vodou a plastový úkryt.

U sledovaných jedinců se dodržovaly optimální světelné podmínky, aby se zamezilo vystavení působení stresových podnětů. Po dvanácti hodinách se tedy střídalo světlo s tmou.

Podmínkou relevantního měření je dostatek vzorků pro analýzu. Frekvence defekace u plazů závisí na teplotě a příjmu potravy. Zvířata byla umístěna ve třech různých konstantních teplotách, aby bylo možné porovnat jejich vliv na frekvenci defekace a odpověď na aplikaci *ACTH* analogu. Celkem 33 zvířat bylo po 11 umístěno v klimaboxech s následujícími teplotami: 24°C, 26°C a 30°C.

Gekoni dostávali krmení vždy dvakrát týdně v úterý a pátek. Přitom obdržel každý samec čtyři cvrčky pokryté Roboranem H. Často se stávalo, že nezkonsumovaní cvrčci museli být později odebráni z boxů. Spolu s potravou dostávala zvířata vždy čerstvou vodu s rozpuštěným kalcium a jednou za čtrnáct dní i s přídatkem vitamínu A, D3 a E.

Po dobu jednoho měsíce před začátkem měření byli pokusní jedinci habituováni na nové podmínky v klimaboxech, aby nedocházelo k ovlivňování hladin stresových hormonů

neznámým prostředím (Treiman & Levine, 1969 podle Good et al., 2003). Po uplynutí této doby nastal odběr vzorků.

Jako médium pro měření hladin glukokortikoidů, resp. kortikosteronu, jenž je stresovým hormonem u plazů (Greenberg & Wingfield, 1987 podle Girling & Cree, 1995), posloužil trus. Výhodou u madagaskarského gekona je skutečnost, že moč i trus jsou exkretovány v pevném stavu, a tudíž se dají oddělit, aniž by docházelo k vzájemnému ovlivňování hladin glukokortikoidů.

U validace je důležité sbírat trus co nejdříve po defekaci. Postupem doby totiž může docházet ke snižování hladin měřených metabolitů vlivem působení bakterií vyskytujících se v trusu (Huber et al., 2003). Z tohoto důvodu byla zvířata kontrolována dvakrát denně. První odběr vzorků byl prováděn mezi osmou a desátou hodinou ránní a druhý mezi pátou a sedmou hodinou večerní.

Při sběru proběhlo oddělení pevné moči od trusu a odstranění zrněk písku, aby nedocházelo k znečištění vzorku. Trus byl poté umístěn do ependorfky, která byla označena, a neprodleně zamrazen při teplotě  $-18^{\circ}\text{C}$ . Zmrazení je velmi důležité, protože zabraňuje degradaci metabolitů prostřednictvím bakteriálních enzymů. Jde o nejčastěji používaný způsob skladování vzorků před analýzou (Wasser et al., 2000; Onuma et al., 2002; Sands & Creel, 2004). U každého vzorku byl zaznamenán stav neboli stupeň „čerstvosti“ – zda je suchý, polosuchý nebo čerstvý. Vzorky byly členěny do jednotlivých skupin podle svého vzhledu v době sběru.

### **2.2.2. Experimentální skupiny zvířat**

Při prvních úvahách o možném způsobu vyvolání nárůstu hladiny kortikosteronu u sledovaných jedinců jsme přemýšleli o možnosti vzít gekony na chvíli do ruky. Od této metody jsme ale ustoupili, jelikož čas potřebný k vyvolání stresu u zvířete není znám a hormonální odpověď závisí patrně na zážitcích z minulosti (Treiman & Levine, 1969 podle Good et al., 2003).

K validaci neinvazivních metod byl tedy použit „*ACTH challenge test*“. V tomto pokusu nebylo zvířatům injikováno *ACTH*, ale aplikovala se látka Synacthen Depot od firmy Novartis, která obsahuje peptid s biologickou aktivitou *ACTH*. Tato manipulace byla provedena u 17 jedinců, kterým byl roztok injikován peritoneálně. Pro kontrolu měření byl 16 jedincům aplikován 0,9% fyziologický roztok. Projekt byl řádně schválen etickou komisí (č. 34711/201030). I v tomto případě byly vzorky trusu sbírány dvakrát denně po dobu 18

dnů. V každém klimaboxu tedy bylo šest zvířat, kterým byla aplikována látka Synacthen Depot, a pět zvířat, u nichž byl použit fyziologický roztok.

### **2.2.3. Příprava vzorků před analýzou**

Vlastní analýza vzorků byla provedena po třech měsících díky spolupráci a ochotě Prof. Dr. Ruperta Palmeho z Veterinärmedizinische Universität in Wien, na které je měření hladin glukokortikoidů z trusu běžně aplikováno u rozličných druhů zvířat, např. koček, psů, dobytka, potkanů, myší a některých druhů ptáků (Palme et al., 2005).

Vybrané vzorky byly převezeny do Rakouska v chladícím boxu se suchým ledem, aby nedošlo k jejich rozmrazení během cesty. Na místě byly uskladněny v  $-80^{\circ}\text{C}$ . Před vlastní imunoanalýzou bylo nutné vzorky připravit následujícím způsobem.

Nejprve se musely vzorky vysušit po dobu tří hodin při teplotě  $70^{\circ}\text{C}$  v sušičce. Dále následovala homogenizace. Tento proces je nezbytný, protože koncentrace sledovaných látek není v exkrementu rovnoměrná a v případě její absence by mohly být výsledky zkresleny. Několik prací dokázalo, že koncentrace hledaných metabolitů je vyšší blíže povrchu exkrementu než uvnitř (Brown et al., 1994; Wasser et al., 1996; Palme, 2005).

Z vysušených a homogenizovaných vzorků se v další fázi odstraňovaly pomocí pinzety cizorodé částice, které tvořila zrnka písku, nestrávený chitin z cvrčků a jejich vajíčka. Každý vzorek nesl poznámku s informací o množství písku: 1 – málo, 2 – středně, 3 – hodně. Kromě toho se zaznamenalo, pokud obsahoval větší množství chitinu. Z takto připravených vzorků došlo k odvážení 0,01-0,05 gramů trusu, který byl použit v dalším průběhu analýzy. Pokud mezi jednotlivými kroky přípravy vzorků docházelo k delším časovým prodlevám, uložily se zpět do mrazáku.

Vlastní extrakce proběhla následujícím způsobem. K odměřenému množství vzorku se přilil 60% methanol. Takováto koncentrace je doporučena v řadě prací, které se zabývají měřením glukokortikoidů u ptáků (Baltic et al., 2005; Möstl et al., 2005; Thiel et al., 2005). Poté byl vzorek vložen na dobu dvaceti minut do třepačky (nastavení:  $15^{\circ}/27^{\circ}\text{C}$ , 1400 rpm) a následně byl na dvě minuty umístěn do centrifugy (nastavení: 10 000 otáček/min.). Po centrifugaci se k vzorku přidal pufovací roztok. V enzymové imunoanalýze byla použita specifická protilátka proti kortikosteronu.



#### **2.2.4. Statistické zpracování**

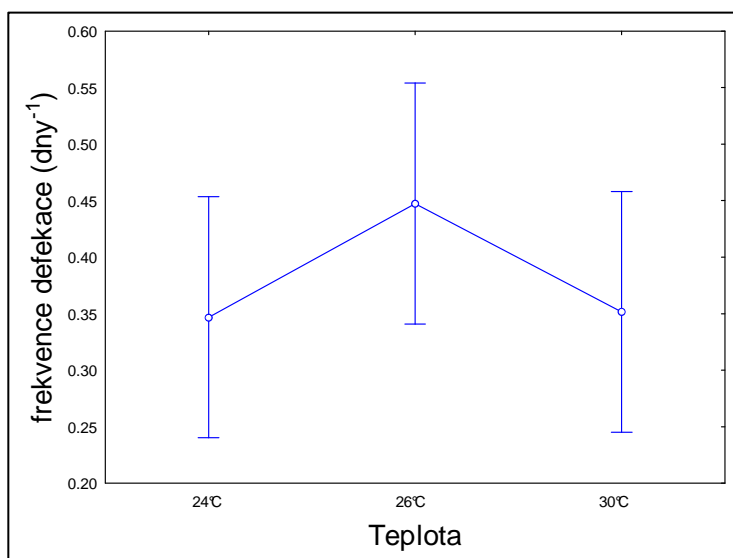
Při statistickém zpracování dat týkajících se vlivu teploty na frekvenci defekace byla použita analýza variance. Naměřené hladiny byly znázorněny pomocí bodového grafu v programu Microsoft Excel v závislosti na čase, kdy byly vzorky odebrány.

## 2.3. Výsledky

První část pokusu trvala dvacet dní. Během této doby došlo k odběru celkem 308 vzorků, z nichž 79 bylo označeno jako čerstvých, čtrnáct jako polosuchých a 216 jako suchých. Poté následovala aplikace látky Synacthen a fyziologického roztoku. V další fázi odběrů bylo získáno 199 vzorků. Z toho tvořilo 112 suchých, 21 polosuchých a 66 čerstvých.

Z celkového množství všech vzorků se jich pro další analýzu použilo 238 – 76 vzorků z teploty 24°C, 78 z teploty 26°C a 83 z teploty 30°C. Kritérium výběru představovaly jejich hmotnost a stupeň čerstvosti.

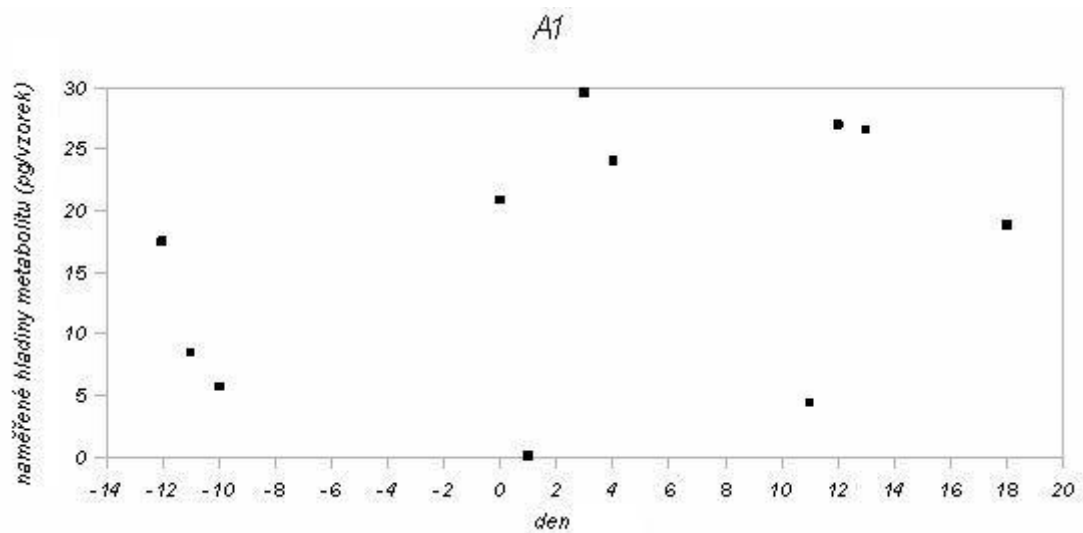
Porovnání vlivu teplot na frekvenci defekace bylo provedeno v programu Statistica pomocí analýzy variance (obr. č. 2). Vliv teploty na frekvenci defekace se ukázal jako nesignifikantní  $F(2,30) = 1,18; p = 0,32$ .



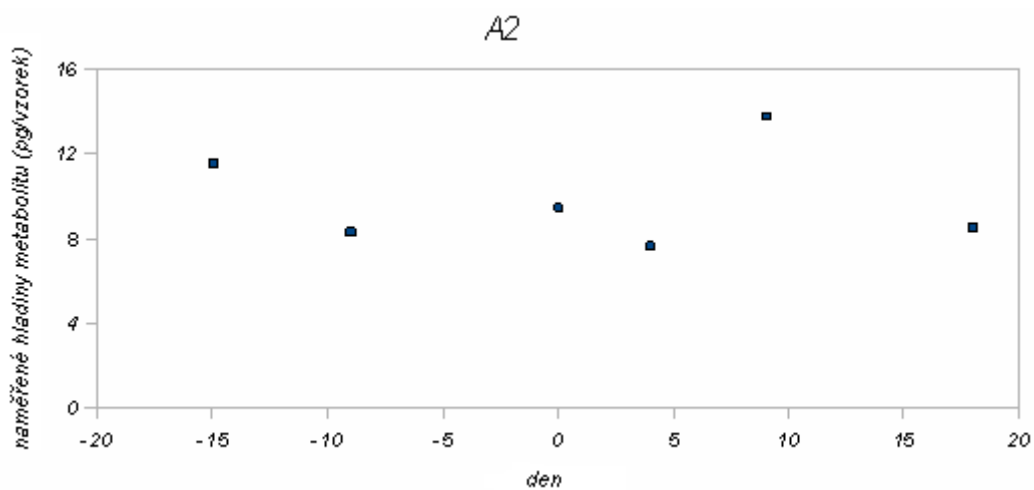
Obr. č. 2: Graf závislosti frekvence defekace na třech teplotách, ve kterých byla pokusná zvířata umístěna.

Po vyhodnocení výsledků enzymové imunoanalýzy se ukázalo u osmi zvířat, že hladiny měřené látky nevykazují očekávaný nárůst po aplikaci látky Synacthen. Z toho důvodu se v analýzách u ostatních vzorků nepokračovalo.

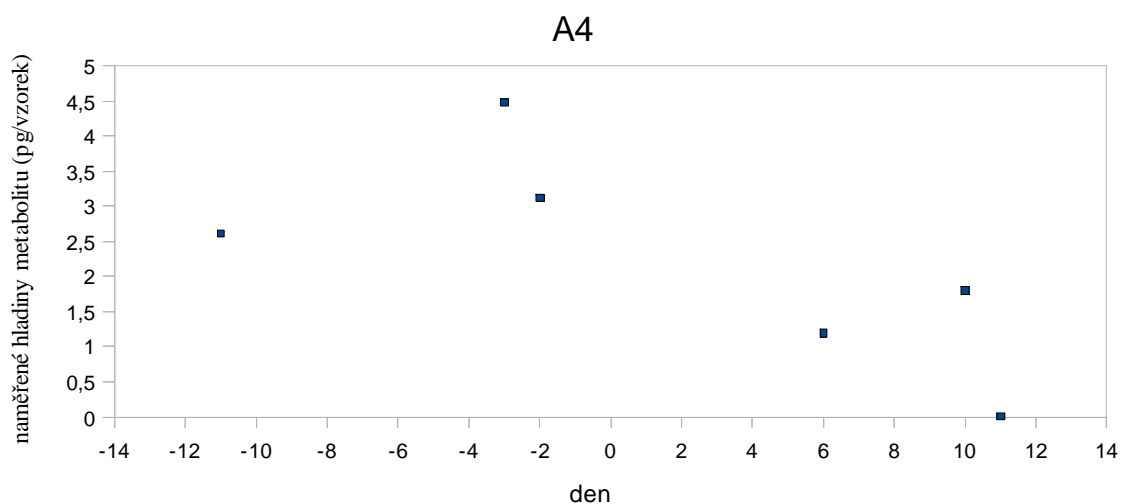
Pro zvířata A1, A2, A4, A8, B2, B7, B9 a C2 jsou vyneseny hodnoty naměřených látek v grafech na obr. č. 3-10. Naměřené hladiny kortikosteronu jsou uvedeny v jednotkách pg/vzorek. Tyto jednotky dobře vypovídají o relativní hodnotě stanovení, o kterou při testu jde.



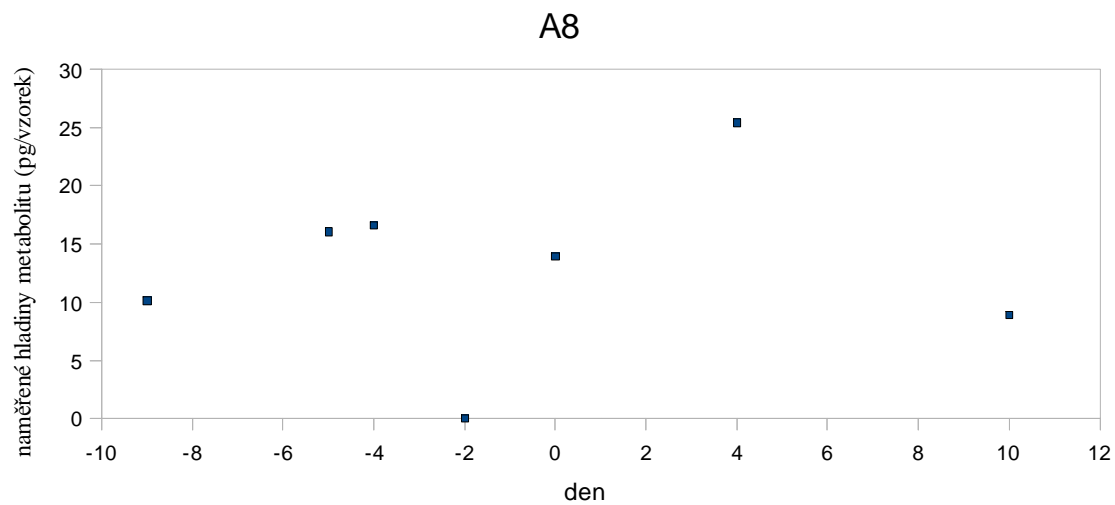
Obr. č. 3: Graf závislosti změny naměřených hladin kortikosteronu v čase u zvířete A1 z teploty 24°C. V čase 0 byla zvířeti aplikována látka Synacthen Depot.



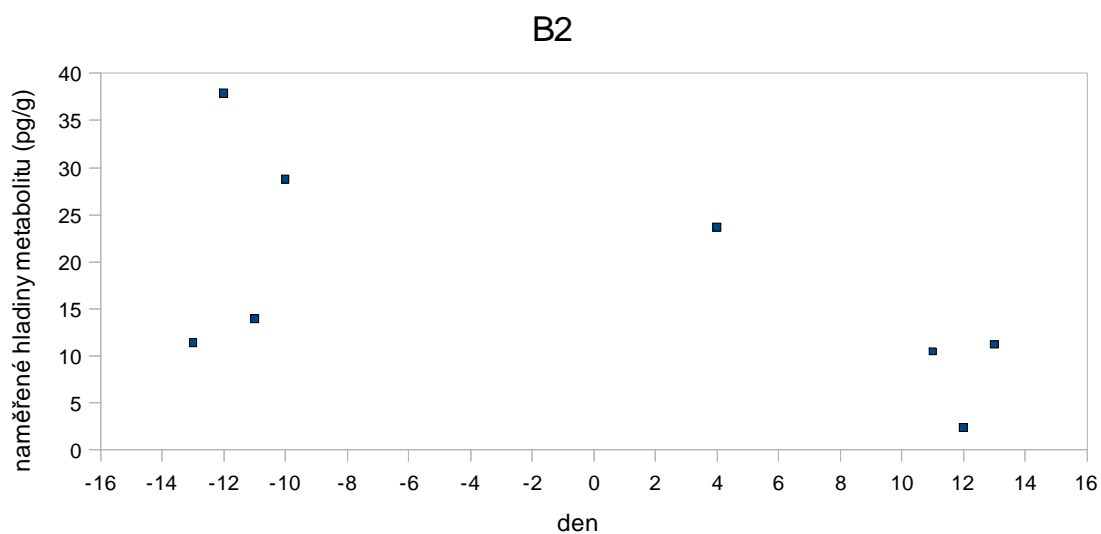
Obr. č. 4: Graf závislosti změny naměřených hladin kortikosteronu v čase u zvířete A2 z teploty 24°C. V čase 0 byla zvířeti aplikována látka Synacthen Depot.



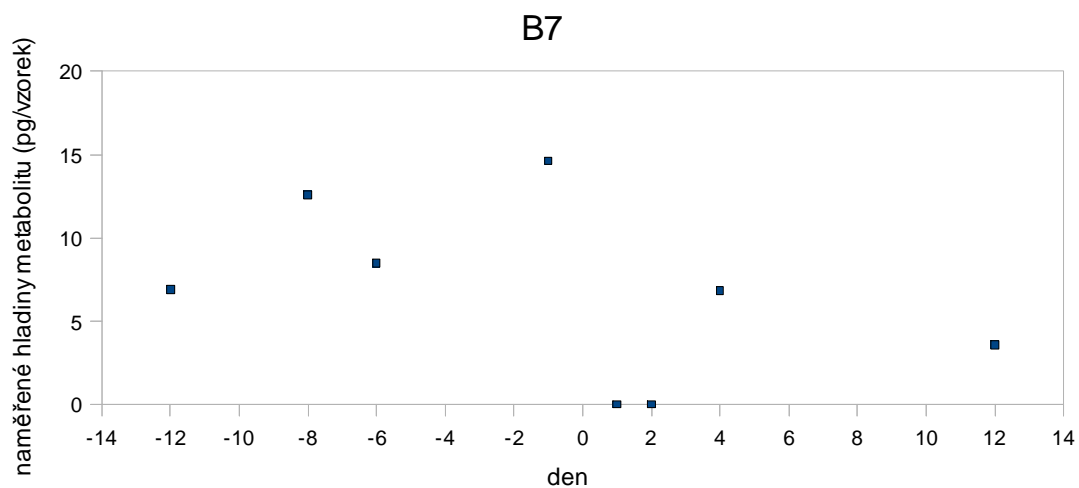
Obr. č. 5: Graf závislosti změny naměřených hladin kortikosteronu v čase u zvířete A4 z teploty 24°C. V čase 0 byla zvířeti aplikována látka Synacthen Depot.



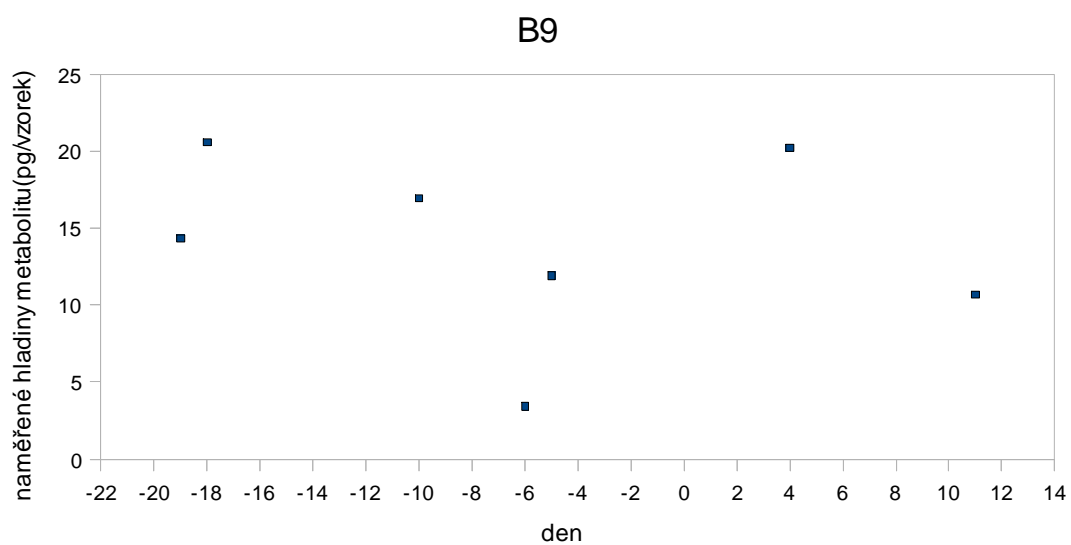
Obr. č. 6: Graf závislosti změny naměřených hladin kortikosteronu v čase u zvířete A8 z teploty 24°C. V čase 0 byla zvířeti aplikována látka Synacthen Depot.



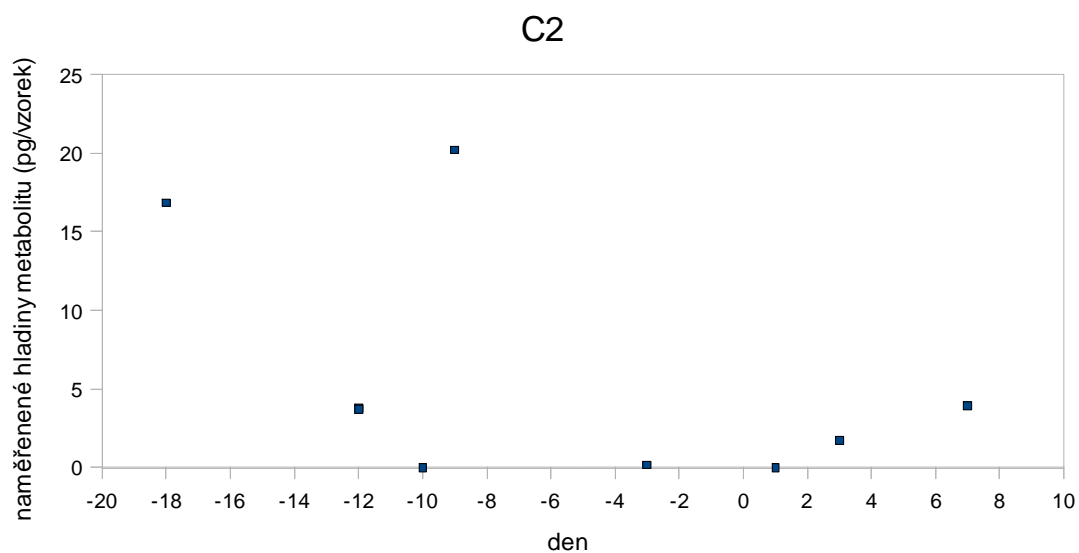
Obr. č. 7: Graf závislosti změny naměřených hladin kortikosteronu v čase u zvířete B2 z teploty 26°C. V čase 0 byla zvířeti aplikována látka Synacthen Depot.



Obr. č. 8: Graf závislosti změny naměřených hladin kortikosteronu v čase u zvířete B7 z teploty 26°C. V čase 0 byla zvířeti aplikována látka Synacthen Depot.



Obr. č. 9: Graf závislosti změny naměřených hladin kortikosteronu v čase u zvířete B9 z teploty 26°C. V čase 0 byla zvířeti aplikována látka Synacthen Depot.



Obr. č. 10: Graf závislosti změny hladin měřeného metabolitu v čase u zvířete C2 z teploty 30°C. V čase 0 byla zvířeti aplikována látka Synacthen Depot.

## 2.4. Diskuze

Validace neinvazivního měření kortikosteronu u madagaskarského gekona (*Paroedura picta*) se nezdařila. V naměřených hodnotách se neprojevil očekávaný trend ve změně hladin kortikosteronu po aplikaci látky Synacthen Depot. Navíc z grafů vyplývá, že koncentrace sledovaných látek značně oscilovala ještě před její injikací.

Odpovědí na otázku, proč tomu tak je, může být několik. Z kolísání hladin před aplikací látky Synacthen je možné usuzovat, že doba, po kterou byla zvířata na nové prostředí klimaboxů habituována, to jest jeden měsíc, nemusela být dostačující. Navíc prostředí klimaboxů se vyznačuje větší hlučností, než na kterou byla zvířata normálně zvyklá, což mohlo rovněž ovlivnit výsledek měření. Komplikaci však může představovat i odběr vzorků, k němuž docházelo vždy dvakrát denně. Sice byl za pomoci pinzety trus rychle odebrán, ale boxy s gekony se musely vždy na chvíli vyndat z klimaboxů ven, než se provedl vlastní odběr. Této manipulaci byla zvířata vystavena až v průběhu pokusu, nikoliv ale během jejich uvykání na nové prostředí. I to se tedy mohlo odrazit v kolísání naměřených hladin.

Řadu komplikací mohou rozšířit rovněž vlastní vzorky. Přestože byly odebírány dvakrát denně, většina jich byla označena jako „suché“, a je proto možné, že vlivem bakterií došlo k degradaci hledaných látek (Huber et al., 2003), protože vzorky byly vystaveny okolním podmínkám. Navíc v řadě případů se stávalo, že zvířata měla vysokou frekvenci defekace na úkor hmotnosti odebraného exkrementu. Před analýzou se ze získaného trusu odvažovalo množství 0,01-0,05g v závislosti na hmotnosti vzorku. Některé z nich však ani této hmotnosti nedosahovaly. Menší objemy vzorků než 0,05g mohou být zavádějící (Millsbaugh & Washburn, 2004). Je-li tomu tak, pak výsledek mohl být značně ovlivněn právě tímto faktem.

Možný problém spočívá též ve způsobu výběru vzorků. K analýze byly určeny vzorky čerstvé a poměrně velké. Nelze ale vyloučit, že nepokryly celou dobu pokusu, a proto výsledný graf neukázal nárůst hladin metabolitů po aplikaci látky Synacthen.

Nemalý vliv mohlo mít rovněž znečištění vzorků v podobě zrněk písku, nestráveného chitinu a vajíček. Zatímco písek se dal poměrně dobře odstranit, mnohem horší to bylo s nestráveným chitinem a cvrččími vajíčky. Ačkoliv byly vzorky pečlivě vyčištěny, nebylo možné odstranit veškerý chitin. Nehledě na to, že po jeho eliminování se často celkové množství vzorku zmenšilo. Pokud by se v budoucnu pokus někdy opakoval, bylo by dobré krmit pokusná zvířata pouze juvenilními cvrčky bez křídel.

V několika studiích bylo dokázáno, že na měření hladin hormonů mohou mít vliv i denní rytmy. U některých zvířat s noční aktivitou bylo doloženo vyšší množství uvolněných

hormonů před koncem světelné periody (Good et al., 2003). Je tedy možné, že tento fakt mohl ovlivnit měřené hladiny, protože vzorky byly odebrány přes den, i když je *Paroedura picta* noční zvíře.

Nelze opomenout ani skutečnost, že nebyl předem stanoven typ metabolitu, jehož hladina se měřila. Proto nemusela být použita protilátka proti kortikosteronu dostatečně specifická pro navázání jeho metabolitu. Navíc některé hormony mohou mít podobné metabolity, a proto je tedy nezbytné přesně stanovit, s jakým metabolitem kromě standardu protilátka reaguje. Ke zjištění přítomnosti konkrétních metabolitů, které se ve vzorku nachází, se používá výkonná kapalinová chromatografie („*High-performance liquid chromatography immunograms*“; Hunt & Wasser, 2003). Po negativním výsledku enzymové analýzy se tato metoda měla vyzkoušet. Ukázalo se však, že její aplikace by byla velmi obtížná, proto se od ní nakonec upustilo.

Druhý úkol této části diplomové práce představovalo ověření hypotézy o ovlivnitelnosti frekvence defekace okolní teplotou. Tato úvaha byla logická, protože plazi patří mezi poikiloternní zvířata, jejichž rychlost metabolismu je závislá na teplotě. Vliv teploty na frekvenci defekace se však nepodařilo prokázat.



## 2.5. Závěr

Přestože se pokus o validaci neinvazivního měření u madagaskarského gekona nezdařil, výsledek potvrdil nezbytnost validace před zavedením neinvazivních metod do praxe. Pokud by validace zavedena nebyla, interpretace výsledků měření hladin kortikosteronu z trusu gekonů by byly nepodložené.

Tento experiment by bylo dobré s přihlédnutím k diskutovaným možným příčinám neúspěchu zopakovat. Tato metoda se běžně používá u řady endotermních živočichů, protože odhaluje cenné informace týkající se jejich endokrinního stavu, přičemž nejde jen o zjišťování hladin stresových hormonů, ale i stanovení hladin pohlavních hormonů. Z tohoto důvodu by aplikace neinvazivního měření u plazů mohla poskytnout cenné informace o jejich endokrinologii.

### ***3. Vliv hormonální manipulace na chování *Paroedura picta****

#### **3.1. Uvedení do problematiky**

Hormony jsou důležitou součástí každodenního života všech živočichů. Jednu z nejvýznamnějších skupin těchto látek tvoří pohlavní hormony a jejich metabolity, které hrají nezastupitelnou roli nejen ve vývoji sexuálních znaků u všech obratlovců (Adkins-Regan, 2005 podle Golinski et al., 2011), ale také v regulaci jejich sexuálního i agresivního chování (Moore & Crews, 1986; Marler & Moore, 1988) a ovlivňují morfologické a fyziologické změny (Sinervo et al., 2000a; Milles et al., 2007) v těle. Produkci těchto hormonů řídí hypotalamo-hypofyzární komplex, což je hlavní reprodukční centrum všech obratlovců (Godvin & Crews, 2002).

V adenohipofýze savců vzniká např. folikuly stimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH; Norris, 2007). Tyto látky mají velký význam pro reprodukci, protože jejich prostřednictvím dochází k regulaci funkce gonád. Folikuly stimulující hormon řídí vývoj folikulu a jeho růst. Zároveň také podporuje produkci estrogenů. U samců působí na Sertolliho buňky, a pomáhá tak modulovat spermatogenezi (Simoni et al., 1997).

Luteinizační hormon (LH) se podílí na konečném vývoji folikulu a podmiňuje ovulaci. Zároveň ovlivňuje i produkci progesteronu. U samců tato látka působí na Leydigovy buňky varlete, a tím ovlivňuje produkci androgenů (Gist, 1998; Norris, 2007), především testosteronu (Saez, 1994). U některých plazů mají schopnost produkovat androgeny jak Sertolliho, tak Leydigovy buňky (Mesner et al., 1993). O tom, který typ buněk se na produkci podílí, rozhoduje roční období.

Za hlavní hormon, který se podílí na samčím sexuálním a agresivním chování u plazů, je považován testosteron (Moore & Lindzey, 1992; Tokarz et al., 2002). Není ale úplně jisté, jak chování ovlivňuje. Touto otázkou se zabývala řada vědců (Hews et al., 1994; Rhen et al., 1998; Sinervo et al., 2000; Tokarz et al., 2001; Kabelik et al., 2007). Může působit tak, že samčí chování je organizováno během raného vývinu či v pubertě a pak aktivováno či dočasně organizováno zvýšenými hladinami testosteronu v dospělosti či během období reprodukce. Je-li tomu tak, pak by se to mělo projevit u zvířat, na kterých jsou prováděny hormonální manipulace, jejichž nejčastější podoba vypadá následovně: zvířata bývají kastrována, části je pak voperován testosteronový implantát a to jak samcům, tak i samicím. U kastrováných samců by mělo samčí chování po určité době vymizet (Crews et al., 1978; Rosen et al., 2002), u samic by zvýšení hladin testosteronu nemělo vyvolat samčí chování.

Rhen et al. (1999) např. tvrdí, že zvýšením hladin testosteronu nejde u samic gekončika nočního (*Eublepharis macularius*) navodit samčí sexuální chování, přestože vymizí u samců po kastraci a obnoví se po aplikaci testosteronu samcům kastrátům. Ale práci z roku 1995 (Flores & Crews, 1995), kde se aplikoval samicím testosteronový implantát, se chování projevující při námluvách a specifické pouze pro samce (vibrování ocasem) objevilo i u manipulovaných samic v reakci na samičí stimulus, ovšem jen v omezené míře. Zdá se tedy, že námluvy u gekončků jsou u samců organizovány v ranější ontogenezi.

Golinski et al. (2011) prováděli pokusy s gekončkem *Coleonyx elegans*. V této práci se analyzoval vliv hormonální manipulace s androgeny na samce i na samice. Výsledky ukázaly, že nejsou rozdíly v sexuálním chování mezi samci kontrolními, kastrovanými a těmi s testosteronovým implantátem. U samic ale zvýšené hladiny testosteronu vyvolaly typické samčí sexuální chování (u tohoto druhu se nevyskytuje rituál námluv s vibrací ocasem). Zdá se tedy, že samčí sexuální chování může být u *Coleonyx elegans* dočasně organizováno zvýšením hladin androgenů, ke kterému došlo u samic s testosteronovým implantátem. U kastrovaných samců bylo patrně v době testování sexuální chování ještě stále přítomno vlivem předchozího zvýšení hladin androgenů. Autoři předpokládají, že po delší době by samčí sexuální chování u kastrovaných samců vyhaslo.

Experimentální manipulace s testosteronem, kdy byla dospělá zvířata kastrována a naopak u subadultních jedinců se aplikoval testosteronový implantát došlo k tomu, že kastrace tlumily projevy sexuálního chování, zatímco testosteronové implantáty měly u juvenilů opačný efekt (Mason & Adkins, 1976; Adkins & Schlesinger, 1979; Winkler & Wade, 1998; Lovern et al., 2001).

*Paroedura picta* je druh, u kterého jsou samci agresivní a lze lehce pozorovat samčí sexuální chování. Cílem této práce bylo podrobně popsat chování druhu a zjistit, v jakém kontextu se vyskytují některé výrazné prvky chování. Navíc měly pokusy otestovat, zda:

1. vymizí u samců kastrátů samčí chování (sex a agrese)
2. se vrátí samčí chování u kastrátů s testosteronovými implantáty
3. lze u samic vyvolat samčí chování aplikací testosteronu
4. zda hormonální manipulace ovlivní i jiné behaviorální vlastnosti než jen přítomnost či nepřítomnost samčího chování – třeba zájem o okolí, obecnou aktivitu apod.

## 3.2. Hormonální kontrola chování u plazů

Chování u plazů je rozmanité a celá řada jeho projevů může být ovlivněna hladinami hormonů. Komunikace mezi zvířaty je velmi důležitá a značně variabilní, obzvláště v období námluv nebo při zastrašování rivalů. Řada leguánovitých ještěřů komunikuje prostřednictvím vizuálních signálů (Ord et al., 2002). Pohlavní dimorfismus ve zbarvení zvířat nalezneme u řady obratlovců. Tyto rozdíly jsou často způsobeny hormonálními hladinami a korelace mezi zbarvením a hladinou steroidních hormonů byla odhalena v několika pracích (Cooper & Greenberg, 1992; Calisi & Hews, 2007).

Anolisové při zastrašování konkurenta uplatňují zvětšování barevného kožního laloku na hrdle. Tyto projevy byly sledovány např. v práci Tokarz et al. (2001). V ní byl analyzován vliv testosteronu na agonistické chování mezi samci anolise Sagreova (*Anolis sagrei*), kteří při zastrašování protivníka roztahují barevný kožní lalok. Pomocí hormonálních manipulací bylo zjištěno, že hladiny testosteronu mají vliv na frekvenci tohoto projevu chování – u samců s vyššími hladinami testosteronu byla v reakci na stimulus vyšší frekvence než u kastrovaných zvířat.

Jiné druhy ještěřů však k atrahování partnera či zastrašování nepřítelů využívají signály zvukové a chemické, jejichž produkce je též pod kontrolou steroidních hormonů. Např. receptivní samice užovky proužkované (*Thamnophis sirtalis parietalis*) vypouští feromon k nalákání samce. U tohoto druhu dokonce někteří samci používají stejný feromon jako samičky, aby mezi ně snáze pronikli a mohli se s nimi pářit (Mason & Crews, 1985). Gekončík noční (*Eublepharis macularius*) rovněž využívá chemické signály během námluv. Každá samice má specifický feromon, díky němuž je samci individuálně rozpoznají (LaDage & Ferkin, 2006).

I leguánci *Sceloporus graciosus* produkují feromony z femorálních pórů, které hrají roli ve výběru partnera. V tomto případě tyto látky zprostředkovávají sdělení ohledně jejího fyzického a reprodukčního stavu (Martins et al., 2006) či receptivitě (Kelso & Martins, 2008). Sekrece těchto látek se zvyšuje během námluv, kdy se snaží samec samici upoutat svým chováním. Naopak samčí sekrece z femorálních pórů má ukázat u ještěrek druhu *Lacerta monticola* (Martin et al., 2007) a u leguána *Liolaemus monticola* (Labra, 2006) status sociální dominance samce. Např. právě u zástupce rodu *Liolaemus* byla zjištěna spojitost se změnou hladin androgenů.

Hormony však mohou také ovlivnit teritoriální a agresivní chování zvířat. Teritorium je domovský okrsek, který vyžaduje určité náklady na jeho obhájení, ale svému majiteli přináší též užitek, ať už v podobě dostupných potravních zdrojů, nebo vyšší pravděpodobnosti

kopulace. Například u některých anolisů čím větší má samec teritorium, tím se jeho území překrývá s větším počtem teritorií samic, se kterými se může pářit (Sinervo & Clobert, 2003). U teritoriálních samců se často projevuje agonistické a zstrašující chování vůči rivalům, kdy se samec snaží vetřelce kousnout nebo vyhnat (Greenberg & Crews, 1990; Tokarz, 1995; Sinervo et al., 2000).

Počátkem období rozmnožování dochází u většiny druhů plazů k nárůstu hladiny testosteronu u samců. S tímto navýšením často koresponduje i zvýšení frekvence agonistického chování a jiných teritoriálních projevů (Moore & Lindzey, 1992; Tokarz et al., 2002; Watt et al., 2003; Wade, 2005).

V práci z roku 2003 (Watt et al., 2003) byl prokázán pokles projevů agonistického chování u samců anolise hnědé (*Anolis sagrei*), kterým se aplikoval anti-androgen *cypoterone acetate*, což je látka snižující účinek androgenů. Takto zmanipulovaná zvířata měla prokazatelný pokles nejen v agresivním, ale i sexuálním chování.

Z práce Kabelik et al. (2006) vyplývá, že zvířata s vyšší hormonální hladinou se projevují silnějším teritoriálním chováním (*Urosaurus ornatus*). Je zajímavé, že toto chování může být u některých zvířat aktivováno jak testosteronem, tak i progesteronem (Weiss & Moore, 2004).

U leguána pestrého (*Uta stansburiana*) byla doložena souvislost mezi hladinami testosteronu a získáním kvalitního teritoria. Samci, kterým byl do těla vložen testosteronový implantát, okupovali lepší teritorium oproti kastrovaným zvířatům. I Moore (1987) ve své práci na *Sceloporus jarrovi* prokázal, že cirkulující hladiny testosteronu jsou důležité k udržení teritoria.

Přesto existují též příklady, kde tato souvislost prokázána nebyla (Knapp et al., 2003; Baird & Hews, 2007). Baird & Hews (2007) se zabývali otázkou, zda zvyšování hladin androgenů vede k vyšší agresivitě u leguánovce obojkového (*Crotaphytus collaris*). U tohoto druhu dospívají jedinci kolem jednoho roku života. Tito samci ale nejsou teritoriální a snaží se příležitostně pářit se samicemi v okolí. Dvouletí samci jsou teritoriální a agresivní. Překvapivě se prokázaly srovnatelné hladiny androgenů u teritoriálních i neteritoriálních jedinců. Jedním z vysvětlení může být skutečnost, že testosteron je spojen s růstem. Mladí jedinci potřebují rychle dorůst velikosti dospělých, a proto je u nich vyšší hladina testosteronu.

U řady plazů najdeme rovněž fenotypové rozdíly v morfologii mezi samci jednoho druhu. Tyto odlišnosti bývají spojené s určitým typem chováním, kdy jedna forma představuje řadu typických znaků a prvků chování pro samce a jiná forma u stejného druhu reprezentuje spíš samičí znaky a chování. Všechny formy jsou schopné reprodukce, ale mají jiné taktiky, jak jí dosáhnout (Knapp, 2003). Tento jev se často objevuje u leguánů. Např. samci leguána

*Urosaurus ornatus* se mezi sebou liší zbarvením. U těchto zvířat se vyskytují dva základní typy zbarvení spojené s určitou strategií chování. Samci s oranžovomodrým zbarvením bývají teritoriální a své území agresivně střeží před možnými konkurenty. U těch, kteří jsou vybarvení pouze oranžově, je agresivní chování na nižší úrovni (Moore et al., 1998) a tito jedinci mohou žít buď na jednom místě, nebo z místa na místo migrují. Během námluv se samci předvádí vzpřímeným postojem a ukazují modré skvrny na břicho. Je zajímavé, že rozsah těchto skvrn signalizuje bojovné schopnosti (Meyers et al., 2006) a větší skvrny bývají u samic preferovanější (Hamilton & Sullivan, 2005).

Pokusy na těchto zvířatech prokázaly, že steroidní hormony (testosteron a progesteron) mohou ovlivnit morfologii jedince během určité doby jeho ontogeneze. V práci Hews et al. (1994) byly u subadultních zvířat starých 30 dnů prováděny kastrace a implantace testosteronových implantátů. U zvířat s vyššími hladinami testosteronu se častěji objevovalo oranžové zbarvení než u kastrátů. V podobně aranžovaných pokusech se živočichy, jež dosáhli stáří 60 dnů, se už vliv testosteronu na zbarvení neprojevil (Hews & Moore, 1996). Z toho vyplývá, že u těchto zvířat existuje určitá senzitivní perioda, během níž hrají steroidní hormony důležitou roli v podobě trvalé organizace pro další život zvířete.

Podobně je tomu i u leguána pestrého *Uta stansburiana*, kde se vyskytují tři odlišně zbarvené skupiny samců, pro které je opět typické určité chování. Jedinci s oranžovým zbarvením bývají teritoriální a agresivně brání své území a samice, které se na něm vyskytují. U modře zbarvených samců se agresivita projevuje v nižší míře, ale stále ještě hlídají samice na svém území. Oproti nim zvířata se žlutým zbarvením teritoriální nejsou. Tito samci mají jinou strategii vedoucí ke kopulaci se samicemi. Napodobují samice a snaží se dostat do teritoria jiného samce. Pokud se jim to podaří, ve chvíli, kdy teritoriální samec není na blízku, se snaží kopulovat s jeho samicemi (Sinervo & Lively, 1996; Sinervo et al., 2000; Sinervo & Clobert, 2003). Tyto barevné variace jsou geneticky podmíněny, ale chování s nimi spojené je patrně ovlivňováno geneticky podmíněnými hladinami pohlavních hormonů.

Experimenty, které se prováděly na *Urosaurus ornatus* a *Urosaurus stansburiana*, potvrdily, že jednotlivé morfotypy se liší nejen zbarvením a chováním, ale také hladinami pohlavních hormonů. Zvířata, která jsou oranžově zbarvená a teritoriální, mají vyšší hladiny testosteronu než jedinci s modře či žlutě zbarveným hrdlem (Sinervo et al., 2000a). Pokud se u žlutě vybarvených zvířat experimentálně zvýšily hladiny testosteronu, začalo se u nich objevovat teritoriální chování, kterým se běžně projevují jen samci s oranžově zbarveným hrdlem (Sinervo et al., 2000a).

Fenotypové rozdíly v morfologii najdeme i u leguána mořského (*Amblyorhynchus cristatus*), jehož „morfotypy“ jsou vázané na věk a velikost (Wikelski et al., 2001). Tento druh

je příkladem, kde vývojové a enviromentální podmínky ovlivňují reprodukční chování prostřednictvím hormonů. Teritorialita se u samců projevuje, až když dosáhnou určité velikosti, ale práh je ovlivněn denzitou a klimatickými podmínkami (Wikelski & Trillmich, 1997). Mladí samci, kteří mají ještě malou velikost, nejsou pro dospělé samce rozeznatelní od samic. Žijí tedy na jejich teritoriu mezi samicemi a příležitostně se s nimi páří. Když povyroste, žijí v okolí teritoria velkých samců a snaží se pářit se samicemi, když na ně teritoriální samec nedává pozor. Největší a nejstarší samci si agresivně hájí území se samicemi. I v tomto případě lze hormonálními manipulacemi ovlivnit chování samců. Pokud se zvýšila hladina této látky u mladých samců, vedlo to k projevům teritoriality u jinak neteritoriálních jedinců. Mimo to se i formy, které se běžně snaží vplížit mezi samice, aby s nimi mohli kopulovat, jim začaly otevřeně imponovat (Wikelski et al., 2005). Naopak v pokusech, ve kterých se snižovaly hladiny testosteronu u teritoriálních samců, docházelo u těchto jedinců k snižování zájmu o obranu teritoria a námluvy (Wikelski et al., 2005).

### 3.3. Metodika

Vliv hormonální manipulace na chování byl zkoumán u modelového druhu *Paroedura picta*. Projekt byl řádně schválen etickou komisí (č. 34711/201030). Experiment můžeme rozdělit na několik částí: za prvé hormonální manipulace, za druhé natáčení chování manipulovaných zvířat v reakci na nemanipulovaná zvířata, která figurovala jako stimulus v aréně nebo domácím prostředí, a za třetí vyhodnocení jejich chování. Můj úkol představovala část třetí, tedy vyhodnocení natočených videozáznamů.

#### 3.3.1. Experimentální skupiny zvířat

Experimentu se zúčastnilo celkem 125 zvířat, z toho bylo 42 manipulovaných samců, 26 nemanipulovaných samců sloužících jako stimuly pro manipulovaná zvířata, 43 manipulovaných samic a 14 nemanipulovaných samic sloužících jako stimuly pro manipulovaná zvířata. Manipulovaní jedinci byli umístěni v chovném zařízení o rozměrech 20 x 20 x 10 cm a zvířata figurující jako stimulus v boxech 28 x 15 x 10 cm při stabilní teplotě 27°C. Do vybavení chovného boxu patřila miska na vodu a plastový úkryt. Zvířata dostávala jednou týdně cvrčky pokryté Roboranem H. Během každého krmení byla doplněna čerstvá voda obohacená vápníkem a jednou za čtrnáct dní vitamínem A, D<sub>3</sub> a E.

Manipulovaní samci byli rozděleni do tří experimentálních skupin. U kontrolních samců (dále jen *K*) se provedla jen operace bez dalšího zásahu do reprodukčních orgánů. Samcům s testosteronovým implantátem (dále jen *T*) se odstranily gonády a do břišní dutiny se jim vložil silikonový implantát uvolňující testosteron. Kastrovaným samcům (dále jen *C*) se chirurgicky odebraly pohlavní orgány.

Se samicemi byly provedeny následující manipulace: U jedné skupiny samic byla provedena operace bez ovlivnění funkcí jejich gonád. Tyto samice byly před pokusem spářeny (dále jen *M*). U další skupiny byla rovněž provedena operace, ale jinak se funkce jejich pohlavních orgánů neovlivňovala (dále jen *NM*). Na rozdíl od *M* samic nebyly tyto nikdy pářeny. Zvířatům označeným jako *O* se odoperovaly gonády. U *T* samic byly vaječníky ponechány netknuté, ale do břišní dutiny jim byl vložen silikonový implantát uvolňující testosteron. Skupiny manipulovaných samců se vzájemně nelišily ve velikosti a stáří, stejně tomu bylo i u manipulovaných samic.

Před zákrokem došlo k uspání zvířat pomocí ketaminu. Testosteronový implantát



obsahoval 300  $\mu$ L krystalického testosteronu (bližší informace v Golinski et al., 2011). Po zákroku byli gekoni ponecháni v klidu po dobu cca jednoho měsíce kvůli rekonvalescenci. Poté se u jedinců provádělo kontrolní měření hladin testosteronu pomocí analýzy RIA (bližší informace v Hampl, 1994), na jehož základě byli z pokusů vynecháni tři *T* samci, jejichž hladiny byly příliš nízké.

### 3.3.2. Podmínky natáčení

Pro porovnání vlivu hladiny testosteronu na sexuální a agonistické chování zvířat se sledovala interakce mezi fokálním manipulovaným samcem a nemanipulovaným samčím nebo samičím stimulem. Interakce mezi fokálním samcem a samičím stimulem byla zaznamenávána nejdříve v neutrální aréně, potom byla pro každého jedince zopakována v domácím prostředí fokálního zvířete. Díky tomu bylo možné zjistit vliv prostředí, ve kterém se experiment konal, na sledované chování. Interakce fokální samec versus samčí stimulus se odehrávala jen v domácím prostředí fokálního zvířete, aby průběh agonistických reakcí nebyl ovlivněn novým prostředím pro jednoho z účastníků interakce.

Interakce fokální samice a stimulus samec byly natáčeny v domácím prostředí fokálního zvířete. Při řešení otázky, zda se samice s jednotlivými ošetřeními signifikantně liší v pravděpodobnosti kopulace, se z analýzy vynechaly *M* samice, aby bylo možné porovnat vliv změn hormonálních hladin u zvířat, která ještě nikdy nebyla pářena. Interakce fokální samice se stimulem samcem se nahrávaly opět v domácím prostředí samice.

Videozáznamy byly pořizovány v období přibližně jednoho měsíce od 26. 4. 2010 do 27. 5. 2010 vždy během noci od 18:30, přičemž doba natáčení se přizpůsobovala aktuální potřebě. Pořizování záznamů probíhalo v noci z toho důvodu, že madagaskarský gekon je noční zvíře (Röll, 2000). Natáčení se odehrávalo při tlumeném světle za pomoci kamery s nočním viděním značky Sony.

Pokud se natáčelo v domácím prostředí, pět minut před začátkem se vyndala miska na pití a úkryt. Během interakce mezi zvířaty byl box zakryt průhledným sklem, aby zvířata nemohla utéct. Některé stimuly figurovaly při natáčení opakovaně, ale během jednoho večera se interakce účastnily pouze jednou a následně byly použity nejdříve po 24 hodinách. V případě, že byly pořizovány záznamy chování mezi manipulovaným samcem a stimulem, stimulus vystupoval v další interakci až po uplynutí 48 hodin. Každé fokální zvíře se účastnilo interakce s jedním konkrétním stimulem pouze jednou. Před každým natáčením v aréně bylo toto prostředí vytopeno na teplotu 25–27°C, která byla následně udržována.

Videozáznamy byly natáčeny vždy po dobu 15 minut, pokud nedošlo k páření. Jestliže se zvířata začala pářit, byl záznam přerušen ve chvíli, kdy došlo k intromisi. V případě, že nastala prudká potyčka, při které bylo jedno zvíře vůči druhému příliš agresivní, byli od sebe jedinci odděleni, což mělo za následek ukončení monitorování.

Pokud se interakce odehrávala v neutrálním prostředí, bylo do ní nejprve vpuštěno fokální zvíře a teprve po něm stimulus. Když se videozáznam pořizoval v domácím prostředí, k fokálnímu zvířeti se jen přidal stimulus. Vyhodnocování chování začalo vždy dvacet vteřin po té, co se v aréně objevil stimulus. Díky zmiňovanému zpoždění dostala zvířata prostor, aby se mohla dostatečně uklidnit.

### 3.3.3. Vyhodnocení videozáznamů

Při přehrávání pořízených nahrávek se pomocí programu JWatcher zaznamenávaly jednotlivé typy chování (viz tab. č. 1), číslo pokusu, pořadí natáčecího dne, datum, kód fokálního zvířete a stimulu. Celkem proběhlo vyhodnocení 166 záznamů. Aby bylo vyeliminováno subjektivní vyhodnocování, nevěděla jsem předem, do jaké experimentální skupiny fokální zvířete náleží ani jakého je pohlaví.

	<b>Chování</b>	<b>Popis chování</b>
<b>Sexuální chování</b>	being mounted	Stimulus vylézá na záda fokálnímu zvířeti.
	contact	Fyzický kontakt mezi zvířaty.
	approach	Fokální zvíře se přibližuje ke stimulu.
	copulation	Mezi zvířaty dochází ke kontaktu kloakami.
	licking	Fokální zvíře olizuje stimulus.
	attend	Fokální zvíře se podívá na stimulus.
	being copulated	Fokální zvíře je kopulováno stimulem.
	mounting	Fokální zvíře vylézá na záda stimulu.
<b>Nespecifické chování</b>	activity	Fokální zvíře se pohybuje po aréně nebo přechází v jejím rohu.
	labial licking	Fokální zvíře si olizuje labiální štítky..
	tail up	Fokální zvíře zvedá ocas nahoru.
	no movement	Fokální zvíře je v klidu, nehýbe nohama.
<b>Agonistické chování</b>	being attacked	Stimulus kouše nebo útočí na fokální zvíře.
	flee	Fokální zvíře utíká před stimulem.
	attack	Fokální zvíře udělá výpad proti stimulu, popřípadě jej kousne.

Tab. č. 1: Jednotlivé prvky chování sledované u fokálních zvířat.

Během zpracování videozáznamů byly sledovány tři typy chování: sexuální, agonistické a nespecifické.

V tomto případě byly do sexuálního chování zahrnuty následující prvky. Projevení zájmu o stimulus začíná tím, že se na něj fokální zvíře podívá (*attend*). Následně se k němu přiblíží (*approach*) a dojde k prvnímu kontaktu (*contact*). Ten často vypadá tak, že se fokální zvíře

dotkne tlamou stimulu nebo ho začne olizovat (*licking*). Poté následuje chvíle, kdy fokální zvíře vylézá stimulu na záda (*mounting*). Poslední fází je kopulace (*copulation*). Pokud byla fokálním zvířetem samice a stimulem samec, zaznamenávalo se, když samec samici vylézal na záda (*being mounted*) a pářil ji (*being copulated*).

Mezi agonistické chování patří výpad proti druhému zvířeti nebo kousnutí (*attack*). Dále bylo zaznamenáváno takové chování, při kterém se fokální zvíře snažilo utéct před stimulem (*flee*). Podobně se zachycoval útok stimulu na fokální zvíře (*being attacked*).

Za nespecifické chování je v této práci považována aktivita zvířete (*activity*) projevující se tím, že zvíře přechází po prostoru, aniž by si všímalo stimulu. V rámci této skupiny se zohledňuje i doba, kdy se zvíře nepohybovalo vůbec (*no movement*), což se v prostorné aréně stávalo poměrně často. Dále sem patří olizování labiálních štítků (*labial licking*), pomocí kterého zvíře zkoumá pachy ve svém okolí. Jako poslední bylo do této skupiny chování zařazeno zvedání ocasu nahoru (*tail up*). Takto reaguje zvíře mnohdy na přiblížení stimulu.

Výsledky analýzy programu JWatcher byly převedeny do tabulky MS Excel. Z hodnot proběhlo stanovení latence od začátku pokusu do doby, kdy se fokální zvíře poprvé podívalo na stimulus – latence *attend*, a do doby, než se k němu začalo přibližovat – latence *approach*. Dále byla stanovena délka doby mezi *attend* a *approach*, trvání intervalu *approach-contact*, *contact-mounting*, *mounting-copulation*, *contact-being mounted*, *being mounted-being copulated*. Kromě toho byl do tabulky doplněn typ testu: 1 – interakce fokální samec vs. samičí stimulus; 2 – interakce fokální samec vs. samčí stimulus; 3 – interakce fokální samice vs. samičí stimulus; 4 – interakce fokální samice vs. samčí stimulus. Ještě došlo k zaznamenání typu prostředí, ve kterém byl záznam pořízen (C – aréna; D – domácí prostředí), a celkové doby, po kterou záznam trval.

### 3.3.4. Statistické zpracování výsledků

Výsledky se zpracovaly v programu Statistica. Dle charakteru dat byly použity následující testy: analýza hlavních komponent, parametrická či neparametrická analýza variance a *repeated measure ANOVA*. U proměnných s hodnotou 0/1 (např. ke kopulaci došlo/nedošlo) byla použita analýza variance GLZ modelu s logitovou link funkcí a binomickým rozdělením.

Kvůli velkému množství proměnných (latence *attend*, latence *approach*, latence *approach-mounting*, *mounting*, latence *mounting-copulation*, *copulation* atd.) byla jako explorační analýza použita analýza hlavních komponent. Ta počet zadaných proměnných převedla do několika hlavních os. Aby se s osou dále pracovalo, musela vyjadřovat víc než 10 %

variability.

Při statistickém ověřování korelací (*latence attend* a *latence approach*; *total time spent in activity* s *number of labial licking*; *total time of flee* s *number of tail up*) byla použita parametrická analýza variance v případě, že byl splněn předpoklad o normálním rozložení. Pokud tato podmínka splněna nebyla, aplikovala se analýza variance neparametrická, konkrétně *Kruskall Wallis* test (při porovnávání interakce samec-samec: *number of attack*, *number of being attacked*, *number of flee*, *number of tail up*).

Pokud se porovnávalo chování jednoho zvířete ve více pokusech (např. porovnávání chování fokálního samce se samicí v neutrální aréně versus v domácím prostředí) byla použita *repeated measure ANOVA*.

## 3.4. Výsledky

### 3.4.1. Fokální zvíře – samec

Záznamů, kde vystupoval samec jako fokální zvíře, bylo vyhodnoceno 111, z toho jich bylo 37 točeno v neutrální aréně se samičím stimulem, dalších 37 se odehrálo v domácím prostředí fokálního zvířete opět se samičím stimulem. Zbytek byl natočen v domácím prostředí se samčím stimulem.

Hlavní cíl spočíval v porovnávání pravděpodobnosti kopulace fokálního zvířete v závislosti na typu experimentální skupiny. Dále bylo potřeba stanovit, které prvky chování spolu korelují, a porovnat rozdíly v chování fokálních zvířat v aréně a domácím prostředí. Mimo to se analyzovaly odchylky v chování samců vůči samčímu a samičímu stimulu.

#### 3.4.1.1. Fokální samec versus stimulus samice v aréně

Četnost kopulace u jednotlivých experimentálních skupin ukazuje tabulka č. 2. Kontrolní samci a *T* samci kopulovali signifikantně častěji než kastrovaní jedinci (*GLZ* analýza variance:  $\chi^2 = 7,094$ ;  $p = 0,029$ ).

Experimentální skupiny	Kopulace – 1	Kopulace – 0	Celkem
<b>T</b>	5	6	11
<b>C</b>	12	1	13
<b>K</b>	8	5	13

**Legenda:**  
kopulace – 0: počet jedinců, kteří nekopulovali  
kopulace – 1: počet jedinců, kteří kopulovali  
T – samci s testosteronovým implantátem  
C – samci bez gonád  
K – samci s gonádami

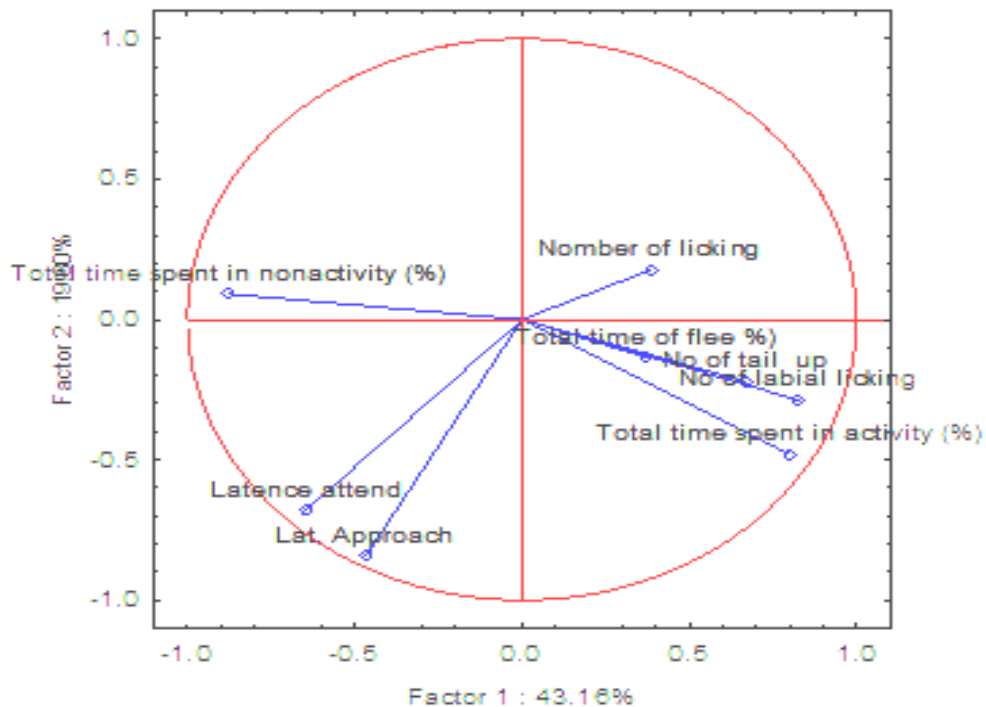
Tab. č. 2: Četnosti kopulací jednotlivých experimentálních skupin se samičími stimuly v neutrálním prostředí.

Podle výsledku analýzy hlavních komponent byly pro další analýzu brány v úvahu tři hlavní komponenty, které vysvětlují celkem 77,94 % variability.

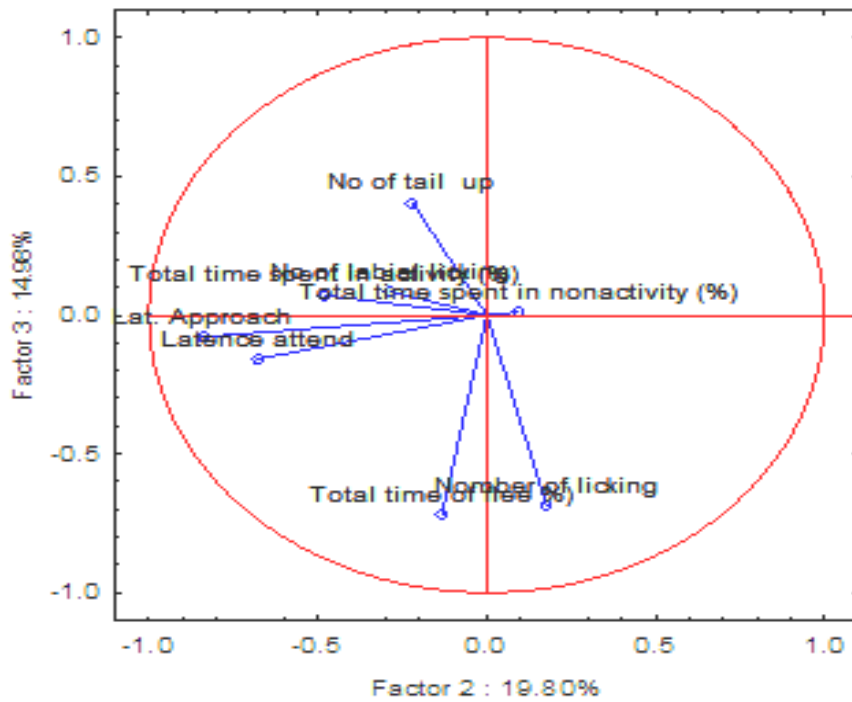
Z explorační analýzy byly stanovené vzájemné možné korelace mezi jednotlivými prvky chování (tab. č. 3; obr. 11a, 11b): *number of labial licking* s *total time spent in activity*, latence *attend* s latencí *approach* a *total time of flee* s *number of tail up*. Jak je vidět, na obr. č. 11b už *total time of flee* nekoreluje s *number of tail up*. *Total time spent in nonactivity* a *total time spent in activity* stojí v grafickém znázornění proti sobě. Pokud se zadá kopulace jako doplňková proměnná, nekoreluje s ostatními proměnnými (obr. č. 12).

Proměnná	PC1	PC2	PC3
<i>Latence attend</i>	-0.644	-0.677	-0.158
<i>Lat. approach</i>	-0.466	-0.841	-0.078
<i>Number of licking</i>	0.385	0.177	-0.686
<i>Total time of flee (%)</i>	0.367	-0.134	-0.721
<i>No of labial licking</i>	0.824	-0.286	0.086
<i>Total time spent in activity (%)</i>	0.799	-0.480	0.071
<i>Total time spent in nonactivity (%)</i>	-0.879	0.091	0.011
<i>No of tail up</i>	0.669	-0.221	0.406

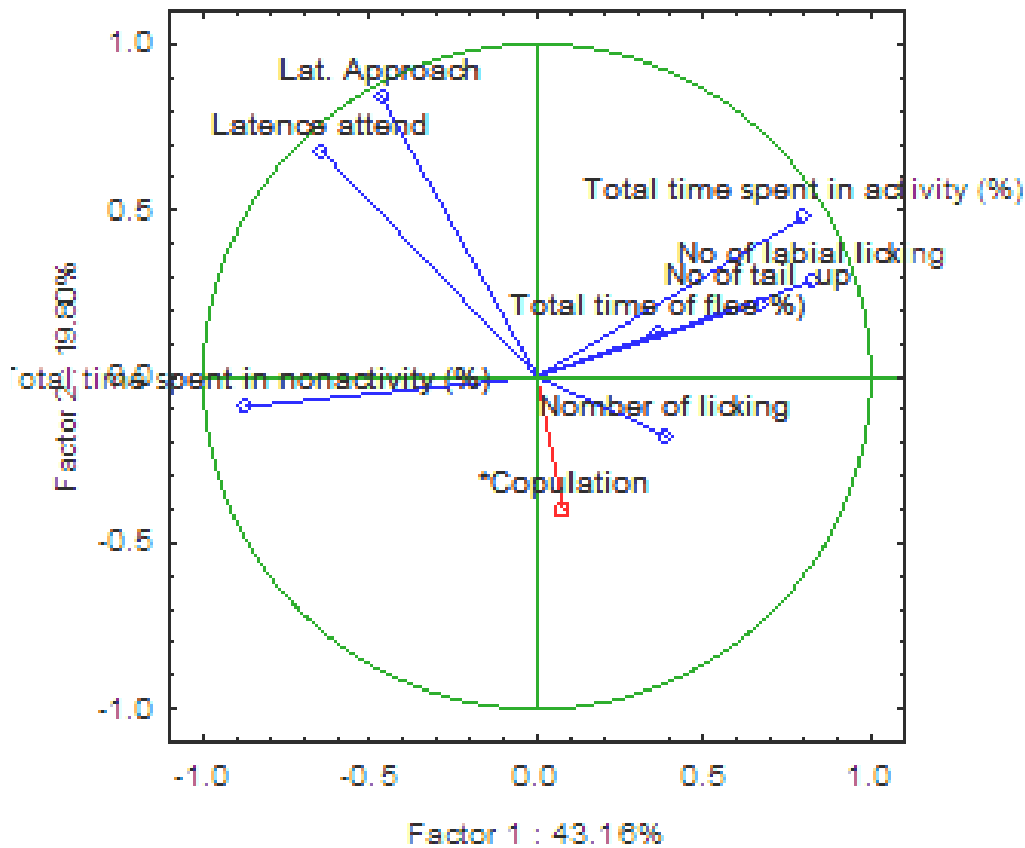
Tab. č. 3: Korelace jednotlivých proměnných s hlavními komponentami u interakce fokální samec vs. samicí stimulus v neutrální aréně. Červeně označeny ty, které překročily hodnotu 0,5.



Obr. č. 11a: Korelace proměnných s první a druhou komponentou u interakce fokální samec vs. samicí stimulus v neutrální aréně.

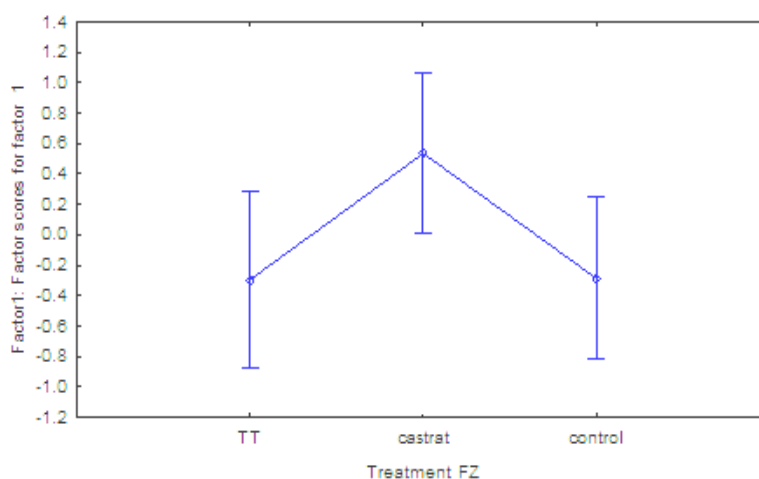


Obr. č. 11b: Korelace proměnných s druhou a třetí komponentou u interakce fokální samec vs. samičí stimulus v neutrální aréně.



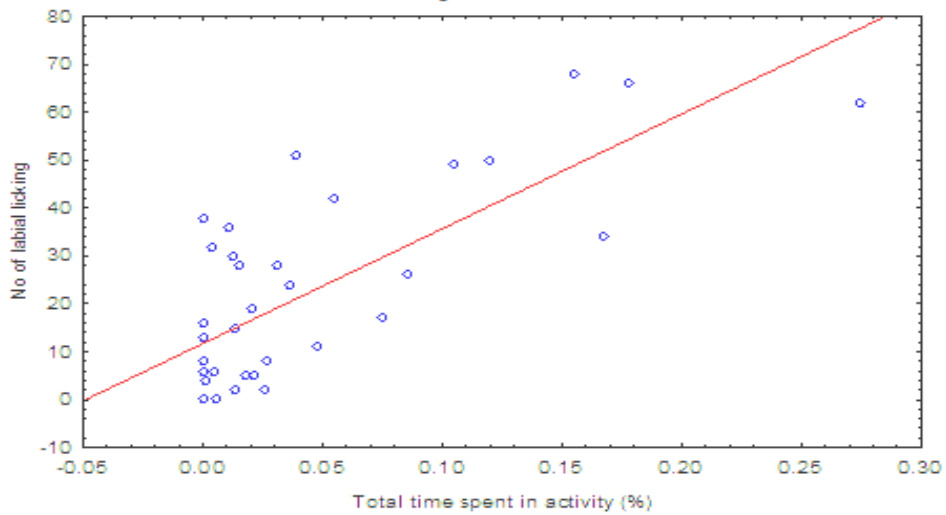
Obr. č. 12: Korelace proměnných s první a druhou osou u interakce fokální samec se samičím stimulem v neutrální aréně. Kopulace zadána jako doplňková proměnná.

Analýzou variance se neprokázal signifikantní rozdíl v hodnotách na druhé a třetí komponentě mezi jednotlivými pokusnými skupinami (PC2:  $F(2, 34) = 1,336$ ;  $p = 0,276$ ; PC3:  $VF(2, 34) = 0,620$ ;  $p = 0,544$ ). Průkazný rozdíl se však objevil u výsledků na první komponentě (PC1:  $F(2, 34) = 3,243$ ;  $p = 0,051$ ). Kastrovaná zvířata se oproti ostatním experimentálním skupinám více olizovala a byla aktivnější (obr. č. 13). U korelace mezi celkovým časem, po který bylo zvíře aktivní, a olizováním labiálních štítků, vyšel výsledek signifikantní: Pearsonův korelační koeficient = 0,747;  $p \ll 0,0001$  (viz obr. č. 14).

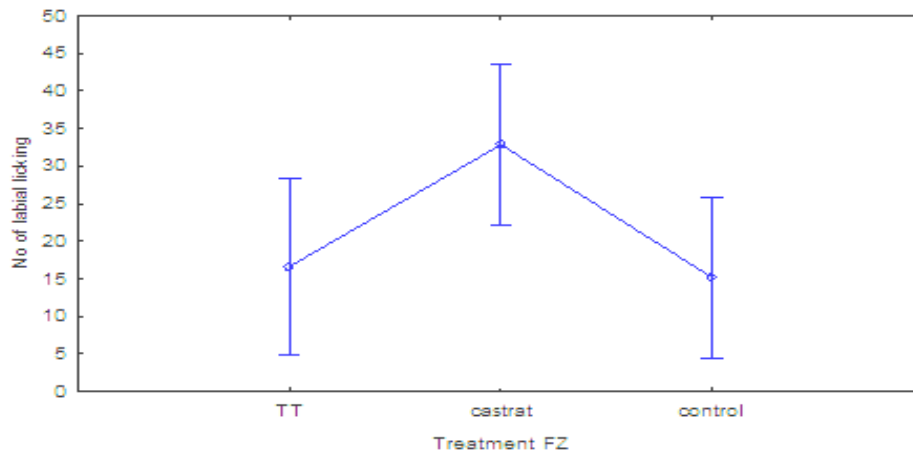


Obr. č. 13: Vliv typu experimentální skupiny na *labial licking* a *total time spent in activity* u interakcí fokální samec vs. samičí stimulus v neutrální aréně. (v grafu jsou vynášeny průměrné hodnoty; konfidenční interval: 0,95)

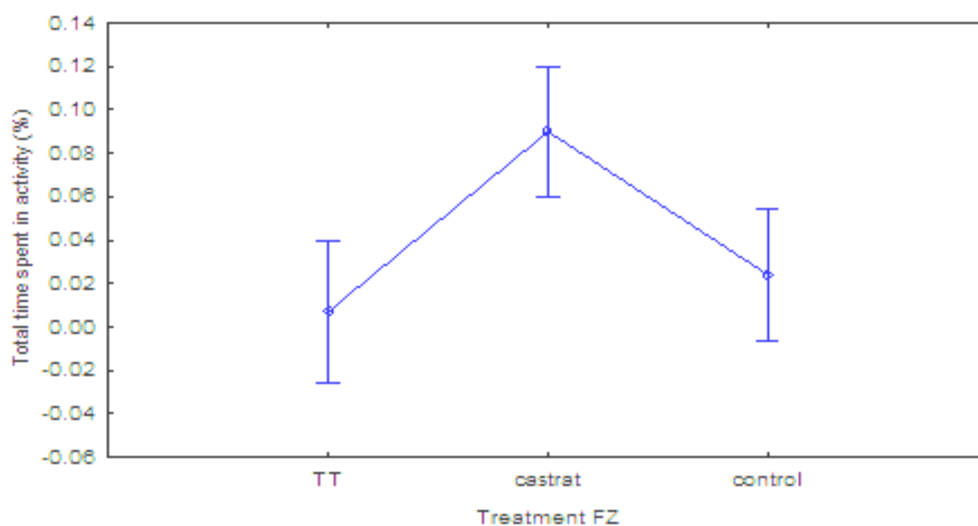




Obr. č. 14: Korelace *number of labial licking* s *total time spent in activity* u kastrovaných samců – interakce fokální samec vs. samičí stimulus v neutrální aréně.



Obr. č. 15: Vliv typu experimentální skupiny na *number of labial licking* – kastráti se víc olizují u interakcí fokální samec vs. samičí stimulus v neutrální aréně. (v grafu jsou vynášeny průměrné hodnoty; konfidenční interval: 0,95)



Obr. č. 16: Vliv hormonálních manipulací na *total time spent in activity* – kastráti jsou aktivnější u interakcí fokální samec vs. samičí stimulus v neutrální aréně. (v grafu jsou vynášeny průměrné hodnoty; konfidenční interval: 0,95)

Během testů byli kastrovaní samci aktivnější ( $F(2, 34) = 8,386$ ;  $p \ll 0,0001$ ; obr. č. 16) a více se olizovali ( $F(2, 34) = 3,362$ ;  $p = 0,047$ ; obr. č. 15) než samci kontrolní a samci s *T* implantáty.

### 3.4.1.2. Fokální samec versus stimulus samice v domácím prostředí

Četnost kopulace u jednotlivých experimentálních skupin ukazuje tabulka č. 4. Kontrolní samci a samci s testosteronovým implantátem mají vyšší tendenci kopulovat (*GLZ* analýza variance:  $\chi^2 = 25,683$ ;  $p \ll 0,0001$ ) než kastrovaní samci, kteří v těchto testech nekopulovali vůbec.

Experimentální skupiny	Kopulace – 1	Kopulace – 0	Celkem
<b>T</b>	7	4	11
<b>C</b>	0	13	13
<b>K</b>	11	2	13

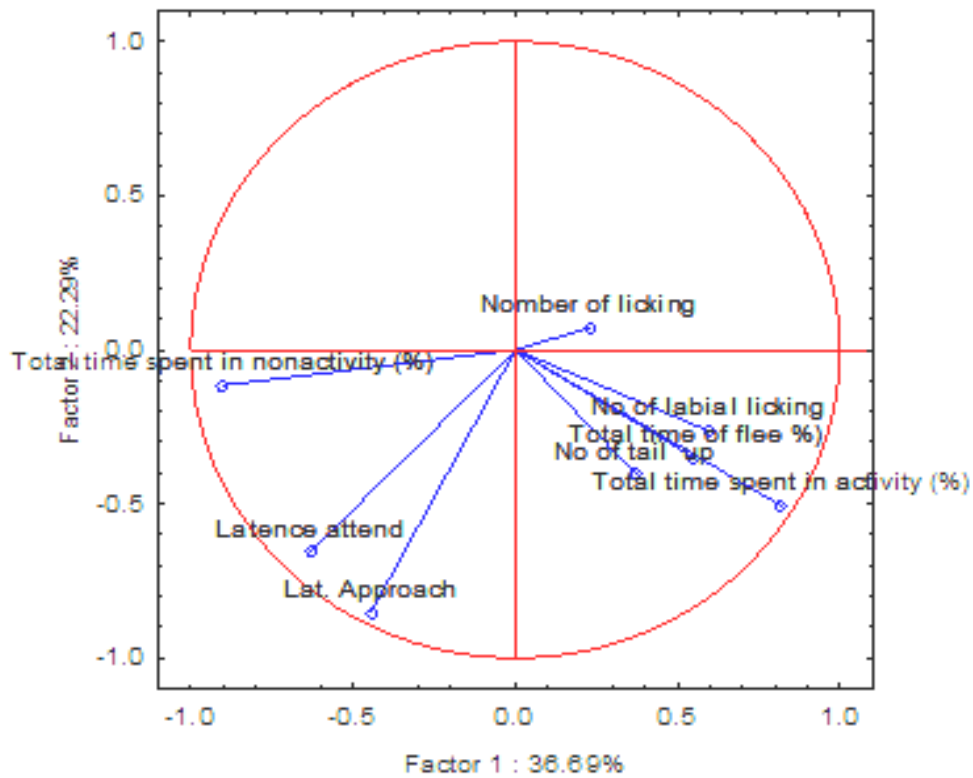
**Legenda:**  
kopulace – 0: počet jedinců, kteří nekopulovali  
kopulace – 1: počet jedinců, kteří kopulovali  
T – samci s testosteronovým implantátem  
C – samci bez gonád  
K – samci s gonádami

Tab. č. 4: Četnosti kopulací jednotlivých experimentálních skupin samců v interakci se samičími stimuly v domácím prostředí.

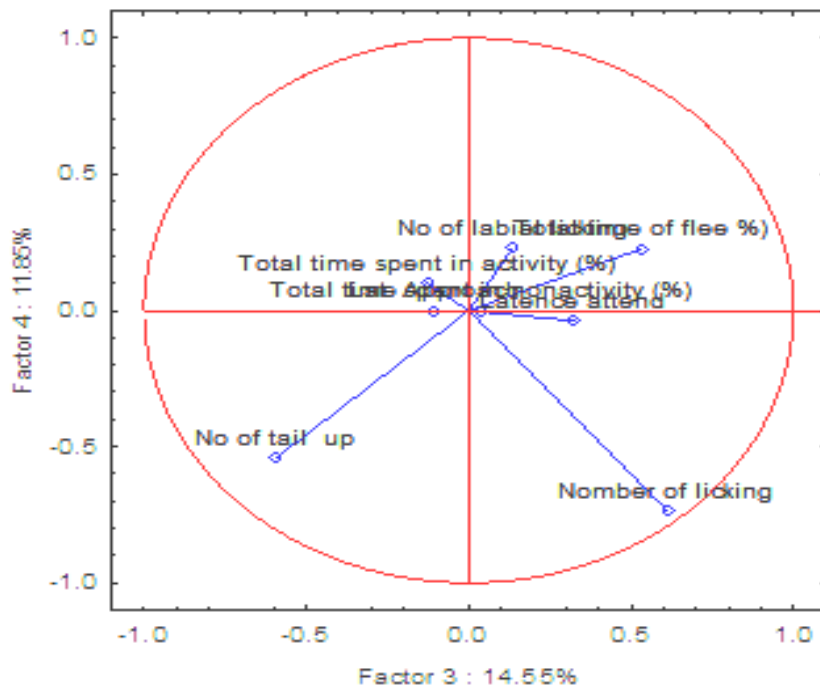
Analýza hlavních komponent stanovila pro další statistické zpracování čtyři hlavní komponenty, které vysvětlují celkem 85,38 % variability. Z explorační analýzy vyplynuly vzájemné korelace mezi jednotlivými prvky chování (obr. č. 17a, 17b, tab. č. 5): *number of labial licking* s *total time spent in activity*, *latence attend* s *latencí approach* a *total time of flee* s *number of tail up*. Pokud se kopulace zadá jako doplňková proměnná (obr. č. 18), vyjde najevo, že koreluje s *latencí attend* a *approach*.

Proměnné	PC1	PC2	PC 3	PC4
<i>Latence attend</i>	-0.631	-0.654	0.324	-0.038
<i>Lat. approach</i>	-0.446	-0.852	-0.107	-0.001
<i>Number of licking</i>	0.231	0.072	0.611	-0.734
<i>Total time of flee (%)</i>	0.552	-0.351	0.534	0.227
<i>No of labial licking</i>	0.595	-0.263	0.135	0.230
<i>Total time spent in activity (%)</i>	0.819	-0.506	-0.129	0.099
<i>Total time spent in nonactivity (%)</i>	-0.903	-0.116	0.037	-0.003
<i>No of tail up</i>	0.372	-0.402	-0.594	-0.541

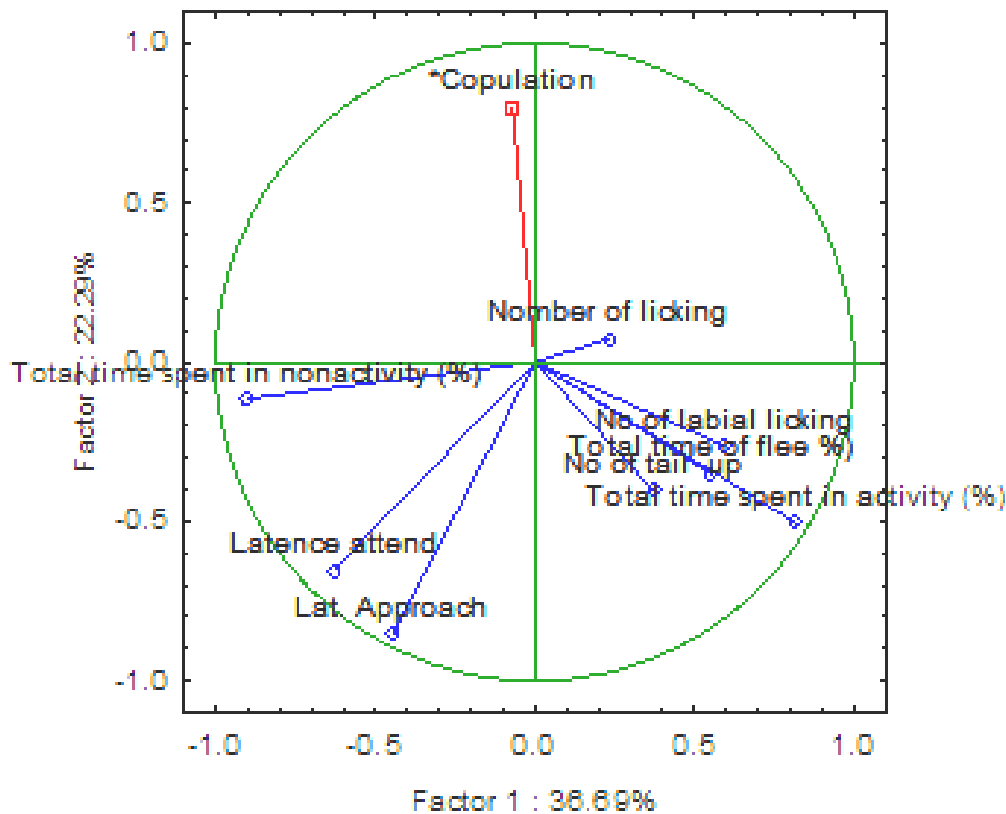
Tab. č. 5: Korelace jednotlivých proměnných s hlavními komponentami v interakci fokální samec vs. samičí stimulus v domácím prostředí. Červeně označeny ty, které překročily hodnotu 0,5.



Obr. č. 17a: Korelace proměnných s první a druhou osou u interakcí fokální samec vs. samičí stimulus v domácím prostředí.

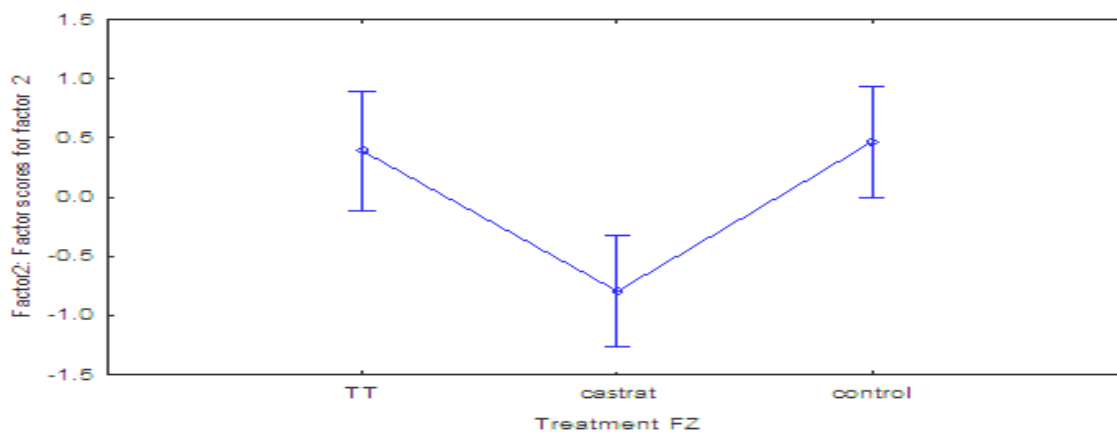


Obr. č. 17b: Korelace proměnných s třetí a čtvrtou osou u interakcí fokální samec vs. samičí stimulus v domácím prostředí.

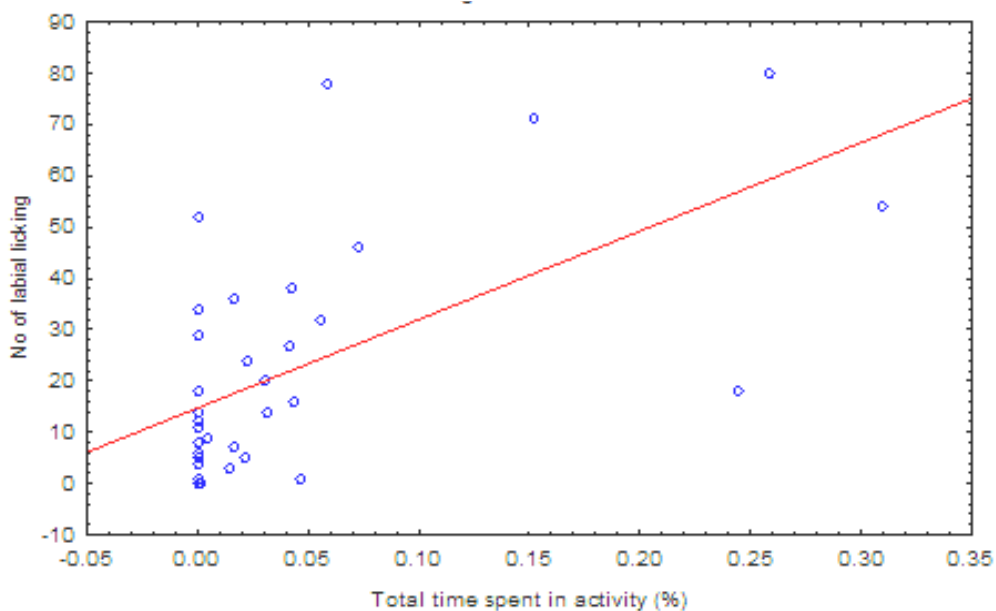


Obr. č. 18: Korelace proměnných s první a druhou osou u interakcí fokální samec vs. samicí stimulus v domácím prostředí. Kopulace zadána jako doplňková proměnná.

Analýzou variance se nepodařilo prokázat signifikantní rozdíl v hodnotách na první, třetí a čtvrté komponentě mezi jednotlivými pokusnými skupinami (PC1:  $F(2, 34) = 1,005$ ;  $p = 0,377$ ; PC3:  $F(2, 34) = 0,147$ ;  $p = 0,863$  a PC4:  $F(2, 34) = 0,849$ ;  $p = 0,437$ ). Signifikantní rozdíl se projevil v PC2 (obr. č. 19). Kastrování samci se zajímali o stimulus po uplynutí prokazatelně delší doby než ostatní skupiny  $F(2, 34) = 9,259$ ;  $p = 0,001$ .



Obr. č. 19: Kastráti mají vyšší latenci *attend* v rámci interakcí fokálních samců se samičími stimuly v domácím prostředí.  
(v grafu jsou vynášeny průměrné hodnoty; konfidenční interval: 0,95)



Obr. č. 20: Korelace mezi *labial licking* a *total time spent in activity* v rámci interakcí fokálních samců se samičími stimuly v domácím prostředí.

Na obrázku č. 20 je vidět korelace mezi *number of licking* a *total time spent in activity* (0,5964,  $p \ll 0.0001$ ). Výsledek je signifikantní stejně jako tomu bylo u záznamů z arény.

### 3.4.1.3. Porovnání chování fokálního samce vs. samicí stimuly mezi arénou a domácím prostředím

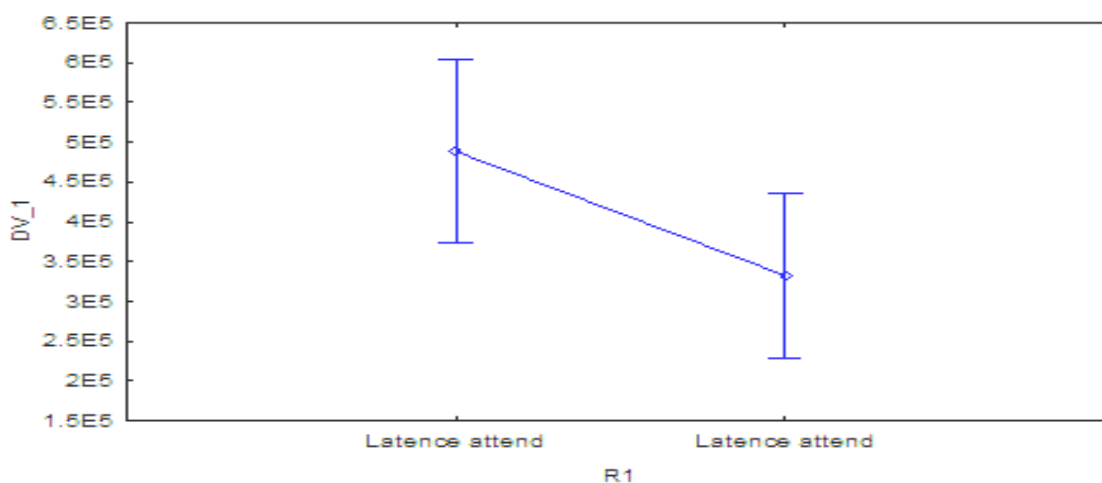
V této části analýzy výsledků se zjišťovalo, zda některé prvky chování vykazují rozdíly v závislosti na prostředí, kde se záznamy natáčely. Porovnávalo se chování fokálních samců vůči stimulům samicím mezi arénou a domácím prostředím.

Předmětem analýzy bylo zjištění rozdílů v latenci *attend*, latenci *approach*, intervalu *mounting-copulation*, *number of labial licking* a *total time spent in activity*. Při výpočtech byl použit test *Repeated measure ANOVA*.

U zvířat monitorovaných v domácím prostředí je latence *attend* signifikantně kratší  $F(2, 34) = 4,281$ ;  $p = 0,046$  (obr. č. 21). V latenci *approach* výsledek signifikantní není:  $F(2, 34) = 1,309$ ;  $p = 0,284$ .

Při srovnání chování testosteronových a kontrolních samců, kteří kopulovali, mezi arénou a domácím prostředím zjistíme, že doba mezi *mounting* a *copulation* je srovnatelně dlouhá ( $F(1, 7) = 0,803$ ,  $p = 0,400$ ).

V porovnání chování mezi arénou a domácím prostředím u jednotlivých skupin se ukázal signifikantní rozdíl v *labial licking* ( $F(2, 34) = 91,919$ ;  $p = 0,001$ ) a *total time spent in activity* ( $21,396$ ;  $p = 0,001$ ). Samci jsou v aréně aktivnější a víc si olizují labiální štítky.



Obr. č. 21: Porovnání latence *attend* u interakcí fokální samec vs. samicí stimulus mezi arénou a domácím prostředím.

(v grafu jsou vynášeny průměrné hodnoty; konfidenční interval: 0,95)

### 3.4.1.4. Fokální samec versus stimulus samec v domácím prostředí

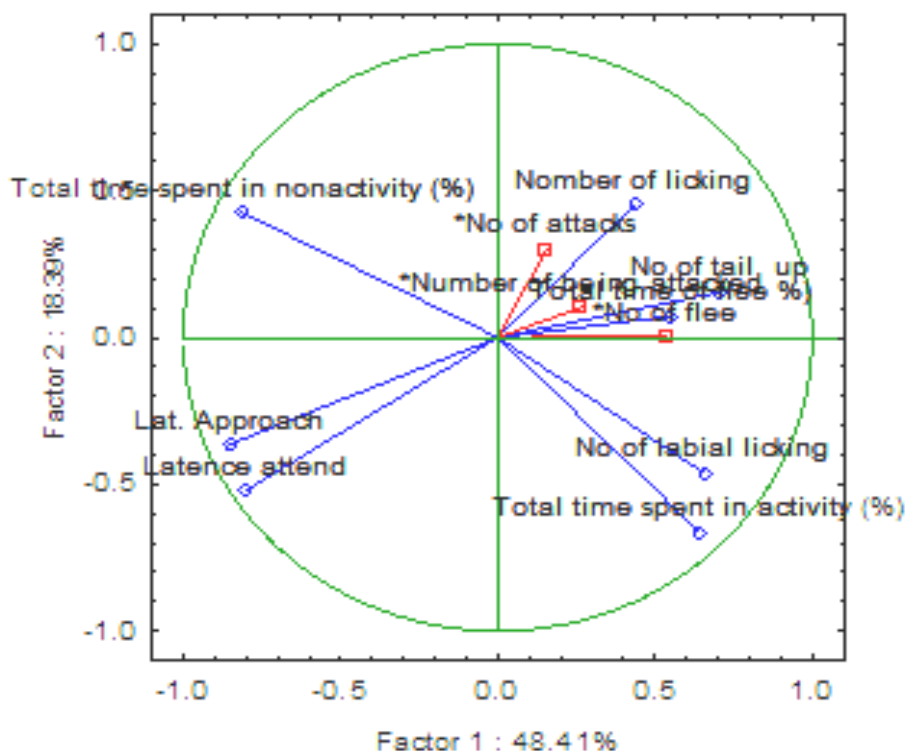
Pokud byl fokální samec ponechán v interakci se stimulem samcem, nedocházelo k páření. Ani agonistické chování nebylo příliš výrazné.

Z analýzy hlavních komponent byly v dalších výpočtech brány v úvahu tři hlavní komponenty, které vysvětlují celkem 80,6 % variability. Z explorační analýzy byly stanovené možné vzájemné korelace mezi jednotlivými prvky chování (obr. č. 22a a č. 22b, tab. č. 6). Na první pohled spolu koreluje *number of labial licking* s *total time spent in activity*, *total time of flee* s *number of tail up* a *latence attend* s *latencí approach*.

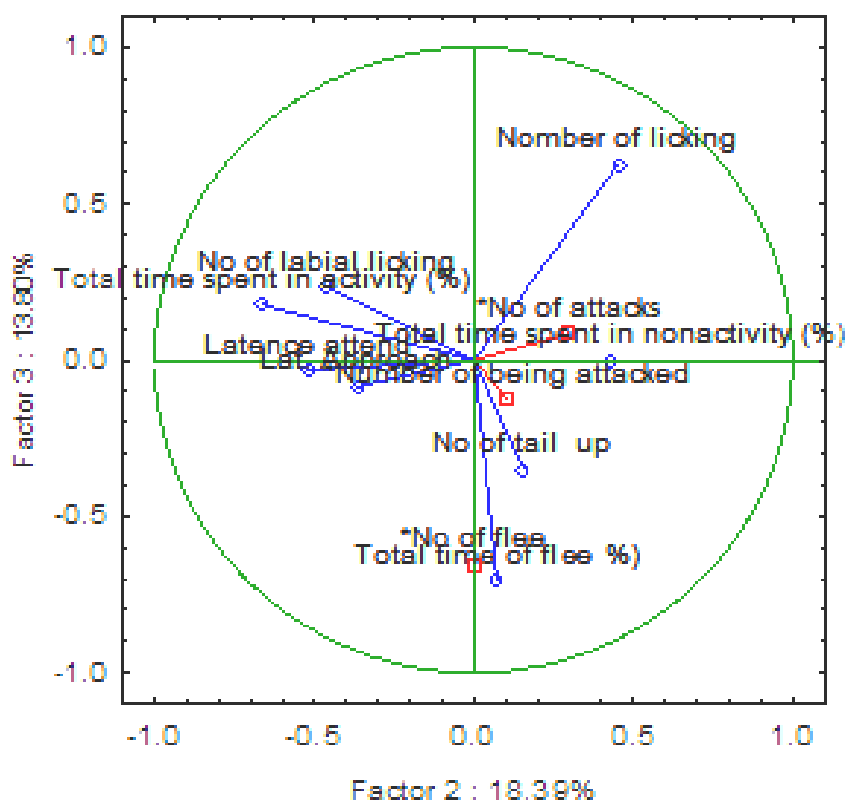
Proměnné	PC1	PC2	PC3
<i>Latence attend</i>	-0.801	-0.520	-0.032
<i>Lat. approach</i>	-0.856	-0.365	-0.085
<i>Number of licking</i>	0.434	0.452	0.626
<i>Total time of flee (%)</i>	0.552	0.073	-0.704
<i>No of labial licking</i>	0.655	-0.460	0.234
<i>Total time spent in activity (%)</i>	0.642	-0.664	0.177
<i>Total time spent in nonactivity (%)</i>	-0.815	0.427	0.000
<i>No of tail up</i>	0.707	0.155	-0.345
* <i>No of attacks</i>	0.155	0.301	0.086
* <i>Number of being attacked</i>	0.267	0.104	-0.125
* <i>No of flee</i>	0.534	0.003	-0.656

Tab. č. 6: Korelace jednotlivých proměnných s hlavními komponentami v interakci fokální samec vs. stimulus samec v domácím prostředí. Červeně označeny ty, které překročily hodnotu 0,5. Proměnné označené hvězdičkou byly zadány jako doplňkové.



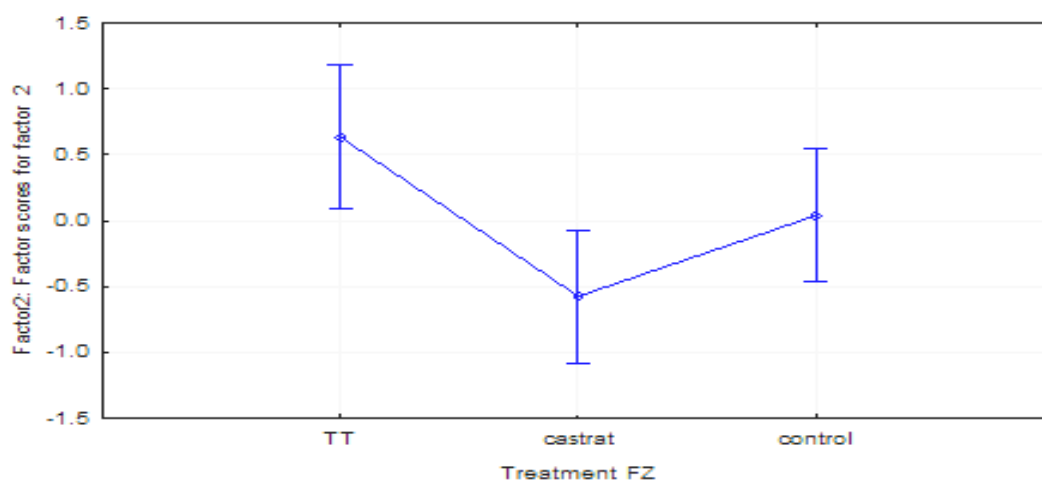


Obr. č. 22a: Korelace proměnných s první a druhou osou u interakcí fokální samec vs. stimulus samec v domácím prostředí. *Number of flee*, *number of attack*, *number of being attacked* jsou zadány jako doplňkové proměnné.



Obr. č. 22b: Korelace proměnných s druhou a třetí osou u interakcí fokální samec vs. samčí stimulus v domácím prostředí. *Number of flee*, *number of attach*, *number of being attacked* jsou zadány jako doplňkové proměnné.

Analýza variance neprokázala signifikantní rozdíl v hodnotách na první a třetí komponentě mezi jednotlivými pokusnými skupinami (PC1:  $F(2, 34) = 0,107$ ;  $p = 0,899$ ; PC3:  $F(2, 34) = 2,205$ ;  $p = 0,126$ ). V PC2 výsledek signifikantní je: kastrování samci mají oproti *T* samcům delší *total time spent in activity* a delší latenci *attend* (obr. č. 23).

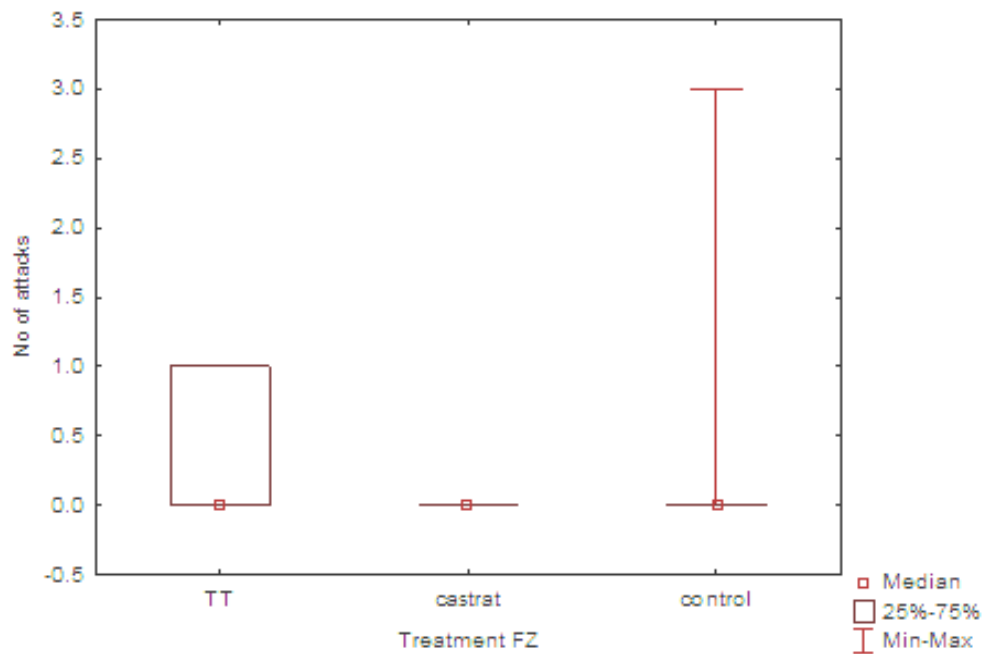


Obr. č. 23: Porovnání experimentálních skupin mezi sebou ve vztahu k *total time of activity* a latenci *attend* v interakcích fokální samec vs. stimulus samec v domácím prostředí.

(v grafu jsou vynášeny průměrné hodnoty; konfidenční interval: 0,95)

Při porovnání *number of attack* mezi jednotlivými skupinami samců za pomoci neparametrické ANOVY, konkrétně *Kruskal-Wallis* testem, vyšel výsledek nesignifikantní:  $H(2, 37) = 4,858$ ;  $p = 0,881$  (obr. č. 24). Dále se obdobným způsobem porovnával rozdíl mezi skupinami v *number of being attacked*:  $H(2, 37) = 1,846$ ;  $p = 0,397$ ; *number of flee*:  $H(2, 37) = 0,969$ ;  $p = 0,616$ , *number of tail up*:  $H(2, 37) = 0,554$ ;  $p = 0,758$ . Ani v jednom z těchto případů nebyl signifikantní rozdíl mezi jednotlivými experimentálními skupinami.

Stejný výsledek se objevil i při porovnávání latence *attend*:  $F(2, 34) = 1,267$ ;  $p = 0,295$ ; latence *approach*:  $F(2, 34) = 1,230$ ;  $p = 0,0516$ ; *total time spent in activity*:  $F(2, 34) = 1,800$ ;  $p = 0,181$ ; a *number of licking*:  $F(2, 34) = 0,653$ ;  $p = 0,527$ . Podobně u *total time spent in nonactivity*:  $F(2, 34) = 1,357$ ;  $p = 0,271$ ; a u *total time of flee*:  $F(2, 34) = 1,251$ ;  $p = 0,299$ .

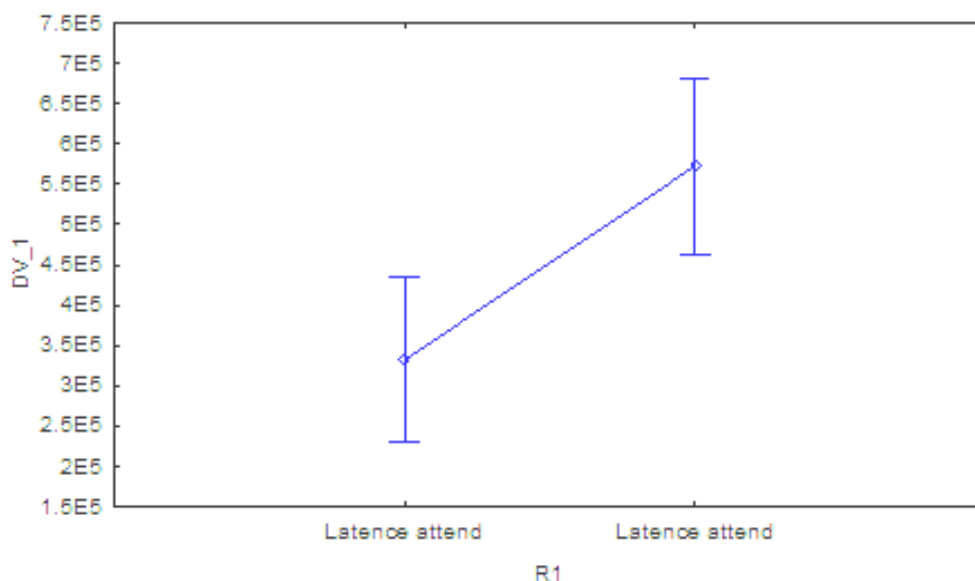


Obr. č. 24: Porovnání *number of attack* mezi jednotlivými experimentálními skupinami fokálních samců v interakci se samčím stimulem v domácím prostředí.

Jediné, co signifikantně koreluje při použití Spearmanova korelačního koeficientu, je *total time of flee* s *number of tail up* (Spearmanův korelační koeficient = 0,501994;  $p < 0,05$ ).

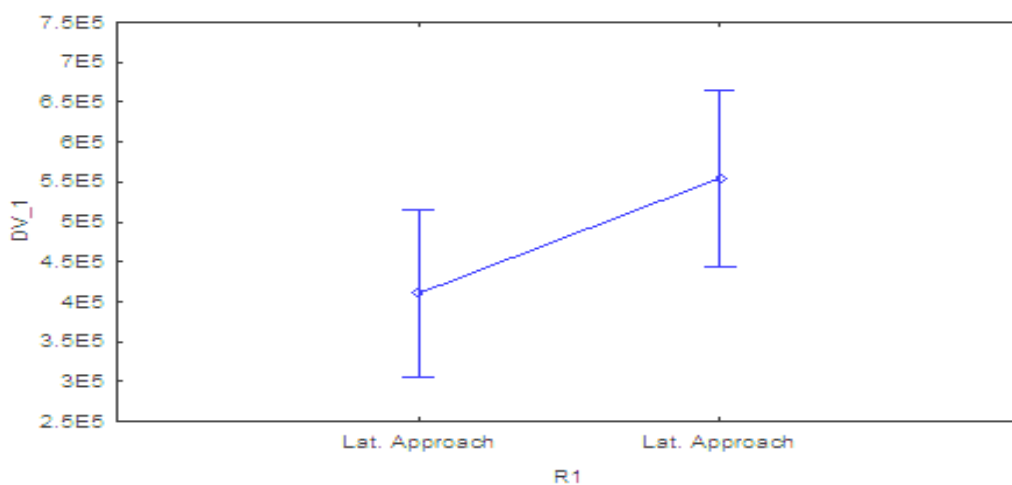
### 3.4.1.5. Fokální samec versus stimulus samice a stimulus samec v domácím prostředí

Další zajímavý cíl analýzy představovalo zjištění, zda fokální samci reagují dříve na stimulus samici či samce. Z výsledků vyplývá, že latence *attend* je kratší, když je fokální zvíře se samicí:  $F(1, 34) = 15,695$ ;  $p = 0,001$  (obr. č. 25). Obdobný výsledek vyjde i u porovnávání latence *approach*  $F(1, 34) = 6,592$ ;  $p = 0,015$ . K samici se přiblíží fokální zvíře dřív než k samci (obr. č. 26).



Obr. č. 25: Porovnání latence *attend* fokálního zvířete vůči stimulu samci a stimulu samici v domácím prostředí.

(v grafu jsou vynášeny průměrné hodnoty; konfidenční interval: 0,95)

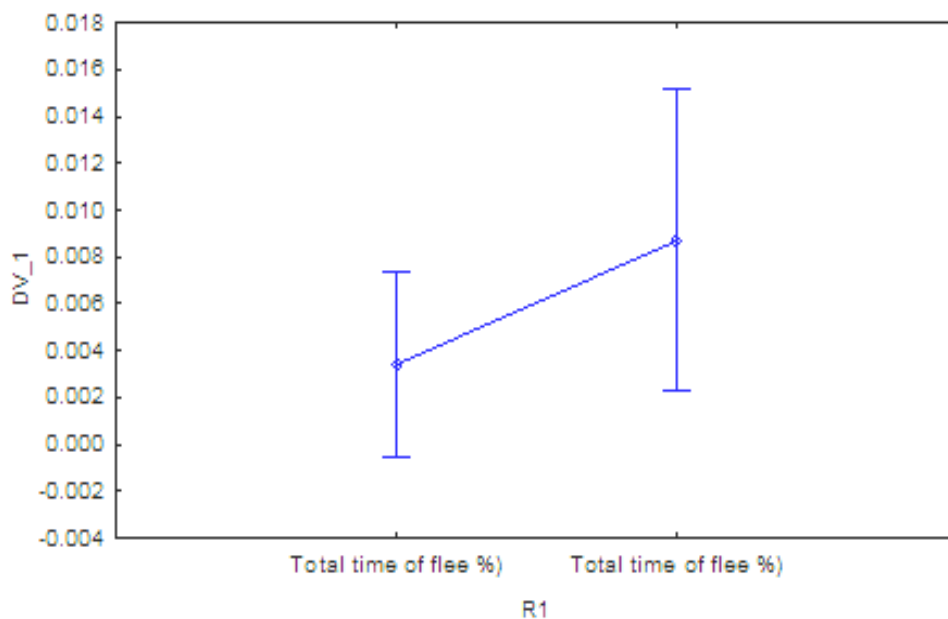


Obr. č. 26: Porovnání latence *approach* fokálního zvířete vůči stimulu samci a stimulu samici v domácím prostředí.

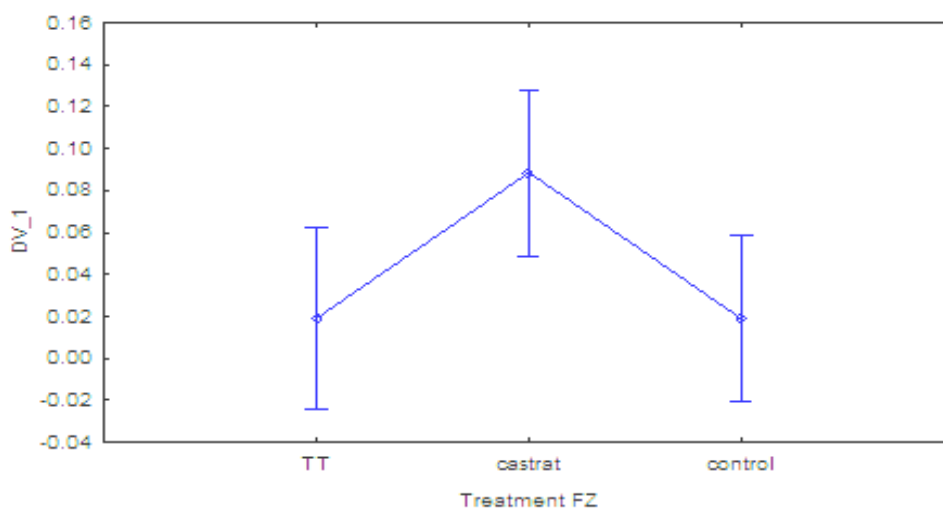
(v grafu jsou vynášeny průměrné hodnoty; konfidenční interval: 0,95)

*Number of licking* fokálního zvířete se signifikantně neliší v závislosti na pohlaví stimulu  $F(1, 34) = 3,009$ ;  $p = 0,092$ . U *total time spent in activity* se výsledky liší jen u jednotlivých experimentálních skupin (obr. č. 27) a to tak, že kastráti jsou pohyblivější oproti ostatním:  $F(2, 34) = 4,135$ ;  $p = 0,025$ . V tomto případě nehraje pohlaví stimulu žádnou roli.

U *total time of flee* fokálních zvířat v závislosti na pohlaví stimulu vyšel téměř signifikantní výsledek:  $F(1, 34) = 3,773$ ;  $p = 0,060$ . Fokální zvíře více utíká, pokud je stimulem samec (obr. č. 28). Pokud jde o *number of tail up*, výsledek signifikantní není.

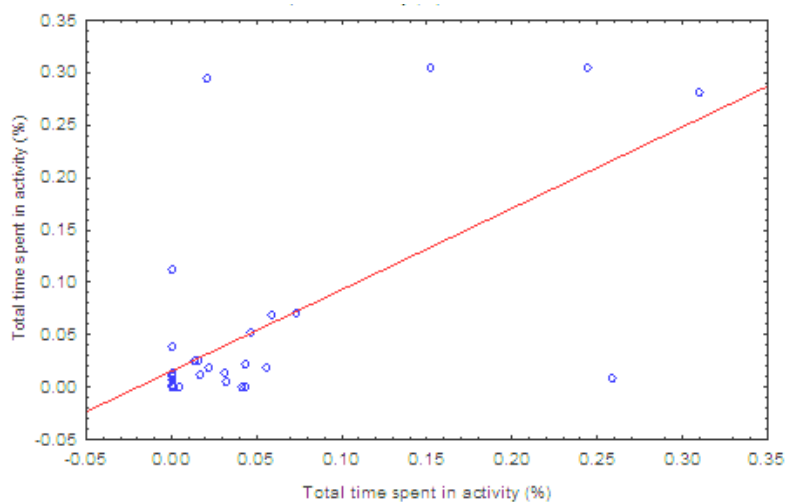


Obr. č. 27: Porovnání rozdílů mezi *total time of flee* u interakce samec vs samec nebo samice v domácím prostředí.  
(v grafu jsou vynášeny průměrné hodnoty; konfidenční interval: 0,95)



Obr. č. 28: *Total time of flee* fokálního zvířete v závislosti na pohlaví stimulu v domácím prostředí.  
(v grafu jsou vynášeny průměrné hodnoty; konfidenční interval: 0,95)

Dále koreluje *total time spent in activity* mezi interakcí samce se samcem či samicí (korelační koeficient 0,517;  $p < 0,05$ ; obr. č. 29). Zvíře stráví aktivitou stejnou dobu bez ohledu na pohlaví stimulu. Kromě toho koreluje i latence *attend* s latencí *attend* mezi interakcí se samcem a samicí (Spearmanův korelační koeficient 0,365;  $p < 0,05$ ) a latence *approach* s latencí *approach* (Spearmanův korelační koeficient 0,426;  $p < 0,05$ ).



Obr. č. 29: Korelace mezi *total time spent in activity* mezi stimulem samcem a samicí v domácím prostředí.

### 3.4.2. Fokální zvíře – samice

Záznamů, kde vystupovaly samice jako fokální zvíře, bylo vyhodnoceno 57, z toho 27 jich bylo točeno vždy v domácím prostředí fokálního zvířete se samčím stimulem. Zbýlých 30 se odehrávalo v domácím prostředí se samičím stimulem.

Za hlavní cíl byla stanovena komparace, zda se liší zvířata s různým typem experimentální skupiny v pravděpodobnosti *being copulated*, a zjištění vzájemně korelujících prvků chování. Mimo to se analyzovaly difference v chování fokálních samic vůči stimulu samci a stimulu samici.

#### 3.4.2.1. Fokální samice versus stimulus samec v domácím prostředí

Četnost *being mounted* u jednotlivých experimentálních skupin samic ukazuje tabulka č. 7. Jednotlivé skupiny samic se mezi sebou v četnostech *being mounted* signifikantně neliší (GLZ analýza variance:  $\chi^2 = 5,565$ ;  $p = 0,062$ ). Po prozkoumání celkové četnosti (tab. č. 7) u proměnné *being copulated* vyvstane, že NM samice byly přeci jen pro samce atraktivnější než ostatní dvě skupiny samic.

Experimentální skupiny	Being Copulated – 1	Being Copulated – 0	Celkem
NM	3	5	8
O	0	9	9
T	1	9	10

**Legenda:**

Being Copulated – 0: počet samic, které nebyly kopulovány  
Being Copulated – 1: počet samic, které byly kopulovány  
NM – kontrolní samice, nepářené před pokusem  
O – samice bez gonád  
T – samice s testost. implantátem

Tab. č. 7: Četnosti *being copulated* u experimentálních skupin samic v interakci se samčím stimulem v domácím prostředí.

Z analýza hlavních komponent byly v dalších výpočtech brány v úvahu tři hlavní komponenty, které vysvětlují celkem 85,19 % variability. Z explorační analýzy byly stanovené vzájemné možné korelace mezi jednotlivými prvky chování (tab. č. 8, obr. 30): *number of labial licking* s *total time spent in activity*, *latence attend* s *latencí approach* a *total time of flee* s *number of tail up*. Zároveň proti sobě jde *total time spent in activity* a *total time spent in nonactivity*. *Latence attend* a *approach* stojí proti *total time of flee*. U doplňkových proměnných se žádná korelace neprojevila.

Počet případů, kdy fokální zvířata útočila na stimulus nebo byla kopulována či stimulus útočil na ně, byl příliš nízký, než aby byly výsledky průkazné.





### 3.4.2.2. Fokální samice versus stimulus samice v domácím prostředí

Četnost kopulace u jednotlivých experimentálních skupin ukazuje tabulka č. 9. Samice s *T* implantátem kopulovaly signifikantně častěji než zbylé dvě skupiny (*GLZ* analýza variance:  $\chi^2 = 28,663$ ;  $p \ll 0,0001$ ).

Experimentální skupiny	Copulation – 1	Copulation – 0	Celkem
M	0	9	9
O	0	9	9
T	9	1	10

**Legenda:**

Copulation – 0: počet samic, které nekopulovaly  
 Copulation – 1: počet samic, které kopulovaly  
 M – kontrolní samice, pářené před pokusem  
 O – samice bez gonád  
 T – samice s testost. implantátem

Tab. č. 9: Četnosti kopulace experimentálních skupin samic se samičími stimuly v domácím prostředí.

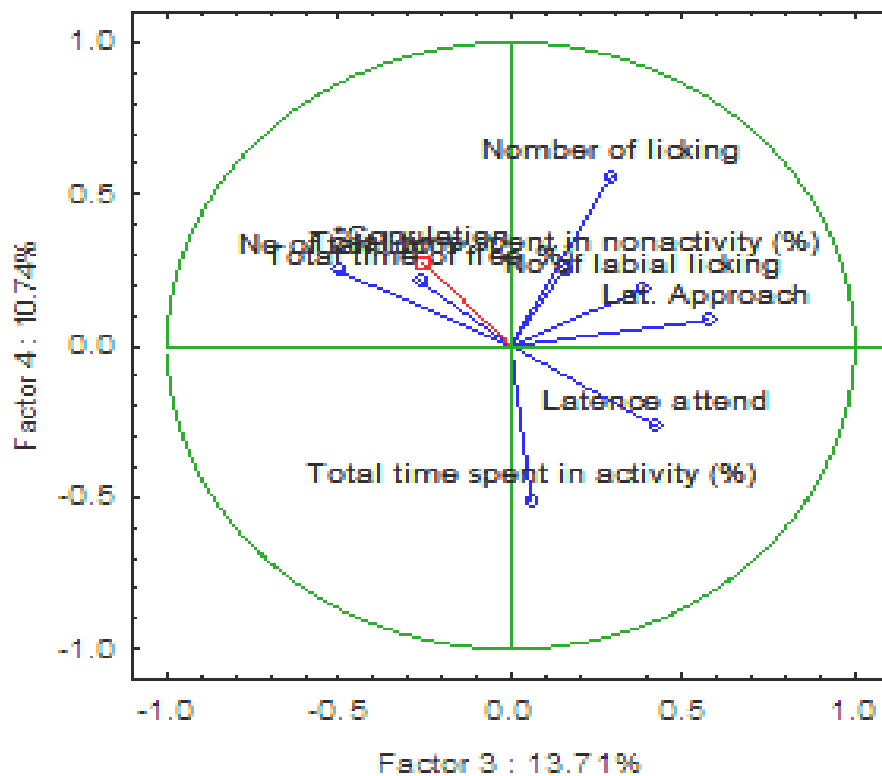
Opět byla použita explorační analýza *PCA*. V dalších výpočtech byly brány v úvahu čtyři hlavní komponenty, které vysvětlují celkem 88,56 % variability.

Z analýzy (obr. č. 31a, 31b a tabulky č. 10) vyplývá, že i v tomto případě spolu koreluje latence *attend* a *approach*, *total time of flee* a *number of tail up*, *total time spent in activity* a *number of labial licking*. Proti sobě jde *total time spent in activity* a *total time spent in nonactivity*. Dále proti sobě též stojí *number of licking* a *total time spent in activity*, latence *attend* a *total time of flee*.

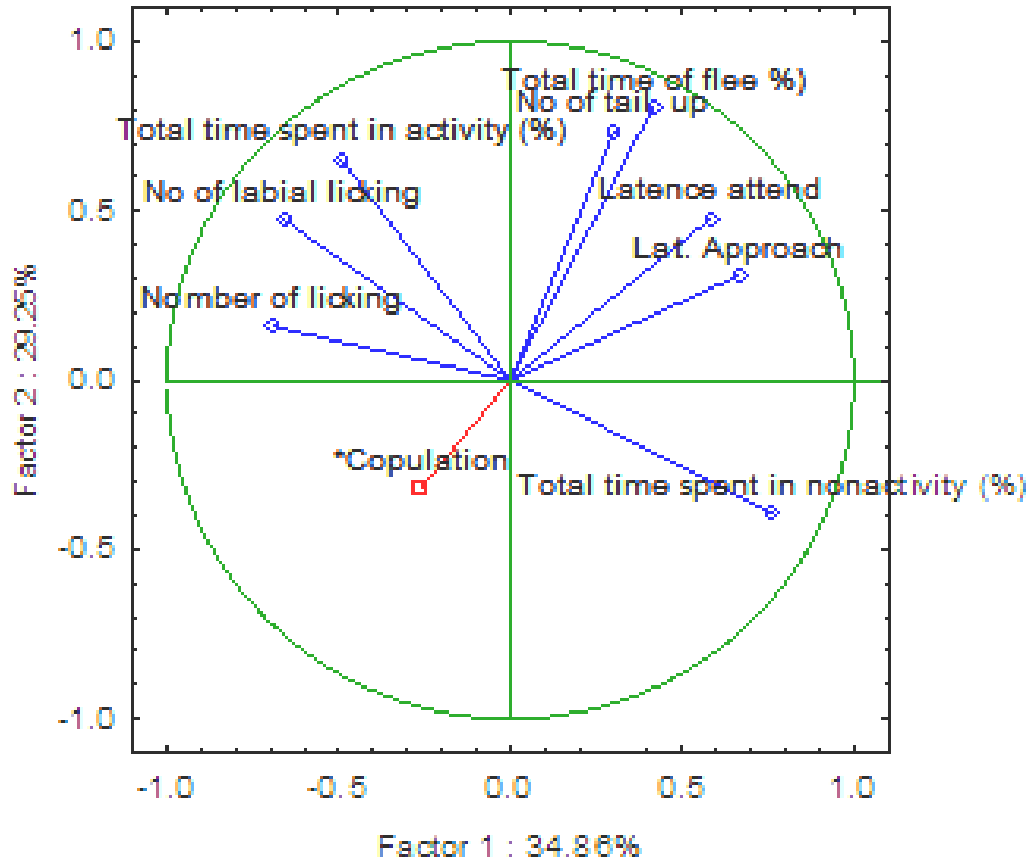
Analýza variance ukázala, že korelace latence *attend* a *approach* je signifikantní: (0,584;  $p = 0,009$ ), korelace *number of labial licking* a *total time spent in activity* je rovněž prokazatelná: (0,585;  $p = 0,009$ ). Stejně tak je signifikantní korelace mezi *total time of flee* a *number of tail up*: (0,771;  $p < 0,05$ ).

Proměnná	PC 1	PC2	PC3	PC4
<i>Latence attend</i>	0.586	0.479	0.422	-0.264
<i>Lat. approach</i>	0.667	0.309	0.573	0.084
<i>Number of licking</i>	-0.692	0.158	0.293	0.561
<i>Total time of flee (%)</i>	0.415	0.806	-0.266	0.214
<i>No of labial licking</i>	-0.661	0.475	0.386	0.186
<i>Total time spent in activity (%)</i>	-0.492	0.650	0.059	-0.510
<i>Total time spent in nonactivity (%)</i>	0.762	-0.392	0.157	0.256
<i>No of tail up</i>	0.301	0.733	-0.506	0.249
<i>*Copulation</i>	-0.260	-0.318	-0.254	0.274

Tab. č. 10: Korelace jednotlivých proměnných s hlavními komponentami v interakci fokální samice vs. stimulus samice v domácím prostředí. Červeně označeny ty, které překročily hodnotu 0,5. Proměnné označené hvězdičkou byly zadány jako doplňkové.



Obr. č. 31a: Korelace proměnných s druhou a třetí osou u interakcí fokální samice vs. samičí stimul v domácím prostředí. Kopulace zadána jako doplňková proměnná.



Obr. č. 31b: Korelace proměnných s první a druhou osou u interakcí fokálních samic se samičím stimulem v domácím prostředí. Kopulace zadána jako doplňková proměnná.

Analýza variance neprokázala signifikantní rozdíl v hodnotách na všech komponentách mezi jednotlivými pokusnými skupinami: PC1:  $F(2, 25) = 0,570$ ;  $p = 0,573$ , PC2:  $F(2, 25) = 2,597$ ;  $p = 0,094$ , PC3:  $F(2, 25) = 1,133$ ;  $p = 0,338$  i v PC4:  $F(2, 25) = 1,642$ ;  $p = 0,214$ .

*Latence attend* se signifikantně neliší mezi jednotlivými experimentálními skupinami ( $F(25, 2) = 1,26$ ;  $p = 0,301$ ). Signifikantně se neliší ani jednotlivé experimentální skupiny v latenci *approach* ( $F(25, 2) = 1,046$ ;  $p = 0,366$ ).

### **3.4.2.3. Srovnání chování *T* samic a kontrolních samců natáčených v domácím prostředí**

Tato část výsledků je zaměřena na porovnání některých prvků chování mezi samicemi s testosteronovým implantátem a fokálními kontrolními samci. Pomocí ANOVY se porovnávaly rozdíly mezi latencí *attend* u *T* samic a kontrolních samců v domácím prostředí ( $F(21, 1) = 1,170$ ;  $p = 0,292$ ); délka intervalu *approach-contact* ( $F(20, 1) = 1,960$ ;  $p = 0,177$ ); délka intervalu *contact-mounting* ( $F(18, 1) = 0,457$ ;  $p = 0,508$ ), délka intervalu *mounting-copulation* ( $F(18, 1) = 1,046$ ;  $p = 0,320$ ). Ani jeden z výsledků není signifikantní.

## 3.5. Diskuze

### 3.5.1. Prvky chování a jejich vzájemná korelace

V analýze se ukázalo, že ve většině případů bez ohledu na pohlaví fokálních zvířat a stimulů spolu korelují následující prvky chování: *number of labial licking* s *total time spent in activity*, *latence attend* s latencí *approach* a *total time of flee* s *number of tail up*. Z těchto souvislostí lze vyvodit následující závěry:

1. Čím déle se zvíře pohybuje po aréně, tím více si olizuje labiální štítky. Tento projev chování souvisí nejspíš s exploračními prvky chování. Jedinec pomocí jazyka zachycuje pachové molekuly. Ty se pak dostávají do Jacobsonova orgánu, čímž zvíře získá informace o svém okolí (Font, 1996 podle Labra, 2006).
2. Souvislost mezi zvedáním ocasu a celkovou dobou strávenou útekem naznačuje, že toto chování se vyskytuje ve chvílích, kdy má zvíře strach. V analýze hlavních komponent spolu *number of tail up* a *total time of flee* korelují na vyšší ose, zatímco na nižší jdou proti sobě, jak je vidět na obr. č. 12a a 12b. Toto zjištění vede k závěru, že se strach u fokálních zvířat projevuje buď útekem, nebo právě zvedáním ocasu.
3. Existuje spojitost mezi dobou, než se zvíře podívá na stimulus, a dobou, než se k němu přiblíží. Čím delší je u fokálního zvířete *latence attend*, tím delší je *latence approach*. První pozorovatelný zájem o stimulus tedy předznamenává akci fokálního zvířete.

### 3.5.2. Vliv prostředí a pohlaví stimulu na chování zvířat

Jednotlivé prvky chování se mezi sebou dále porovnávaly s ohledem na typ prostředí a pohlaví stimulu. Skutečnost, zda se interakce mezi fokálním samcem a samičím stimulem odehrávala v neutrálním či domácím prostředí, ovlivnila *latenci attend*. U zvířat natáčených v domácím prostředí je *latence attend* kratší. V neutrální aréně na fokální jedince působí zřejmě dva faktory: stres z nového prostředí a potřeba jej prozkoumat. Proto je doba, než se začnou zajímat o stimulus v neutrální aréně, delší. Oproti tomu v domácím prostředí mohou sledovaní samci věnovat svou pozornost stimulu, aniž by je rušil efekt nového prostředí. V řadě prací se podobné pokusy provádí pouze v domácím prostředí fokálního zvířete, aby zkoumané chování nebylo narušeno vlivem nového prostředí (Golinski et al., 2011).

Při porovnání délky intervalu *attend-approach* vyšel výsledek nesignifikantní. Typy

prostředí se mezi sebou odlišují pouze v latenci projevení prvního zájmu fokálního zvířete o stimulus, tedy v latenci *attend*. Jakmile si fokální jedinec začne stimulu všimnout, doba, než se k němu přiblíží, už na prostředí nezávisí.

Dále se porovnávaly intervaly sexuálního chování u kopulujících samců mezi domácím a neutrálním prostředím. Výsledky ukázaly, že pokud sexuální chování začne, stane se tak stejně rychle v neutrální aréně i domácím prostředí. Rozdíl je jen v tom, že v aréně váhají na začátku déle. Během natáčení se ukázalo, že po vpuštění do arény většinou zvířata strnule stojí a aktivní začnou být až po delší době, což ve výsledku prodlužuje latenci *attend*.

Pohlaví stimulu také prokazatelně ovlivnilo některé prvky chování u sledovaných zvířat. Z výsledků vyplývá, že latence *attend* je kratší, když fokální zvíře interaguje se samicí. Obdobný výsledek vyjde i při porovnávání latence *approach*. K samici se tedy fokální zvíře přiblíží dříve než k samci. Tyto jevy může vysvětlit fakt, že druh *Paroedura picta* má nápadný pohlavní dimorfismus ve velikosti samců i samic. Lze předpokládat, že fokální zvíře se vůči většímu stimulu chová obezřetněji, a proto se k němu přibližuje později než k menším samicím.

U *total number of flee* vyšel téměř signifikantní rozdíl: celková doba útěku je u fokálního samce delší, pokud je stimulem samec. Přestože *total time of flee* koreluje v předchozích analýzách s *number of tail up*, v tomto případě se neprokázalo, že by počet zvednutí ocasu závisel na pohlaví stimulu.

### **3.5.3. Vliv hormonální manipulace na chování fokálních zvířat**

V úvodu této práce bylo vytyčeno několik základních otázek, na které pokus poskytl odpovědi. Studie prokázala, že hladiny testosteronu mají vliv na samčí sexuální chování. Kastrovaní samci měli téměř nulové četnosti páření v porovnání se zvířaty kontrolními či s testosteronovým implantátem (Crew et al., 1978). Mimo toto zjištění vyplynula skutečnost, že kastrovaní samci se více pohybují po aréně a v souvislosti s tímto chováním si i více olizují labiální štítky. Tento projev je zřejmě způsoben vlivem poklesu hladin testosteronu, přičemž dochází k omezení sexuálního chování, a tudíž zájmu o interakci se stimulem. Podobné poklesy po kastraci jsou doloženy i v jiných studiích (Rosen et al., 2002). Zvířata se spíše věnují exploraci nového prostředí než stimulům nehledě na to, zda se jedná o stimuly samčí nebo samičí.

U *T* samců bylo sexuální chování obnoveno testosteronem z implantátu. Tito jedinci měli vyšší pravděpodobnost kopulace v neutrální aréně oproti kontrolním jedincům. V domácím

prostředí je však tato pravděpodobnost vyšší u kontrolních samců než u *T* samců. Interakce v neutrální aréně se natáčely o měsíc dříve než v domácím prostředí, je tedy možné, že u zvířat s testosteronovým implantátem ještě fungovala dočasná organizace vlivem doznívajících hladin testosteronu před kastrací. To by vysvětlovalo, proč o měsíc později, kdy interakce probíhaly v domácím prostředí, měla *T* zvířata nižší pravděpodobnost kopulace než kontrolní samci.

Při porovnávání agonistického chování se jednotlivé samčí experimentální skupiny prokazatelně nelišily v počtu *number of attacked*, *number of being attacked*, *number of flee* a *number of tail up*. Agonistické chování bylo vzácné nejen u kastrovaných samců, ale i u kontrolních a s testosteronovým implantátem. Ačkoliv výsledek nebyl průkazný díky nízké frekvenci těchto prvků chování, při bližším prozkoumání četností vyplyne závěr, že kastráci neútočili vůbec, zatímco zvířata kontrolní a s testosteronem se prala víc. Kastrace tedy vedla k snížení agresivního chování, což je výsledek ve shodě s jinými pracemi (Watt et al., 2003). Naproti tomu u zbylých dvou experimentálních skupin zůstalo toto chování zachováno.

V interakcích, kde byly fokálními zvířaty samice, se prokázalo, že testosteron u nich vyvolává samčí sexuální chování. Rozdíl v kopulaci vyšel mezi experimentálními skupinami signifikantní. *T* samice se snažily kopulovat se samičími stimuly na rozdíl od *M* a *O* samic, které nekopulovaly se stimuly vůbec. Z toho vyplývá, že hladiny testosteronu řídí sexuální chování u samců a jsou schopné vyvolat toto chování i u samic (Adkins & Schlesinger, 1979; Wade et al., 1993).

Z porovnání chování fokálních samic s testosteronovým implantátem a fokálních kontrolních samců v domácím prostředí vyplynulo, že se tyto skupiny zvířat mezi sebou neliší v latenci *attend*; délce intervalů *approach-contact*; *contact-mounting* a *mounting-copulation*. Ani v jednom srovnání se neprokázala odlišnost mezi pohlavími. U samic s testosteronovým implantátem se pod vlivem hladin testosteronu objevuje stejné chování jako u kontrolních samců.

U experimentálních skupin *NM*, *T* a *O* samic v interakci se stimuly samci se analyzovalo, jaký vliv má typ manipulace na jejich atraktivnost. Statisticky bylo prokázáno, že samice z různých experimentálních skupin se v pravděpodobnosti *being copulated* signifikantně neliší. Pokud se prozkoumají celkové četnosti *being copulated* u jednotlivých skupin, jsou *NM* samice, které nebyly před pokusem pářeny a zůstaly u nich zachované gonády, přeci jen pro samce atraktivnější. Zatímco *T* a *O* samice pářeny nebyly, protože ztratily na atraktivnosti díky manipulacím.

### 3.6. Závěr

Tato práce potvrdila vliv hladiny testosteronu na chování gekona *Paroedura picta*. Zatímco u kastrovaných samců se objevovaly nižší či žádné projevy sexuálního chování, kastrovaní samci s testosteronovým implantátem kopulovali se samičími stimuly. Navíc samčí sexuální chování se projevilo i u kastrovaných samic s testosteronovým implantátem, které též kopulovaly se samičími stimuly. Při porovnání několika prvků chování mezi *T* samicemi a kontrolními samci se ukázalo, že se chovají stejně. Je tedy pravděpodobné, že sexuální chování může být dočasně organizováno zvýšením hladin androgenů, ke kterému došlo u samic a samců s testosteronovým implantátem.

Projevy agresivního chování měly nízkou frekvenci výskytu, než aby mohl být výsledek relevantní, přesto porovnání četností ukázalo, že kastrovaní samci v žádné z natočených interakcí nezaútočili na samčí stimulus. Zatímco kontrolní a *T* samci měli vyšší četnosti *number of attack*. Tedy i agresivní chování je podmíněno hladinami testosteronu.

Zajímavý výsledek představovalo rovněž zjištění, že kastrace nejen snižuje sexuální chování, ale také vede k větší aktivitě fokálního zvířete. Aktivita koreluje s olizováním labiálních štítků. Mimo této korelace se projevila skutečnost, že ve chvíli, kdy se zvíře bojí, zvedá ocas nebo utíká.

## **4. Seznam literatury**

- Adkins E. & Schlesinger L.** (1979) Androgens and the social behavior of male and female lizards (*Anolis caroliens*). *Hormons and Behavior* 13: 139-152.
- Atkins N., Susan M., Edwards A.** (2002) Fecal testosterone concentrations may not be useful for monitoring reproductive status in male blue-tongued lizards (*Tiliqua nigrolutea*: Scincidae). *Journal of Herpetology* 36 (1): 106-109.
- Baird T. A. & Hews D. K.** (2007) Hormones level in territorial and nonterritorial male collared lizard. *Physiological Behavior* 92: 755-763.
- Baltic M., Jenni-Eirmann S., Arlettaz R., Palme R.** (2005) A noninvasive technique to evaluate human-generated stress in the Black Grouse. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 81-95.
- Bamberg E., Palme R., Meingassner J. G.** (2001) Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats. *Laboratory Animals* 35: 307-314.
- Barja I., Silván G., Rosellini S., Piñeiro A., González-Gil A., Camacho L., Illera J. C.** (2007) Stress physiological responses to tourist pressure in a wild population of European pine marten. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 104: 136-142.
- Blumberg M. S., Lewis S. J., Sokoloff G.** (2002) Incubation temperature modulates post-hatching thermoregulatory behavior in the Madagascar ground gecko, *Paroedura pictus*. *The Journal of Experimental Biology* 205: 2777-2784.
- Bortolotti G. R., Marchant T. A., Blas J., German T.** (2008) Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology* 22: 494-500.
- Brown J. L., Wasser S. K., Wildt D. E., Graham L. H.** (1994) Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biology of Reproduction* 51: 776-786.



- Calisi R. M. & Hews D. K.** (2007) Steroid correlates of multiple color traits in the spiny lizard, *Sceloporus pyrocephalus*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 177: 641-654.
- Cavigelli S. A.** (1999) Behavioral patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. *Animal Behaviour* 57: 935-944.
- Cooper W. E., Jr. & Greenberg N.** (1992) Reptilian coloration and behavior. Podle Sinervo B. & Miles D. B. (2011) Hormones and Behavior of reptiles. Hormones and reproduction of vertebrates. Reptiles 3 (Ed. Norris, D. O. & Lopez K. H.). Academic Press.
- Crews D., Traina V., Wetzel F. T., Muller C.** (1978) Hormonal control of male reproductive behavior in the lizard, *Anolis caroliensis*: Role of testosterone, dihydrotestosterone, and estradiol. *Endocrinology* 103: 1814-1821.
- Czekala N. M. & Lasley B. L.** (1977) A technical note on sex determination in monomorphic birds using fecal steroid analysis. *International Zoo Yearbook* 17: 209-211. Podle Palme R. (2005) Measuring fecal steroids guidelines for practical application. *New York Academy of Sciences* 1046: 75-80.
- Denhard M., Clauss M., Lechner-Doll M., Meyer H. H. D., Palme R.** (2001) Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in roe deer (*Capreolus capreolus*) by measurement of fecal cortisol metabolites. *General and Comparative Endocrinology* 123: 111-120.
- Denhard M., Schreer A., Krone O., Jewgenow K., Krause M., Grossmann R.** (2003) Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). *General and Comparative Endocrinology* 131: 345-352.
- Dixon J. R. & Kroll J. C.** (1974) Resurrection of the generic name *Paroedura* for the Phyllodactyline geckos of Madagascar, and description of a new species. *Copeia* 1974: 20-34.
- Flores D. L. & Crews D.** (1995) Effect of hormonal manipulation on sociosexual behavior in adult female leopard geckos (*Eublepharis macularius*), a species with temperature-

dependent sex determination. *Hormones and behavior* 29: 458-473.

**Foley C. A. H., Papageorge S., Wasser S. K.** (2001) Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging African elephants. *Conservation Biology* 15 (4): 1134-1142.

**Font E.** (1996). Los sentidos químicos de los reptiles. Un Enfoque Etológico. Podle Labra A. (2006) Chemoreception and the assesment of fighting abilities in the lizard *Liolaemus monticola*. *Ethology* 112: 993-999.

**Frigerio D., Dittami J., Möstl E., Kotrschal K.** (2004) Excreted corticosterone metabolites co-vary with ambient temperature and air pressure in male greyleg geese (*Anser anser*). *General and Comparative Endocrinology* 137: 29-36.

**Gist D. H.** (1998) Male reproductive system, reptiles. Podle Lovern M. B. (2011) Hormones and reproductive cycles in lizards. V: *Hormones and reproduction of vertebrates. Reptiles*. 3 (Ed. Norris D. O. & Lopez K. H.). Academic Press.

**Golinski A., John-Adler H., Kratochvíl L.** (2011) Male sexual behavior does not require elevated testosterone in a lizard (*Coelonyx elegans*, *Eublepharidae*). *Hormones and Behavior* 59: 144-150.

**Good T., Khan M. Z., Lynch J. W.** (2003) Biochemical and physiological validation of a corticosteroid radioimmunoassay for plasma and fecal samples in oldfield mice (*Peromyscus polionotus*). *Physiology & Behavior* 80: 405-411.

**Godwin J. & Crews D.** (2002) Hormones, brain, and behavior in reptiles. Podle Lovern M. B. (2011) Hormones and reproductive cycles in lizards. V: *Hormones and reproduction of vertebrates. Reptiles*. 3 (Ed. Norris D. O. & Lopez K. H.). Academic Press.

**Gorgasser I., Tichy A., Palme R.** (2007) Faecal cortisol metabolites in quarter horses during initial training under field conditions. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 94: 226-230.

**Goymann W., Möstl E., Van't Hof T., East M. L., Hofer H.** (1999) Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. *General and*

*Comparative Endocrinology* 114: 340-348.

- Greenberg N. & Wingfield J. (1987)** Stress and reproduction: reciprocal relationship. *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. 32-81. Podle Girling J. E. & Cree A. (1995) Plasma corticosterone levels are not significantly related to reproductive stage in female common geckos (*Hoplodactylus maculatus*). *General and Comparative Endocrinology* 100: 273-281.
- Greenwood P. L. & Shutt D. A. (1992)** Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Australian Veterinary Journal* 69: 161-163.
- Hampl R. (1994)** Comparison of three immunoassays for testosterone determination. V: *Advances in steroid analysis 93* (Ed. Görög S.). Akadémiai Kiadó.
- Heistermann M., Mohle U., Vervaecke H., van Elsacker L., Hodges J. K. (1996)** Application of urinary and fecal steroid measurements for monitoring ovarian function and pregnancy in the bonobo (*Pan paniscus*) and evaluation of perineal swelling patterns in relation to endocrine events. *Biology of Reproduction* 55: 844-853.
- Henkel F. W., Schmidt W., Knothing M., Liebel K., Zobel R., Keiser H. (2000)** Amphibians and Reptiles of Madagascar, the Mascarene, the Seychelles, and the Comoro Islands. Krieger Publishing Company.
- Hews D. K., Knapp R., Moore M. C. (1994)** Early exposure to androgens affects adult expression of alternative male types in tree lizards. *Hormones and behavior* 28: 96-115.
- Hews D. K. & Moore M. C. (1996)** A critical period for the organization of alternative male phenotypes of tree lizards by exogenous testosterone?. *Physiological & Behavior* 60: 425-429.
- Hirschenhauser K., Kotrschal K., Möstl E. (2005)** Synthesis of measuring steroid metabolites in goose feces. *Annals New York Academy of Sciences* 1046: 138-153.
- Huber S., Palme R., Zenker W., Möstl E. (2003)** Non-invasive monitoring of the adrenocortical response in red deer. *Journal of Wildlife Management* 67 (1): 258-266.

- Hunt K. E. & Wasser S. K.** (2003) Effect of long-term preservation methods on fecal glucocorticoid concentrations of grizzly bear and African elephant. *Physiological and Biochemical Zoology* 76 (6): 918-928.
- Kabelik D., Weiss S. L., Moore M. C.** (2006) Steroid hormones mediation of limbic brain plasticity and aggression in free-living tree lizards, *Urosaurus ornatus*, *Hormonal behavior* 49: 587-597.
- Kelso E. C. & Martins E. P.** (2008) Effects of two courtship display components on female reproductive behaviour and physiology in the sagebrush lizard. *Animal Behaviour* 75: 639-646.
- Kikuchi M., Yamaguchi N., Sato F., Ishii S.** (1994) Extraction methods for fecal hormone analysis in birds. *Journal of Ornithology* 135: 64.
- Knapp R.** (2003) Endocrine mediation of vertebrate male alternative reproductive tactics. The next generation of studies. *Hormonal behavior* 43: 83-92.
- Kobelt A. J., Hemsworth P. H., Barnett J. L., Butler K. L.** (2003) Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science* 75: 157-161.
- Koch M., Möstl E., Steinmetz H. W., Clauss M., Masello J. F., Quillfeldt P.** (2009) Non-invasive measurement of faecal glucocorticoid metabolites in Upland Geese *Chloephaga picta*. *Polar Biology* 32: 281-285.
- Kotrschal K., Dittami J., Hirschenhauser K., Möstl E., Peczely P.** (2000) Effects of physiological and social challenges in different seasons on fecal testosterone and corticosterone in male domestic geese (*Anser domesticus*). *Acta Ethologica* 2: 115-122.
- Kratochvil L., Kubicka L., Landova E.** (2006) Yolk hormone levels in the synchronously developing eggs of *Paroedura picta*, a gecko with genetic sex determination. *Canadian Journal of Zoology* 84: 1683-1687.
- Kubicka L. & Kratochvil L.** (2009) First grow, then breed and finally get fat: hierarchical

- allocation to life-history traits in a lizard with invariant clutch size. *Functional Ecology* 23: 595-601.
- Labra A.** (2006) Chemoreception and the assesment of fighting abilities in the lizard *Liolaemus monticola*. *Ethology* 112: 993-999.
- LaDage L. D. & Ferkine M. H.** (2006). Male leopard geckos (*Eublepharis macularius*) can discriminate between two familiar females. *Behavior* 143: 1033-1049.
- Lindzey J. & Crews D.** (1986) Hormonal control of courtship and copulatory behavior in male *Cnemidophorus inornatus*, a direct sexual ancestor of a unisexual, parthenogenetic lizard. *General and Comparative Endocrinology* 64: 411-418.
- Marler C. A. & Moore R. C.** (1988) Evolutionary cost of aggression revealed by testosterone manipulation in free-living male lizards. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 23: 21-26.
- Martin J., Moreira P. L., Lopez P.** (2007) Status-signaling chemical badges in male Iberian rock lizards. *Functional Ecology* 21: 568-576.
- Martins E. P., Ord T. J., Slaven J., Wright J. L., Housworth E. A.** (2006) Individual, sexual, seasonal, and temporal variation in the amount of sagebrush lizard scent marks. *Journal of Chemical Ecology* 32: 881-893.
- Mason P. & Adkins E. K.** (1976) Hormones and social behaviour in the lizard, *Anolis caroliensis*. *Hormons and Behavior* 7: 75-86.
- Mason R. T. & Crews D.** (1985) Female mimicry in garten snake. *Nature* 316: 59-60.
- Mathies T., Felix T. A., Lance V. A.** (2001) Effects of Trapping and Subsequent Short-Term Confinement Stress on Plasma Corticosterone in the Brown Treesnake (*Booiga irregularis*) on Guam. *General and Comparative Endocrinology* 124: 106-114.
- Mesner P. W., Mahmoud I. Y., Cyrus R. V.** (1993) Seasonal testosterone levels in Leydig cells of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*) in natural populations. *Journal of Experimental Zoology* 266: 266-276.

- Meyers J. J., Irschick D. J., Vanhooydonck B., Herrel A.** (2006) Divergent roles for multiple sexual signals in a polygynous lizard. *Functional Ecology* 20: 709-716.
- Meylan S., Duffy A. M., Clobert J.** (2003) The effect of transdermal corticosterone application on plasma corticosterone levels in pregnant (*Lacerta vivipara*). *Comparative Biochemistry and Physiological Part A* 134: 497-503.
- Miles D. B., Sinervo B., Hazard L. C., Svensson E. I., Costa D.** (2007) Relating endocrinology, physiology and behaviour using species with alternative mating strategies. *Functional Ecology* 21: 653-665.
- Millspaugh, J. J. & Washburn B. E.** (2004) Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: consideration for application and interpretation, *General Compara and Comparative Endocrinology*, 138: 189-199.
- Moore M. C.** (1987) Castration affects territorial and sexual behavior of free-living male lizard, *Sceloporus jarrovi*. *Animal Behavior* 35: 1193-1199.
- Moore M. C. & Crews D.** (1985) Sex steroid hormones during the ovarian cycle of an all-female, parthenogenetic lizard and their correlation with pseudosexual behaviour. *General Comparative Endocrinology* 60: 144-153.
- Moore M., Hews D. K., Knapp R.** (1998) Hormonal control and evolution of alternative male strategies male phenotypes? Generalizations of models for sexual differentiation. *American Zoology* 38: 133-151.
- Moore M. C. & Lindzey J.** (1992) The physiological basis of sexual behaviors in male reptile. Podle Sinervo B. & Miles B. D. (2011) Hormones and behavior of reptiles. V: *Hormones and reproduction of vertebrates. Reptile 3* (Ed. Norris D. O. & Lopez K. H.). Academic Press.
- Morrow J. C., Kolver E. S., Verkerk G. A, Matthews R. L.** (2002) Fecal Glucocorticoid Metabolites as a Measure of Adrenal Activity in Dairy Cattle, *General and Comparative Endocrinology* 126: 229-241.

- Möstl E., Rettenbacher S., Palme R.** (2005) Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 17-34.
- Nakagawa S., Möstl E., Waas J. R.** (2003) Validation of an enzyme immunoassay to measure faecal glucocorticoid metabolites from Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*): a non-invasive tool for estimating stress. *Polar Biology* 26: 491-493.
- Norris D. O.** (2007) Vertebrate endocrinology. Podle Lovern M. B. (2011) Hormones and reproductive cycles in lizards. V: *Hormones and reproduction of vertebrates. Reptiles 3* (Ed. Norris D. O. & Lopez K. H.). Academic Press.
- Ohe Ch. G. & Servheen Ch.** (2002) Measuring stress in mammals using fecal glucocorticoids: opportunities and challenges. *Wildlife Society Bulletin* 30 (4): 1215-1225.
- Onuma M., Suzuki M., Uchid A. E., Niiyama M., Ohtaishi N.** (2002) Annual changes in fecal estradiol-17 $\beta$  concentrations of the sun bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak, Malaysia. *Journal of Veterinary Medical Science* 64: 309-313.
- Ord T. J., Blumestein D. T., Evans C. S.** (2002) Ecology and signal evolution in lizards. *Biological Journal of the Linnean Society* 77: 127-148.
- Palme R.** (2005) Measuring fecal steroids guidelines for practical application. *New York Academy of Sciences* 1046: 75-80.
- Palme R., Fischer P., Schildorfer H., Ismail M. N.** (1996) Excretion of infused <sup>14</sup>C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science* 43: 43-63.
- Palme R., Rettenbacher S., Touma C., El-Bahr S. M., Möstl E.** (2005) Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040: 162-171.

- Pereira R., Duarte J., Negrão J.** (2005) Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). *Theriogenology* 63: 2113-2125.
- Rabiee A. R., Macmillan K. L., Schwarzenberger F.** (2002a) Plasma, milk and faecal progesterone concentrations during the oestrous cycle of lactating dairy cows with different milk yields. *Animal Reproduction Science* 74: 121-131.
- Rhen T., Ross J., Crews D.** (1999) Effects of testosterone on sexual behavior and morphology in adult female leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Hormones and Behavior* 36: 119-128.
- Röll B.** (2000) Gecko vision – visual cells, evolution, and ecological constraints. *Journal of Neurocytology* 29: 471-484.
- Romero L. M., Reed J. M., Wingfield J. C.** (2000) Effects of Weather on Corticosterone Responses in Wild Free-Living Passerine Birds. *General and Comparative Endocrinology* 118: 113-122.
- Rosen G. J., O'Bryant E. L., Matthews J., Zacharewski T., Wade J.** (2002) Distribution of androgen receptor mRNA expression and immunoreactivity in the brain of the green anole lizard. *Journal Neuroendocrinology* 14: 19-28.
- Saez J. M.** (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine reviews* 15: 574-626.
- Sands J. & Creel S.** (2004) Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in wild population of wolves, *Canis lupus*. *Animal Behaviour* 67: 387-396.
- Schwarzenberger F., Fredriksson G., Schaller K., Kolter L.** (2004) Fecal steroid analysis for monitoring reproduction in the sun bear (*Helarctos malayanus*). *Theriogenology* 62: 1677-1692.
- Schwarzenberger F., Möstl E., Palme R., Bamberg E.** (1996) Faecal steroid analysis for



- non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* 42: 515-526.
- Schwarzenberg F., Son C. H., Pretting R., Arbeiter K.** (1996) Use of group-specific antibodies to detect fecal progesterone metabolites during the estrous cycle of cows. *Theriogenology* 46: 23-32.
- Simoni M., Gromoll J., Nieschleg E.** (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine reviews* 18: 739-773.
- Sinervo B. & Clobert J.** (2003) Morphs, dispersal behavior, genetic similarity, and the evolution of cooperation. *Science* 300: 1949-1951.
- Sinervo B. & Lively C. M.** (1996) The rock-paper scissors game and the evolution of alternative male strategies. *Nature* 380: 240-243.
- Sinervo B., Miles D. B., Frankio W. A, Klukowski M., DeNardo D. F.** (2000a) Testosterone, endurance, and Darwinian fitness: natural and sexual selection on the physiological bases of alternative male behaviors in side-blotched lizards. *Hormones and Behavior* 38: 222-223.
- Starostova Z., Kubicka L., Kratochvil L.** (2010) Macroevolutionary pattern of sexual size dimorphism in geckos corresponds to intraspecific temperature-induced variation. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 670-677.
- Strier K. B., Ziegler T. E., Wittwer D. J.** (1999) Seasonal and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild male muriquis (*Brachyteles arachnoides*). *Hormones and Behaviour* 35: 125-134.
- Teskey-Gerstl A., Bamberg E., Steineck T., Palme R.** (2000) Excretion of corticosteroids in urine and faeces of hares (*Lepus europaeus*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systematic, and Environmental Physiology* 170: 163-168.
- Thiel D., Jenni-Eiermann S., Palme R.** (2005) Measuring corticosterone metabolites

in droppings of Capercaillies (*Tetrao urogallus*). *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 1-13.

**Tokarz R. R.** (1995) Importance of androgens in male territorial acquisition in the lizard *Anolis sagrei*: an experimental test. *Animal Behavior* 49: 661-669.

**Tokarz R. R., MacMann S., Smith L. C., John-Adler H.** (2002) Effects of testosterone treatment and season on the frequency of dewlap extensions during male-male interactions in the lizard *Anolis sagrei*. *Hormones and behavior* 41: 70-79.

**Touma Ch. & Palme R.** (2005) Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 54-74.

**Treiman D. M. & Levine S.** (1969) Plasma corticosterone responses to stress in four species of wild mice. *Endocrinology* 84 (3): 676-680. Podle Good T., Khan M. Z., Lynch J. W. (2003) Biochemical and physiological validation of a corticosteroid radioimmunoassay for plasma and fecal samples in oldfield mice (*Peromyscus polionotus*). *Physiology & Behavior* 80: 405-411.

**Wade J.** (2005) Current research on the behavioral neuroendocrinology of reptiles. *Hormones and Behavior* 48: 451-460.

**Wade J., Huang J. M., Crews D.** (1993) Hormonal control of sex differences in the brain, behavior and accessory sex structures of whiptail lizards (*Cnemidophorus species*). *Journal Endocrinology* 5: 81-93.

**Wallner B., Möstl E., Dittami J., Prossinger H.** (1999) Fecal glucocorticoids document stress in female barbary macaques (*Macaca sylvanus*). *General and Comparative Endocrinology* 113: 80-86.

**Washburn B. E. & Millspaugh J. J.** (2002) Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. *General and Comparative Endocrinology* 127: 217-222.

- Wasser S. K., Hunt K. E., Brown J. L., Cooper K., Crocketts C. M., Bechert U., Millspaugh J. J., Larson S., Monfort S. L.** (2000) A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology* 120: 260-275.
- Wasser S. K., Papageorge S., Foley C., Brown J. L.** (1996) Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. *General and Comparative Endocrinology* 102: 255-262.
- Watt M. J., Forster G. L., Joss J. M. P.** (2003) Steroid correlates of territorial behavior in male jacky dragon, *Amphibolurus muricatus*. *Brain Behavior Evolution* 61: 184-194.
- Weiss S. L. & Moore M. C.** (2004) Activation of aggressive behavior by progesterone and testosterone in male tree lizard, *Urosaurus ornatus*, *General and Comparative Endocrinology* 136: 282-288.
- Wikelski M., Carbone C., Bednekoff P. A., Choudhury C., Tebbich S.** (2001) Female choice in marine iguana leks: a wider selection of males obtained at a cost. *Ethology* 107: 623-638.
- Wikelski M., Steiger S. S., Gall B., Nelaon K. N.** (2005). Sex. Drugs and mating role: testosterone induced phenotype switching in Galapagos marine iguanas. *Behavior Ecology* 13: 260-268.
- Wikelski M. & Trillmich F.** (1997) Body size and sexual size dimorphism in marine iguanas fluctuate as a result of opposing natural and sexual selection: An island comparison. *Evolution* 51: 922-936.
- Winkler S. W. & Wade J.** (1998) Aromatase activity and regulation of sexual behaviors in the green anole lizard. *Physiological Behavior* 64: 723-731.
- Wu J., Whittier J. M., Crews D.** (1985) Role of progesterone in the control of female sexual receptivity in *Anolis caroliensis*. *General Comparative Endocrinology* 58: 402-406.

**Zaaf A. & Van Damme R.** (2001). Limb proportions in climbing and ground – dwellin geckos (*Lepidosauria, Gekkonidae*): a phylogenetically informed analysis. *Zoomorphology* 121: 45-53.