

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie



Vliv inkubační teploty na fenotyp mláďete kachny divoké

Diplomová práce

Martina Cílková

Praha 2010

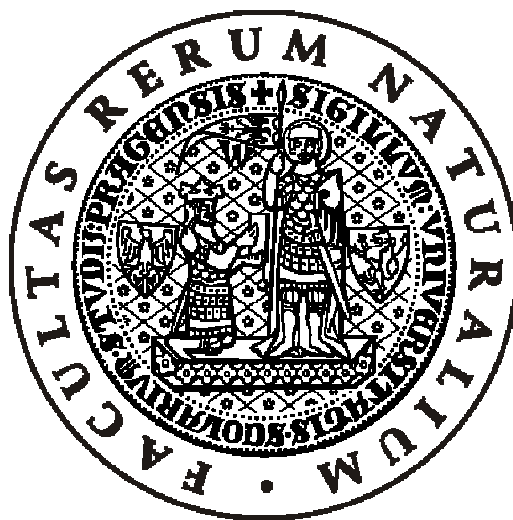
Školitel: RNDr. David Hořák, Ph.D.

Konzultant: Ing. Ludmila Prokūpková, Ph.D.

Charles University in Prague

Faculty of Science

Department of Ecology



Effect of incubation temperature on phenotype in mallard

Diploma thesis

Martina Cílková

Praha 2010

Advisor: RNDr. David Hořák, Ph.D.

Consultant: Ing. Ludmila Prokūpková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně,
pouze s využitím literatury, na kterou odkazuji.

31. srpna 2010

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Davidovi Hořákovi, Ph.D. za odborné vedení této práce, mnoho cenných rad a konstruktivních připomínek. Také mu děkuji za motivaci a podporu, která není u všech školitelů samozřejmostí a bez které by se mi pracovalo daleko hůř.

Dále děkuji Katedře kvality zemědělských produktů Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity za poskytnutí prostoru pro část mého laboratorního výzkumu. Jmenovitě děkuji Ing. Ludmile Prokúpkové, Ph.D. za odborné vedení a za množství rad a informací, kterými mě obohatila. Dále děkuji paní Blance Dvořákové zejména za pomoc s analýzou obsahu proteinů a Ing. Petrovi Doxanskému za pomoc, praktické rady a milou společnost.

Také bych ráda poděkovala Mgr. Tomášovi Albrechtovi, Ph.D. za zprostředkování experimentálního materiálu a zázemí v sídle oddělení populační biologie Ústavu biologie obratlovců Akademie věd ČR ve Studenci. Děkuji Daně Havelkové za nepostradatelnou pomoc při péči o inkubátory a všem zaměstnancům i studentům pobývajícím ve Studenci za zpříjemnění mého výzkumného pobytu.

Děkuji také Mgr. Petrovi Klvaňovi za pomoc s přípravou experimentu.

Chci také poděkovat Mgr. Jakubovi Kreisingerovi, Ph.D. za ochotu, s jakou se ujal analýzy pohlaví mláďat, když se v průběhu práce ukázalo, že nejsem schopna ji časově skloubit s prací v laboratoři na ČZU.

Můj dík patří i rodičům, kteří mi dávali najevo svou důvěru a podporovali mě v mých rozhodnutích v průběhu celého studia.

V neposlední řadě děkuji svým spolužákům a kamarádům, kteří mi byli v průběhu výzkumu oporou a zvláště pak děkuji Michalovi Koláčkovi za psychickou podporu, ohromnou trpělivost a množství chutných večeří, které mi v průběhu dopisování mé diplomové práce připravil.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury AV ČR, projekt č. KJB 601110803.

Abstrakt

Vliv inkubační teploty na různé fenotypové znaky ptačích mláďat je hojně zkoumán. Kachny (*Anatidae*) jsou pro studie tohoto typu dobrým modelem, protože u nich lze rozdělit samičí investici do reprodukce na dvě hlavní části: tvorbu snůšky a její inkubaci. Teplota vajec v průběhu inkubace může významně ovlivnit vývoj a životaschopnost mláďat. Cílem této práce bylo zjistit, jak inkubační teplota ovlivňuje líhivost, délku inkubace, poměr pohlaví a fenotyp mláďat kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) těsně po vylíhnutí. Vejce byla inkubována experimentálně v umělých podmínkách v šesti stálých teplotách, jejichž rozmezí odpovídalo přirozeným podmínkám v ČR (35-39 °C). Čerstvě vylíhlá mláďata byla zvážena a byly zjištěny údaje o jejich základních strukturálních rozměrech. Poté byla usmrcena a u části mláďat z inkubačních teplot 35,5; 36 a 37 °C byly zjištěny údaje o hmotnosti reziduálního žloutkového vajíčka a základního chemického složení vlastního těla mláděte s vyjmutým žloutkovým vajíčkem. Obě krajní teploty (35 a 39 °C) vedly k výraznému snížení líhivosti vajec a celková délka inkubace průkazně klesala s rostoucí inkubační teplotou. Nepodařilo se prokázat vliv inkubační teploty na celkovou hmotnost mláděte po vylíhnutí. Byly však zaznamenány rozdíly v hmotnosti reziduálního žloutkového vajíčka, která byla vyšší ve vyšších teplotách a hmotnosti vlastního těla mláděte, která se naopak s rostoucí teplotou snižovala. Byl prokázán vliv inkubační teploty na strukturální rozměry mláďat (délka *tarsometatarsu* a lebky, délka a šířka zobáku). Byl také prokázán vliv inkubační teploty na obsah vody ve žloutkovém vajíčku i vlastním těle mláděte. Obsah vody ve žloutkovém vajíčku s rostoucí teplotou klesal, zatímco obsah vody ve vlastním těle mláděte stoupal. Vliv inkubační teploty na obsah tuku a proteinů v těle mláděte nebyl průkazný, zatímco vliv na obsah anorganických látek průkazný byl. Nepodařilo se prokázat rozdíly v poměru pohlaví mezi mláďaty vylíhlými v různých inkubačních teplotách.

Klíčová slova: inkubační teplota, kachna divoká (*Anas platyrhynchos*), žloutkový vajíček, strukturální rozměry, chemické složení

Abstract

The influence of incubation temperature on bird neonate phenotype is widely studied. In waterfowl (*Anatidae*), maternal effect can be divided to two main parts: clutch formation and its incubation. Therefore, waterfowl are a good model for this type of study. The egg temperature can strongly influence embryo development and survival of the hatchlings. The goal of this work was to examine the effect of incubation temperature on hatchability, incubation length, sex ratio and phenotype of European Mallard ducklings immediately after hatching. Eggs were randomly placed in one of six incubation temperatures, which ranged from 35 to 39 °C. This range corresponds with temperature range in natural mallard nests in the Czech Republic. Eggs were then artificially incubated. Newborn hatchlings were weighted and their structural size was measured, then they were killed. Some hatchlings from incubation temperatures 35.5, 36 and 37 °C were used for examination of residual yolk sac mass and basic chemical composition of the yolk-free body. Hatchability was markedly lower in both extreme temperatures (35 and 39 °C). Incubation length significantly decreased with increasing incubation temperature. I failed to prove the influence of incubation temperature on hatchling body mass, but I found temperature-dependent changes of yolk sac mass, which increased with increasing temperature, and yolk-free body mass, which decreased with increasing temperature. Incubation temperature influenced structural sizes of hatchlings (length of *tarsometatarsus* and skull, length and width of bill) and also percentual water content of yolk sac and yolk-free body. Water content of yolk sac decreased with increasing temperature, whereas water content of yolk-free body increased. Incubation temperature didn't influence lipid and protein content of yolk-free body but influenced the ash content. I found no difference in sex ratios between incubation temperatures.

Keywords: incubation temperature, European Mallard (*Anas platyrhynchos*), yolk sac, structural size, chemical composition

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod | 8 |
| 1.1 Inkubační chování ptáků..... | 8 |
| 1.2 Inkubační chování kachny divoké (<i>Anas platyrhynchos</i>)..... | 9 |
| 1.3 Studium vlivu inkubačních teplot v laboratorních podmínkách..... | 10 |
| 1.4 Vliv inkubační teploty na reprodukční úspěch..... | 11 |
| 1.5 Vliv inkubační teploty na kvalitu mlád'at..... | 12 |
| 1.5.1 Hmotnost mlád'at..... | 12 |
| 1.5.2 Strukturální velikost mlád'at..... | 12 |
| 1.5.3 Chemické složení mlád'at..... | 13 |
| 1.6 Vliv inkubační teploty na poměr pohlaví mlád'at..... | 14 |
| 2. Cíle práce | 15 |
| 3. Metodika | 16 |
| 3.1 Hmotnost a rozměry mlád'at, hmotnost žloutkového vaku..... | 17 |
| 3.2 Chemické složení mláděte..... | 18 |
| 3.3 Pohlaví mlád'at..... | 22 |
| 3.4 Statistické zpracování..... | 23 |
| 4. Výsledky | 25 |
| 4.1 Délka inkubace..... | 25 |
| 4.2 Líhnivost..... | 28 |
| 4.3 Hmotnost mlád'at a žloutkových váčků..... | 29 |
| 4.4 Kondice mlád'at..... | 36 |
| 4.5 Chemické složení..... | 38 |
| 4.6 Strukturální rozměry mlád'at..... | 42 |
| 4.7 Poměr pohlaví..... | 50 |
| 5. Diskuse | 52 |
| 5.1 Délka inkubace a líhnivost..... | 52 |
| 5.2 Hmotnost mlád'at a žloutkových váčků..... | 55 |
| 5.3 Strukturální rozměry mlád'at..... | 58 |
| 5.4 Chemické složení..... | 60 |
| 5.5 Pohlaví mlád'at..... | 63 |
| 6. Závěr | 64 |
| 7. Souhrn | 67 |
| Literatura | 71 |

1. Úvod

1.1 Inkubační chování ptáků

Inkubace je energeticky náročný proces, při kterém jsou vejce udržována v teplotě umožňující vývoj zárodku a v patřičně vlhkém prostředí současně umožňujícím výměnu dýchacích plynů (Deeming 2002). Naprostá většina ptáků, s výjimkou čeledi tabonovitých (*Megapodiidae*), kteří k inkubaci vajec využívají vnějších zdrojů tepla (Göth 2002), zajišťuje optimální teplotu pro vývoj zárodku pomocí přímého tělesného kontaktu s vejcem. Průměrná inkubační teplota se u většiny ptáků pohybuje mezi 37 a 38 °C (Deeming 2002).

Inkubační chování ptáků je hojně studováno a u různých skupin ptáků se liší. Do inkubace snůšky může investovat jen jeden z rodičů (častěji samice) nebo oba rodiče, ať už se jedná o střídavé zahřívání vajec nebo samec pouze přináší samici potravu (Halupka 1994; Flint and Grand 1999; Criscuolo, Gabrielsen et al. 2002).

Udržení ideálních teplotních podmínek v hnízdě je zajišťováno více typy chování. Většinou je teplota okolí nižší, než teplota potřebná pro vývoj zárodků a tudíž je nutné snůšku zahřívát. Zahřívání probíhá zpravidla kontaktem s hnízdní nažinou, což je okrsek kůže na břiše, který v průběhu inkubace prodělá řadu morfologických změn. Většinou z něj vypadá prachové peří, díky infiltraci leukocytů se vytvoří otok, zvětší se zrohovatělá vrstva epidermis a vzroste vaskularizace (Lea and Klandorf 2002). Hnízdní nažina je také velmi citlivá na teplotu a pták díky ní může přesně kontrolovat teplotu vajec. U pelikánovitých (*Pelecanidae*) a terejovitých (*Sulidae*) dochází k zahřívání vajec kontaktem s prokrvenými chodidly, přičemž ptáci na vejcích stojí (Evans 1988; Evans 1995). U tučňáka patagonského (*Aptenodytes patagonicus*) inkubace probíhá v kožním záhybu mezi břichem a nártou nohou. Vejce je tak zcela chráněno před okolním chladem (Handrych 1989).

V případě, kdy je hnízdo vystaveno slunečnímu záření, může teplota vajec příliš stoupnout a pták je musí aktivně ochlazovat. Časté je namáčení vajec (Amat and Masero 2007). Během experimentů, při kterých bylo manipulováno s teplotou vajec, se zjistilo, že ptáci reagují na teplotu vajec zahříváním nebo ochlazováním bez ohledu na teplotu okolí (Franks 1967; Davis et al. 1984).

U samostatně inkubujících samic lze najít dva hlavní způsoby inkubace podle toho, zda samice hnízdo v průběhu dne opouští a přijímá potravu, nebo na hnízdě stráví naprostou většinu inkubace a potravu nepřijímá (Caldwell and Cornwell 1975; Criscuolo, Gabrielsen et

al. 2002). Pokud samice hnízdo neopouští, je pro ni inkubace velmi energeticky náročná, ale zajistí tak optimální teplotní podmínky pro vývoj zárodků. Pokud samice hnízdo opouští, aby doplnila energii ve formě potravy, nesmí to ohrozit správný vývoj zárodků ve vejcích. Někteří ptáci proto při odchodu z hnízda zakrývají snůšku hnízdním materiálem. Ten slouží jako tepelná izolace a současně skrývá snůšku před predátory (White and Kennedy 1997; Kreisinger and Albrecht 2008).

Podíl času, který samostatně inkubující samice stráví na hnízdě, se liší v závislosti na stupni vyspělosti mlád'at. Druhy s prekociálními mlád'aty tráví na hnízdě více času, než druhy s altriciálními mlád'aty (Deeming 2002). U druhů s altriciálními mlád'aty následuje po vylíhnutí ještě další energeticky velmi náročná fáze krmení a zahřívání mlád'at. Aby samici na tuto fázi zbyla energie, musí během inkubace sehnat dostatek potravy, čímž stráví na hnízdě méně času, nebo musí být krmena samcem (Halupka 1994). U druhů s prekociálními mlád'aty se naprostá většina investice do reprodukce odehrává před vylíhnutím mlád'at, která musí být po vylíhnutí samostatná. Na rozdíl od druhů s altriciálními mlád'aty, kde je po vylíhnutí prostor pro vyrovnání vlivu méně kvalitní inkubace, je u druhů s prekociálními mlád'aty kvalitní inkubace naprosto klíčová.

1.2 Inkubační chování kachny divoké (*Anas platyrhynchos*)

Kachna divoká patří mezi ptáky s prekociálními a nekrmivými mlád'aty. Samci opouští samici záhy po spáření a péče o snůšku a potomstvo se již neúčastní (Abraham 1974; Caldwell and Cornwell 1975). Celá péče tudíž záleží na samici a díky nekrmivým mlád'atům lze její investici rozdělit do dvou hlavních fází, tvorby vajec a jejich inkubace.

Kvalita vejce se dá snadno odhadnout z jeho hmotnosti, která vypovídá o množství energie dostupné pro vyvíjející se zárodek (Hepp, Stangohr et al. 1987; Dzialowski and Sotherland 2004; Bogdanova, Nager et al. 2006), odráží aktuální kondici samice (Hepp, Stangohr et al. 1987; Vieira and Moran 1998; Bogdanova, Nager et al. 2006; Szigeti, Torok et al. 2007) a ovlivňuje velikost, růst a přežívání mláděte (Bolton 1991).

Úspěšnost inkubace závisí na schopnosti samice zajistit optimální podmínky pro vývoj embryí (Hepp, Kennamer et al. 2006). Tato schopnost je závislá na kondici a zkušenostech samice (Aldrich and Raveling 1983). Dobrá tělesná kondice je nejdůležitější u těch druhů, kde samice po dobu inkubace nepřijímá potravu, jako je například kajka mořská (*Somateria mollissima*, (Criscuolo, Gabrielsen et al. 2002).

Samice kachny divoké musí být schopna nejprve postavit hnízdo sestávající z nahrnutého rostlinného materiálu a prachového peří, které si kachna vytrhává z hrudi (Caldwell and Cornwell 1975; Kreisinger and Albrecht 2008). Hnízdo má funkci nejen termoregulační, ale také antipredační, kdy samice při odchodu z hnízda zakrývá vejce hnízdním materiálem (Kreisinger and Albrecht 2008). S přibývajícím počtem nakladených vajec tráví samice na hnízdě více času, obvykle však pouze během dne, během noci na vejcích nesedí, dokud není snůška ukončena (Caldwell and Cornwell 1975). Během pobytu na hnízdě dochází k zahřívání již nakladených vajec, přičemž teploty potřebné pro vývoj zárodků je dosaženo již při naklazení šestého vejce z obvyklých deseti až dvanácti. Embrya v později nakladených vejcích jsou proto ve svém vývoji zpočátku až o dva dny opožděna (Caldwell and Cornwell 1975). Toto zpoždění je vyrovnáváno jednak tím, že inkubující samice vejce v hnízdě pravidelně přeskupuje, takže se dostávají z chladnějších okrajů do středu a naopak (Caldwell and Cornwell 1975) a jednak se mláďata před vylíhnutím synchronizují vokalizací (Persson and Andersson 1999) a také reagují na vokalizaci samice (Abraham 1974). Nakonec se tak všechna mláďata ze snůšky obvykle vylíhnou během šesti až deseti hodin (Caldwell and Cornwell 1975). Celá inkubace je pro samici kachny divoké energeticky velmi náročná, ačkoliv v jejím průběhu opouští snůšku a přijímá potravu (Young 1993).

1.3 Studium vlivu inkubačních teplot v laboratorních podmínkách

Kachny divoké jsou dobrým modelem pro studium inkubace. Do tvorby snůšky a její následné inkubace investuje energii pouze samice, bez jakéhokoliv příspěví samce (sezení na vejcích nebo přinášení potravy) a tato investice se přímo odráží v kvalitě a počtu vylíhlých mláďat, což se dá v laboratorních podmínkách dobře sledovat. Kromě ochrany hnízda před predátory je nejdůležitější částí investice udržování optimálního mikroklimatu v hnízdě (Caldwell and Cornwell 1975). To se dá snadno simulovat v laboratorních podmínkách, kde je ochrana před predátory přirozeně zaručena. Změřenou hmotnost vejce pak lze považovat za prvotní vklad samice (Slattery and Alisauskas 1995; Pelayo and Clark 2003), s inkubačními podmínkami (teplotou a vzdušnou vlhkostí) lze snadno manipulovat. Výhodou také je dobrá dostupnost kachních vajec z komerčních chovů bez nutnosti sbírat je v přírodě.

Většina prací se zaměřuje spíše na studium vlivu změny inkubační teploty v různých částech inkubace nebo jen po omezenou dobu v průběhu dne (Yalcin and Siegel 2003; Maltby, Somaiya et al. 2004; Yahav, Rath et al. 2004; Olson, Vleck et al. 2006; Hammond, Simbi et

al. 2007; Polovintseva and Suleimanov 2008; Yalcin, Cabuk et al. 2008). Autoři, kteří se zabývali vlivem konstantní inkubační teploty pak většinou pracovali jen s malým rozsahem teplot (Hassan, Siam et al. 2004; Wells-Berlin, Prince et al. 2005; Hulet, Gladys et al. 2007; Eiby and Booth 2009). Prací, které by se zabývaly větším rozsahem inkubačních teplot, jako je například práce autorů (Prince, Siegel et al. 1969), je relativně málo. Autoři většinou sledují spíše vliv teplot jen nepatrně nad nebo pod předpokládaným teplotním optimem (Wells-Berlin, Prince et al. 2005). Domnívám se, že v inkubačních teplotách dále od teplotního optima může být případný teplotní efekt zřetelnější.

1.4 Vliv inkubační teploty na reprodukční úspěch

Reprodukční úspěch samice se dá vyjádřit počtem jejích mláďat a jejich kvalitou. Počet mláďat je určený jednak velikostí snůšky a jednak líhivostí vajec. Ta je ovlivněná inkubační teplotou a bývá nejvyšší v okolí teplotního optima pro daný druh. Směrem k nižším i vyšším inkubačním teplotám klesá (Prince, Siegel et al. 1969; Hepp, Kennamer et al. 2006). Důležitá je také délka inkubace, protože přímo ovlivňuje dobu, po kterou bude snůška vystavena predátorům (Persson and Andersson 1999). Vliv inkubační teploty na délku inkubace je poměrně dobře prozkoumaný. Autoři se většinou shodují na tom, že délka inkubace s rostoucí inkubační teplotou klesá (Prince, Siegel et al. 1969; Wells-Berlin, Prince et al. 2005; Hepp, Kennamer et al. 2006). Kromě inkubační teploty může mít vliv na pravděpodobnost vylíhnutí vejce i na délku inkubace také hmotnost vejce (Martin and Arnold 1991), tento vliv je ale zdokumentovaný méně. Samice může menší vejce klást například díky nízkému věku, pokud se k tomu přidá ještě nezkušenost, je pak potomstvo méně kvalitní, než u starší, zkušené samice (Bogdanova, Nager et al. 2006). V mé práci věk a kondici samice neznám, tudíž neznám ani důvod rozdílné hmotnosti vajec, protože jsou ale do inkubátorů umístěována náhodně, může docházet ke kompenzacím, ke kterým by v přírodě pravděpodobně nedošlo. Díky tomu mohu zkoumat vliv dvou hlavních složek samičí investice nezávisle.

1.5 Vliv inkubační teploty na kvalitu mlád'at

Kvalita mlád'at je, zvláště u prekociálních ptáků, do značné míry determinována hmotností vejce (Anderson and Alisauskas 2001; Deeming 2002). Inkubační teplota ale může tento efekt ovlivňovat.

1.5.1 Hmotnost mlád'at

Mezi nejlepší indikátory kvality mláděte patří jeho hmotnost (Slattery and Alisauskas 1995; Anderson and Alisauskas 2001). Ta je silně závislá na hmotnosti vejce (Williams 1994). Vliv inkubační teploty na hmotnost mláděte byl studován s nejednoznačnými výsledky. Podle některých autorů se v nižších inkubačních teplotách líhnou lehčí mlád'ata (Hepp, Kennamer et al. 2006; Göth 2007; Eiby and Booth 2009), což by mělo být způsobeno větší růstovou rychlostí ve vyšší teplotě (Yalcin, Cabuk et al. 2008). Podle jiných autorů ovšem hmotnost mlád'at na inkubační teplotě nezávisí (Prince, Siegel et al. 1969; Yahav, Rath et al. 2004).

Hmotnost vejce má kromě vlivu na hmotnost mláděte vliv také na hmotnost reziduálního žloutkového váčku, který je důležitým zdrojem energie pro mládě (Reidy, Atkinson et al. 1998; Dzialowski and Sotherland 2004). Autoři, kteří studují vliv inkubační teploty na fenotyp ptačích mlád'at, se často reziduálním žloutkovým váčkem vůbec nezabývají a sledují jen hmotnost celého mláděte (Prince, Siegel et al. 1969; Hepp, Kennamer et al. 2006). Ta v sobě ovšem může skrývat hmotnost žloutkového váčku závislou na inkubační teplotě, jak zjistili například (Eiby and Booth 2009). Jiní autoři ovšem uvádějí, že hmotnost reziduálního žloutkového váčku sice je závislá na teplotě, ale roste společně s hmotností vlastního těla mláděte, takže tím roste i celková tělesná hmotnost (Yalcin, Cabuk et al. 2008). Domnívám se tedy, že vztah mezi hmotností reziduálního žloutkového váčku a inkubační teplotou potřebuje další studium.

1.5.2 Strukturální velikost mlád'at

Pro prekociální mládě je výhodné být v okamžiku vylíhnutí co největší (Anderson and Alisauskas 2001). Strukturální velikost mláděte souvisí s jeho hmotností a s hmotností vejce (Anderson and Alisauskas 2001). Velikost mláděte je také dána růstovou rychlostí v průběhu

inkubace, která může být ovlivněna inkubační teplotou (Hepp, Kennamer et al. 2006; Hammond, Simbi et al. 2007; Olson, Vleck et al. 2008).

Některé tělesné rozměry jsou v okamžiku vylíhnutí důležitější, než jiné. Například z hlediska pohybu je nejdůležitější stavba dolní končetiny (Hammond, Simbi et al. 2007), důležitější, než například stavba křídla, které po vylíhnutí ještě nemůže sloužit svému účelu. Řada autorů se zabývala tím, jak se s inkubační teplotou mění různé tělesné rozměry mlád'at, ovšem docházeli k různým výsledkům. Zatímco (Eiby and Booth 2009) a (Goth and Booth 2005) neprokázali ve svých pracích žádnou závislost tělesných rozměrů na inkubační teplotě, (Hammond, Simbi et al. 2007) u domácích kuřat (*Gallus gallus*) zjistili větší délku tarsu ve vyšší inkubační teplotě, což vysvětlují zvýšenou rychlostí růstu v této teplotě. Oproti tomu (Hepp, Kennamer et al. 2006) zjistili u kachniček karolínských (*Aix sponsa*) větší strukturální velikost v nižší inkubační teplotě. Domnívám se, že zjištění vztahů mezi různými tělesnými rozměry a inkubační teplotou by mohlo vést k lepšímu pochopení mechanismů, které růst jednotlivých částí těla určují.

1.5.3 Chemické složení mlád'at

Schopnost aktivního pohybu a termoregulace mlád'at je dána obsahem tuku a proteinů (tj. svaloviny) v jejich těle (Slattery and Alisauskas 1995; Maltby, Somaiya et al. 2004). Další složky těla mláděte jsou anorganické látky, zodpovědné za stavbu kostry (Deeming 2002) a voda. Celkový obsah využitelných látek je omezen vejcem, přesto však mohou existovat rozdíly ve způsobu a míře využití těchto látek vyvíjejícím se zárodkem.

Vodu získává zárodek hlavně z vaječného bílku, kde je jí 88,5 % (Burley and Vadhera 1989). Je tedy významnou složkou hmotnosti mláděte a také ji může snadno ovlivňovat. Hepp et al. (2006) uvádějí mírné zvýšení obsahu vody v celém mláděti s rostoucí inkubační teplotou, současně s tím stoupala i hmotnost mláděte. Oproti tomu Eiby a Booth (2009) ve své práci žádný vliv inkubační teploty na obsah vody v reziduálním žloutkovém váčku, ani ve vlastní těle mláděte neprokázali. Mechanismus, kterým obsah vody reaguje na inkubační teplotu, není zcela prozkoumán.

Proteiny získává zárodek jak ze žloutku, kde je jejich obsah 17,4 % (Burley a Vadhera (1989) ex (Deeming 2002c)), tak z bílku, kde je obsah proteinů 10,5 % (Burley a Vadhera (1989) ex (Deeming 2002c)). Proteiny jsou hlavní složkou svaloviny a mají tudíž velký vliv na pohybové a termoregulační schopnosti vylíhlého mláděte (Slattery a Alisauskas 1995;

Maltby et al. 2004). Slouží ale také jako zdroj energie a proto mohou být využity vyvíjejícím se zárodkem v různé míře, v závislosti na inkubační teplotě. Hepp et al. (2006) uvádí, že mláďata v nižších teplotách spotřebovala více proteinů ze žloutku a vyláhla se tedy s menším celkovým obsahem proteinů.

Tuk je pro vyvíjející se zárodek hlavním zdrojem energie a je získáván výhradně ze žloutkového váčku, kde je jeho obsah 33 % (Burley a Vadhera (1989) ex (Deeming 2002c)). Autoři, kteří sledovali vliv inkubační teploty na obsah tuku v mláděti žádný průkazný vztah nenašli, na rozdíl od výše zmíněného obsahu proteinů (Hepp et al. 2006; Eiby a Booth 2009).

Anorganické látky, které tvoří jen nepatrnou část těla mláděte, jsou získávány ze skořápky vejce a jedná se převážně o vápenaté a hořečnaté ionty (Adeyeye 2009). Ty se z části přesunují do kostry mláděte a z části do žloutkového váčku (Deeming 2002b). Hepp et al. (2006) zjistili, že obsah anorganických látek v celém mláděti s rostoucí inkubační teplotou klesal, zatímco Eiby a Booth (2009) žádný vztah mezi inkubační teplotou a obsahem anorganických látek neprokázali. Nižší obsah anorganických látek v těle mláděte by mohl způsobit horší osifikaci kostí, což by se mohlo negativně projevit na pohybových schopnostech mláděte. Toto téma ale zatím není dostatečně prozkoumáno.

1.6 Vliv inkubační teploty na poměr pohlaví mláďat

Ptáci patří mezi druhy s geneticky determinovaným pohlavím. Heterogametickým pohlavím je samice, která může při tvorbě vejce ovlivňovat jeho kvalitu v závislosti na pohlaví embrya a investovat tak více energie do mláďat jednoho pohlaví, což se projeví rozdíly ve hmotnosti vajec mezi pohlavími (Rubolini et al. 2009). Jedno z pohlaví je pak díky většímu energetickému vkladu zvýhodněno (Mead et al. 1987).

Mechanismem, který může posunout celkový poměr pohlaví, je vyšší úmrtnost zárodků jednoho pohlaví v průběhu inkubace. Tento mechanismus byl zjištěn například u racka středomořského (*Larus michahellis*, Perez et al. 2006) a u čeledi tabonovitých, u kterých úmrtnost jednoho či druhého pohlaví závisela na inkubační teplotě (Göth a Booth 2005; Göth 2007; Eiby et al. 2008).

2. Cíle práce

A. DÉLKA INKUBACE A LÍHNIVOST

1. Jak inkubační teplota a hmotnost vejce ovlivňuje délku inkubace?
2. Jak inkubační teplota a hmotnost vejce ovlivňuje líhnivost?

B. HMOTNOST A ROZMĚRY MLÁĎAT

1. Jak inkubační teplota a hmotnost vejce ovlivňuje celkovou hmotnost čerstvě vylíhlého mláděte a jakou část této hmotnosti zaujímá žloutkový vak?
2. Jak inkubační teplota ovlivňuje sklon a sílu vztahu mezi hmotností vejce a mláděte?
3. Jak inkubační teplota ovlivňuje základní strukturální rozměry mlád'at?
4. Jak inkubační teplota ovlivňuje variabilitu strukturálních rozměrů mlád'at?
5. Jaký je vliv inkubační teploty a hmotnosti vejce na celkovou strukturální velikost mlád'at?
6. Jaký je vliv inkubační teploty a hmotnosti vejce na kondici mláděte?

C. CHEMICKÉ SLOŽENÍ MLÁĎAT

1. Jak inkubační teplota ovlivňuje procentuální obsah vody v reziduálním žloutkovém váčku a těle mláděte bez žloutkového váčku?
2. Jak inkubační teplota ovlivňuje procentuální obsah tuku, proteinů a anorganických látek v těle mláděte bez žloutkového váčku?

D. POHLAVÍ MLÁĎAT

1. Ovlivňuje inkubační teplota poměr pohlaví vylíhlých mlád'at?
2. Existuje vztah mezi hmotností vejce a pohlavím mláděte?
3. Existují v inkubačních teplotách rozdíly v délce inkubace mezi samci a samicemi?

3. Metodika

Experimentální vejce byla získána z komerčního chovu. Vejce jsem očíslovala lihovým fixem, zvažila na elektronické váze „Tanita“, typ 1479V, s přesností na 0,1 g a digitálním posuvným měřítkem s přesností na 0,01 mm jsem změřila jejich maximální délku a šířku. Protože jsem získala více vajec, než kolik se jich vešlo do umělých líhní, některé z nich jsem uvařila, vyjmula jsem z nich žloutek a ten jsem zvažila s přesností na 0,1 g na stejné váze, jako vejce. Ostatní vejce jsem náhodně rozmístila do čtyř umělých líhní „Mono 48“ značky Bioska (www.bioska.cz) s automatickým obracením vajec. Po započítí inkubace jsem postupovala dle návodu výrobce. Každé tři dny jsem do inkubátorů doplňovala vodu, po jedenácti dnech inkubace jsem otevřela přídatné větrací otvory ve víku inkubátoru. Od 9. dne inkubace jsem vejce jednou denně ochlazovala. Chlazení probíhalo tak, že jsem vejce i s lískou vyjmula z inkubátoru, postavila na podlahu a pak jsem je nechala vychladnout na teplotu očního víčka (při přiložení vejce na vlastní zavřené oko necítíme ani teplo, ani chlad) a opět vrátila do inkubátoru. Po 2 týdnech inkubace jsem vejce prosvítila pomocí elektronického prosvěcovače (candler) vyrobeného dle Wellera (1956) a neoplozená vejce jsem z experimentu vyloučila. Od 25. dne inkubace jsem vejce jednou denně rosila rozprašovačem a současně kontrolovala stádium vývoje embryí. Naklovaná vejce jsem spolu s lístečkem označujícím číslo vejce a datum naklování umístila do pytlíků ze síťoviny vyrobených podle Hořáka a Albrechta (2007). Datum naklování jsem sledovala jen v roce 2009, v prvním běhu inkubace v roce 2008 tudíž tato data chybí. Více než síťovina se čtvercovými oky, kterou používali Hořák a Albrecht (2007), se mi však osvědčila síťovina s oky šestiúhelníkovitými, protože těmito o něco menšími otvory mládě nemohlo prostrčit zobák a zamotat se tak do síťky.

Líhnutí mláďat jsem kontrolovala dvakrát denně, v 9:00 a ve 21:00. Vylíhnutá mláďata jsem po oschnutí usmrtila v nádobě s vatou napuštěnou chloroformem. Vejce, která nejevila známky líhnutí, jsem zkontrolovala pomocí prosvěcovače. Pokud se jednalo o mrtvé embryo, vejce jsem rozbila a z embrya jsem odebrala vzorek tkáně pro pozdější molekulární určení pohlaví (viz níže). Odebírání vzorků z mrtvých embryí probíhalo pouze v roce 2009.

Dohromady byly provedeny čtyři běhy inkubace, jeden v roce 2008 (zahájení inkubace 14. 4.) a tři v roce 2009 (zahájení inkubací 3. 4., 7. 5. a 13. 6.). Vejce byla inkubována v šesti různých teplotách odpovídajících rozmezí inkubačních teplot u volně žijících kachen divokých v ČR (35 °C – 46 vajec, 35,5 °C – 184 vajec, 36 °C – 184 vajec, 37 °C – 184 vajec,

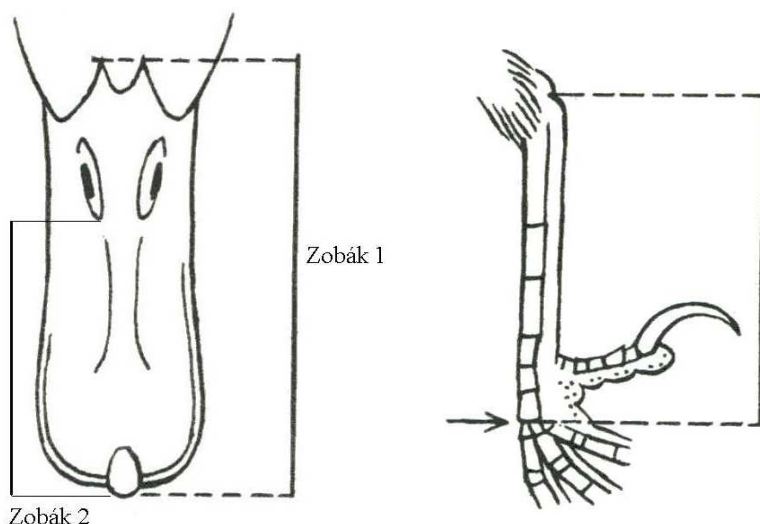
38 °C – 92 vajec a 39 °C – 46 vajec). Teplota 35,5 °C byla do experimentu zavedena poté, co se ukázalo, že v teplotě 35 °C je velmi nízká líhivost – asi 15 % oproti 47 % u teploty 35,5 °C. Inkubační teploty byly mezi jednotlivými běhy inkubace i mezi inkubátory střídány tak, aby se zamezilo případnému vlivu přístroje nebo období.

Teplota a vlhkost v inkubátoru byly v roce 2009 po celou dobu inkubace v desetiminutových intervalech snímány dataloggery „Comet“, typ S3121 (www.cometsystem.cz).

3.1 Hmotnost a rozměry mlád'at, hmotnost žloutkového vaku

Mlád'ata jsem po usmrcení zvážila na elektronické váze „Shinko Denshi“, typ VIBRA AJ-2200CE s přesností na 0,01 g. Posuvným měřítkem s přesností na 0,01 mm jsem změřila následující rozměry: délku lebky od špičky zobáku po nejzazší výběžek týlní kosti, délku zobáku od špičky po začátek opeření (dále „zobák 1“), délku zobáku od špičky po přední okraj nozdry (dále „zobák 2“), šířku zobáku v úrovni předního okraje nozder a délku *tarsometatarsu* od vnitřního ohybu patního kloubu po vnější ohyb prstů (dále „tarsus“) (viz obr. 3.1.1). Pro některé výpočty jsem později používala délku lebky s odečtenou délkou „zobáku 2“, abych odstranila vliv případné variability v tomto rozměru. Délku „zobáku 1“ jsem neodečítala z toho důvodu, že jsem se domnívala, že začátek čelního opeření může být značně variabilní a přitom vypovídá jen málo o vnitřní anatomii lebky.

Pro pozdější analýzu DNA jsem mlád'atům ustříhla poslední článek prstu, který jsem vhodila do označené mikrozkuřavky Eppendorf s 96% ethanolem. Poté jsem mlád'atům k noze připevnila lístek s číslem vejce, datem vylíhnutí a usmrcení a uložila je do mrazicího boxu o teplotě -80 °C pro další zpracování.



Obr 3.1.1 Znárodnění způsobu měření délky „zobáku 1“, „zobáku 2“ a délky tarsu. Podle (Hudec 1994), upraveno.

Pro analýzu hmotnosti žloutkového vaku a chemického složení byla použita pouze mláďata z teplot 35,5, 36 a 37 °C, přičemž z každé teploty bylo použito 40 mláďat. Mláďata jsem 3-4 dny před dalším postupem přemístila do běžného mrazicího boxu o teplotě -18 °C. Po vyjmutí z mrazicího boxu a částečném rozmrznutí mláděte jsem mu vypreparovala žloutkový váček, který jsem zvažila na analytických vahách „A&D Company, Limited“, typ FR-200 MK II, s přesností na 0,0001 g, zabalila do alobalu a umístila zpět do mrazicího boxu.

3.2 Chemické složení mláděte

Tělo mláděte s vyjmutým žloutkovým váčkem (dále jen „tělo mláděte“) jsem homogenizovala v elektrickém mlynku „Scarlett Silverline“, typ SL-1545. Část homogenizovaného vzorku jsem uložila do mrazicího boxu pro pozdější analýzu obsahu proteinů.

Obsah vody

Stanovení obsahu vody proběhlo metodou sušení s pískem. V označené hliníkové misce se skleněnou tyčinkou jsem vysušila přibližně 20 nebo 10 g mořského písku pro vzorek z těla mláděte, resp. žloutku. Sušení probíhalo v horkovzdušné sušárně „KCW 100“ při 103 ± 2 °C po dobu 30 minut. Misku s pískem jsem pak nechala vychladnout v exsikátoru na laboratorní teplotu a zvažila ji na analytických vahách (viz výše) s přesností na 0,0001 g. Do každé ze

dvou misek jsem pak navážila přibližně 10 g homogenizovaného vzorku v případě těla mláděte, dva vzorky z téhož mláděte byly pokaždé analyzovány paralelně pro zpřesnění výsledného odhadu. Žloutek jsem po opětovném zmrznutí rozdělila na přibližné poloviny a ty jsem zvažila spolu s miskami a pískem. Vzorky jsem nejprve sušila při 103 ± 2 °C po dobu 2 hodin, přičemž jsem je každou půl hodinu promíchávala. Po vychladnutí v exsikátoru a zvažení jsem je dále vysoušela pokaždé jednu hodinu, následně jsem je nechala vychladnout a zvažila. Vzorky jsem dosoušela do konstantní hmotnosti, tj. do okamžiku, kdy přestaly ubývat na hmotnosti nebo začaly na hmotnosti přibývat. Za výslednou jsem považovala nejnižší zjištěnou hmotnost. Procentuální obsah vody ve vzorku jsem vypočítala jako poměr hmotnosti samotného čerstvého vzorku a samotného vysušeného vzorku (s odečtením hmotnosti misky s pískem). Procentuální obsah vody v těle mláděte i ve žloutku jsem vypočítala zprůměrováním výsledků ze dvou paralelních analýz. Po odečtení procentuálního obsahu vody od sta procent jsem získala procentuální obsah sušiny. Tím jsem vynásobila hmotnost mláděte s odečtenou hmotností žloutkového vaku, čímž jsem získala suchou hmotnost těla mláděte. Suchou hmotnost žloutkového vaku jsem vypočítala obdobně.

Obsah tuku

Stanovení obsahu tuku proběhlo gravimetricky po extrakci petroletherem z vysušeného vzorku. Vysušený vzorek jsem kvantitativně převedla do extrakční patrony „Macherey-Nagel“ o rozměrech 22 x 80 mm. Předsušenou, zvaženou a označenou kulatou baňku o objemu 250 ml jsem upevnila do vodní lázně s nastavenou teplotou 70 °C. Na baňku jsem nasadila Soxhletův extraktor o objemu 30 ml s vloženou patronou (viz obr. 3.2.1). Do aparatury jsem nalila přibližně 80 ml petroletheru p. a. o destilačním rozmezí 40-65 °C. Na extraktor jsem nasadila zpětný chladič. Extrahovalo se přibližně 5 hodin, pak jsem Soxhletův extraktor sejmula, vylila jsem z něj petrolether, vyjmula extrakční patronu a znovu jsem ho nasadila na baňku, aby se přebytečný petrolether nadestiloval z baňky do extraktoru, odkud jsem ho opět vylila. Baňku s vyextrahovaným tukem jsem umístila přibližně na 30 minut do pootevřené sušárny, aby se odpařily zbytky petroletheru, poté jsem sušárnu zavřela a baňku jsem sušila do konstantní hmotnosti při teplotě 103 ± 2 °C, přičemž jsem ji každou hodinu nechávala vychladnout a vážila. Za výslednou jsem považovala nejnižší zjištěnou hmotnost. Procentuální obsah tuku ve vzorku jsem vypočítala jako poměr čisté hmotnosti vyextrahovaného tuku a hmotnosti původního mokrého vzorku. Procentuální obsah tuku v těle mláděte jsem vypočítala zprůměrováním výsledků z paralelních vzorků.



Obr. 3.2.1 Soxhletovy extraktory s vloženou extrakční patronou a částí vyextrahovaného tuku.

Obsah proteinů

Stanovení obsahu proteinů proběhlo výpočtem z obsahu dusíku stanoveného metodou podle Kjeldahla (1883). Do mineralizační trubice (viz obr. 3.2.2) jsem navážila přibližně 1 g homogenizovaného vzorku. K němu jsem přidala dvě minerální tablety „Kjeltabs ST“ s obsahem 3,5 g síranu draselného (K_2SO_4) a 3,5 mg selenu. Poté jsem přidala 20 ml 96% kyseliny sírové (H_2SO_4). Mineralizační trubice jsem umístila do spalovacího bloku s nastavenou teplotou 420 °C a nasadila jsem na ně odsávač par s vodní vývěvou. Spalování probíhalo po dobu 100 minut, pak jsem trubice vyjmula a ponechala přibližně 30 minut vychladnout.



Obr. 3.2.2 Mineralizační trubice se spálenými vzorky připravenými k destilaci v přístroji Kjeltec 2200

Destilace probíhala v automatickém přístroji „Kjeltec 2200“ od firmy Foss Program byl nastavený na 4 minuty, do reakce vstupovalo 50 ml 1% kyseliny borité (H_3BO_3), 70 ml destilované vody a 160 ml 40% hydroxidu sodného (NaOH). Do reakční směsi byl také automaticky přidáván Taschiro indikátor (methylocervecí a bromkrezolová zeleň v ethanolu). Vzorek jsem poté ztitrovala kyselinou sírovou o koncentraci 0,1 mol/l a o známém faktoru s pomocí digitální byrety „Titrette“ od firmy Brand s přesností na 0,01 ml. Faktor je číslo udávající poměr mezi skutečnou a požadovanou koncentrací a obvykle se pohybuje okolo hodnoty 1. Procentuální obsah dusíku ve vzorku byl vypočítán podle následujícího vzorce:

$$X = [0,28 \times ((spotřeba \times faktor) - slep.)] \div navážka$$

(Spotřeba – spotřeba kyseliny na vzorek; slep. – spotřeba kyseliny na slepý pokus; navážka – hmotnost vzorku)

Slepý pokus sloužil k eliminování případných nepřesností způsobených chemikáliemi. Postupovala jsem při něm stejně, jako u ostatních analýz, ale nepřidala jsem do mineralizační trubice žádný vzorek. Pro výpočet přibližného obsahu proteinů ve vzorku se používají přepočítávací faktory v závislosti na tom, jaký protein ve vzorku převažuje. Pokud se jedná o vzorek svaloviny, která obsahuje převážně myofibrilární a sarkoplazmatické proteiny, činí přepočítávací faktor 6,25. V případě celého těla mláďete poměr jednotlivých typů proteinů neznám, vycházela jsem ale z prací autorů Hepp et al. (2006) a Yalcin et al. (2008a), kteří v podobných případech použili přepočítávací faktor 6,25.

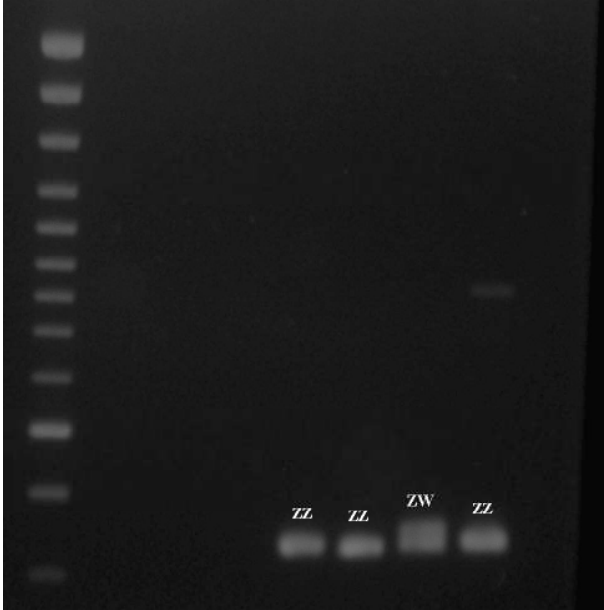
Obsah anorganických látek

Stanovení obsahu anorganických látek z důvodu časové náročnosti, technických a v neposlední řadě také estetických důvodů (silný zápach při uhelnatění peří) neproběhlo, musela jsem se proto spokojit s jejich odhadem pomocí součtu procentuálního obsahu vody, tuku a proteinů a dopočtu do sta procent. Tento odhad bohužel není příliš přesný.

3.3 Pohlaví mlád'at

Pohlaví bylo stanovováno molekulární metodou za využití CHD (chromo-helicase DNA binding protein) genu, který je vázaný na pohlavní chromosomy. Jedna kopie tohoto genu leží na chromosomu Z, druhá na chromosomu W, přičemž se tyto kopie od sebe liší délkou intronu (Kahn et al. 1998).

DNA byla vyzolována z tkáně ustřiženého prstu, v případě malých uhynulých embryí pak z jakékoli dostupné tkáně. Pro izolaci byl použit komerční Qiagen DNAeasy kit a bylo postupováno podle přiloženého protokolu. Získaná DNA byla amplifikována metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) podle Griffithse et al. (1998). Primery zde nasedají na konzervované úseky exonů, které jsou pro obě kopie genů stejné, takže je zajištěna amplifikace obou kopií. Produkty PCR byly obarveny ethidiumbromidem a po dobu přibližně 2 hodin oddělovány elektroforézou na 2% agarózovém gelu. Díky odlišným délkám intronů kopií CHD genu na pohlavních chromozomech bylo možno odlišit heterogametické pohlaví od homogametického. V případě heterogametického pohlaví doputovala kratší kopie genu, nacházející se na chromozomu W, v gelu dál, než jeho delší kopie na chromozomu Z (Lee et al. 2010). Proto se v případě heterogametického pohlaví (samice) na gelu objevily dva proužky a v případě homogametického samce jen jeden, viz obr. 3.3.1.



Obr. 3.3.1 Fotografie výsledku elektroforézy na agarózovém gelu. Na fotografii jsou 3 samci (1 proužek) a 1 samice (2 proužky).

Z důvodu velké časové náročnosti stanovení chemického složení mláďat jsem bohužel nestačila sama zanalyzovat také jejich pohlaví. Izolace DNA, PCR a elektroforéza proto proběhla v Laboratoři pro výzkum biodiverzity na katedře zoologie pod vedením Mgr. Jakuba Kreisingera, Ph.D.

3.4. Statistické zpracování

Při zpracování dat jsem použila programy Statistica, verze 6.1 (© StatSoft, Inc. 2003) a R, verze 2.8.1 (© The R Foundation for Statistical Computing 2008). Program R jsem používala pouze k výpočtům chí-kvadrátů, na ostatní analýzy jsem použila program Statistica. T-testy jsem počítala ručně s pomocí vzorců a tabulek v literatuře (Zar 1996).

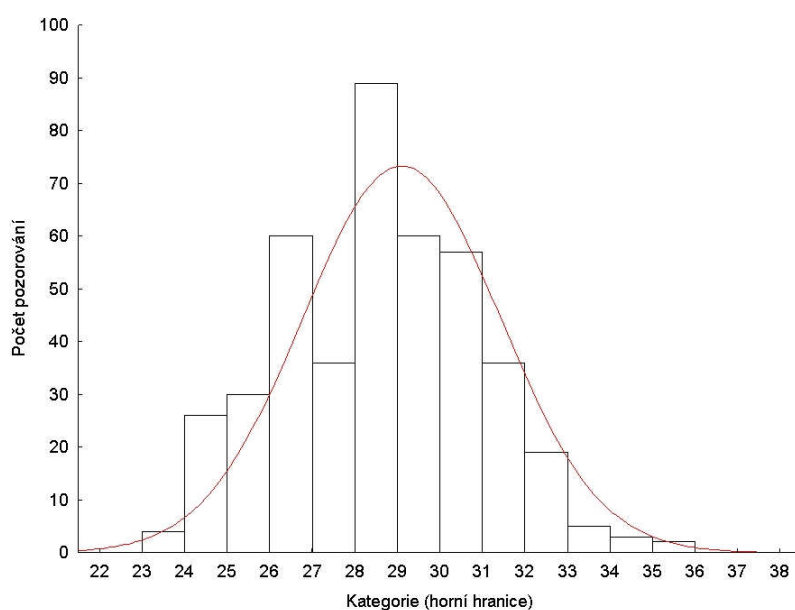
Ve většině případů jsem použila jednocestnou analýzu variance (ANOVA), případně její neparametrickou formu (Kruskal-Wallisův test). V případech, kdy bylo nezávislých proměnných více, jsem použila dvoucestnou analýzu variance nebo analýzu kovariance (ANCOVA). Pro mnohonásobná srovnání jsem pak použila Tukeyho test, v případě, že nebyl splněn předpoklad normálního rozložení, použila jsem neparametrický test mnohonásobného srovnání, který nabízí program Statistica.

Dále jsem použila t-test, mnohonásobnou logistickou regresi, analýzu hlavních komponent (PCA) a Pearsonův chí-kvadrát test.

Všechny průměry jsem uváděla ve tvaru „průměr ± střední chyba průměru (SE)“.

Normalitu dat jsem testovala pomocí jednovýběrového Kolmogorovova-Smirnovova testu. Pokud data neměla normální rozložení, místo analýzy variance jsem použila Kruskal-

Wallisův test, případně data upravila logaritmickou transformací (vždy uvedeno). Zlogaritmování dat bylo také potřeba pro případy, kdy jsem porovnávala, zda se sklony regresních přímk odlišují od jedné. Délka inkubace jako jediná proměnná neměla normální rozložení ani po zlogaritmování (Kolmogorov-Smirnov: $p < 0,01$ před i po transformaci). Protože se ale její frekvenční histogram podle mého názoru blížil normálnímu rozložení (viz obr. 3.4.1), použila jsem pro analýzy netransformovaná data. Analýzu variance délky inkubace jsem nahradila neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem, v případě analýzy kovariance by však bylo provedení neparametrické alternativy obtížné.



Obr. 3.4.1 Frekvenční histogram délky inkubace. Toto rozložení se průkazně liší od normálního rozložení (Kolmogorov-Smirnov: $p < 0,01$).

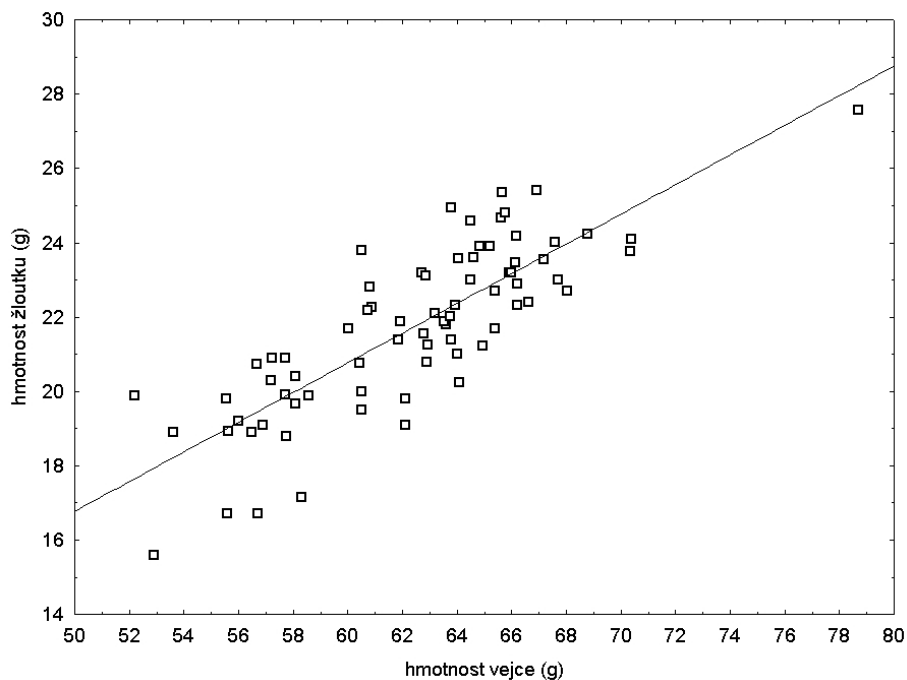
Pro určení variability některých strukturálních rozměrů jsem použila variační koeficient korigovaný počtem záznamů podle Sokala a Rohlfů (1995), který se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$CV = \left(1 + \frac{1}{4n}\right) \times \left(\frac{SD}{\bar{x}}\right)$$

4. Výsledky

Průměrná hmotnost experimentálních vajec byla $62,59 \pm 0,168$ g ($n = 736$), jejich průměrná délka byla $59,35 \pm 0,088$ mm a průměrná šířka $43,50 \pm 0,044$ mm. Průměrná hmotnost vajec, které byly umístěny do jednotlivých inkubačních teplot, se mezi teplotami nelišila (ANOVA: $F(5; 730) = 1,180$; $p = 0,317$).

Hmotnost žloutku z vajec nezahrnutých do experimentu vysoce průkazně závisela na hmotnosti vejce ($r^2 = 0,67$; $r = 0,82$; $p < 0,001$; $n = 74$), viz obr. 4.1.



Obr. 4.1 Závislost hmotnosti žloutku na hmotnosti celého vejce

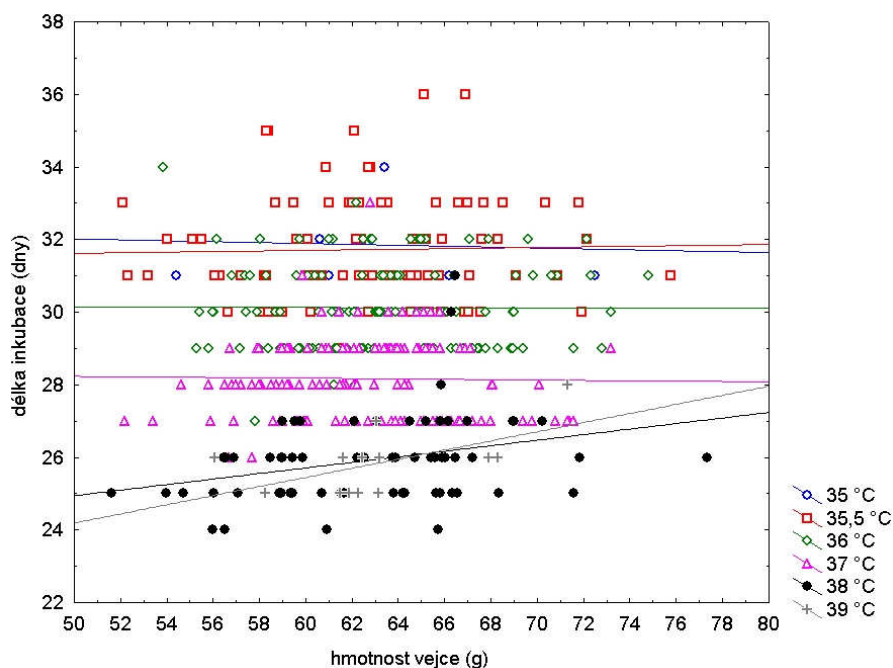
4.1 Délka inkubace

Průměrná délka inkubace byla $29,1 \pm 0,11$ dne ($n = 427$). Sledovala jsem, jak délka inkubace závisela na inkubační teplotě a hmotnosti vejce. S rostoucí inkubační teplotou délka inkubace klesala, viz tabulka 4.1.1

Tab. 4.1.1 Délka inkubace v jednotlivých teplotách. Údaje jsou uvedeny ve dnech.

| teplota (°C) | průměr ± SE | minimum | maximum | n |
|--------------|-------------|---------|---------|-----|
| 35 | 31,9 ± 0,46 | 31 | 34 | 7 |
| 35,5 | 31,7 ± 0,16 | 29 | 36 | 87 |
| 36 | 30,1 ± 0,11 | 27 | 34 | 121 |
| 37 | 28,2 ± 0,10 | 26 | 33 | 136 |
| 38 | 25,9 ± 0,16 | 24 | 31 | 63 |
| 39 | 25,9 ± 0,25 | 25 | 28 | 13 |

Pro výpočet jsem nejprve použila analýzu kovariance s interakcemi. Protože se interakce mezi inkubační teplotou a hmotností vejce neprokázala ($F(5; 415) = 1,298$; $p = 0,264$), z modelu jsem ji odstranila a dále počítala analýzu kovariance bez interakce. Ačkoliv byl tudíž rozdíl mezi sklony regresních přímk nepříkázny, z obrázku 4.1.2 jsou mírné rozdíly ve sklonech přímk pro inkubační teploty 38 a 39 °C patrné. Také variabilita v délce inkubace vysvětlovaná hmotností vejce byla pro tyto dvě teploty vyšší, viz tab. 4.1.3. Znamená to, že vliv hmotnosti vejce na délku inkubace se pravděpodobně více projevuje ve vyšších inkubačních teplotách a současně se v těchto teplotách líhnou těžší vejce relativně později, i když tento trend není statisticky průkazný. Vliv inkubační teploty na délku inkubace byl vysoce průkazný (ANCOVA: $F(5; 420) = 222,392$; $p \ll 0,001$), vliv hmotnosti vejce na délku inkubace se neprokázal ($F(1; 420) = 1,582$; $p = 0,209$). Inkubační teploty, které se od sebe průkazně lišily v délce inkubace jsou uvedeny v tabulce 4.1.4.



Obr. 4.1.2 Vztah mezi délkou inkubace a hmotností vejce v jednotlivých inkubačních teplotách

Tab. 4.1.3 Podíl variability délky inkubace vysvětlené hmotností vejce v jednotlivých inkubačních teplotách

| teplota (°C) | 35 | 35,5 | 36 | 37 | 38 | 39 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| r^2 | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,099 | 0,298 |

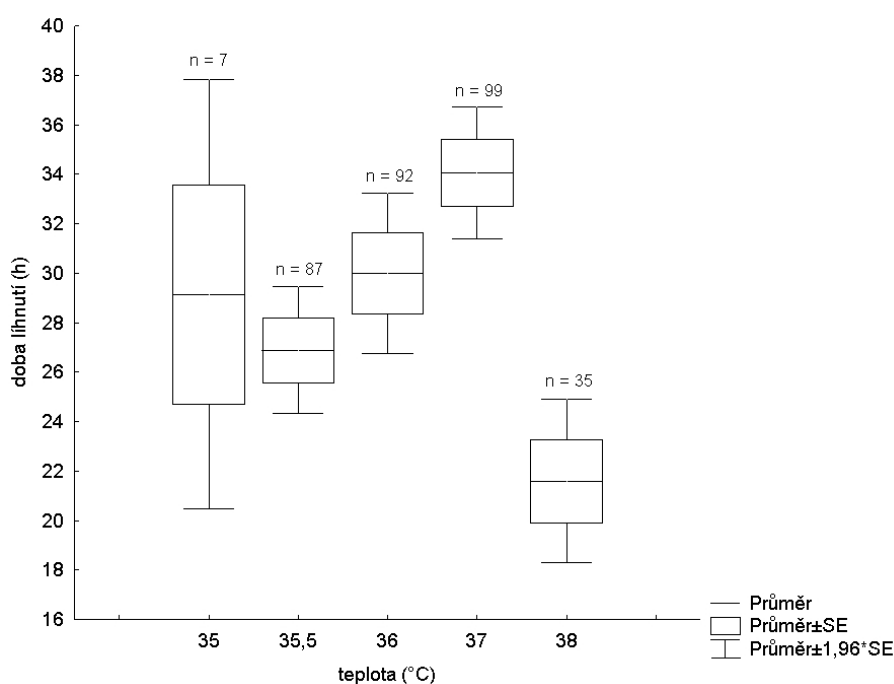
Tab. 4.1.4 Výsledky Tukey HSD testu pro délky inkubace mezi jednotlivými inkubačními teplotami.

V tabulce jsou uvedeny p-hodnoty, průkazné rozdíly mezi teplotami jsou vyznačeny tučně.

| teplota (°C) | 35 | 35,5 | 36 | 37 | 38 |
|--------------|----------|----------|----------|---------|-------|
| 35 | - | | | | |
| 35,5 | 1,000 | - | | | |
| 36 | 0,932 | < 0,001 | - | | |
| 37 | < 0,001 | << 0,001 | << 0,001 | - | |
| 38 | << 0,001 | << 0,001 | << 0,001 | < 0,001 | - |
| 39 | < 0,001 | << 0,001 | << 0,001 | 0,034 | 1,000 |

Sledovala jsem také, jak dlouho trvalo mláděti, než se z naklovaného vejce vylíhlo. Toto sledování proběhlo pouze v roce 2009, proto v něm není zahrnuta inkubační teplota 39 °C, která byla v experimentu použita jen v roce 2008. Vzhledem k tomu, že jsem inkubátory kontrolovala v dvanáctihodinových intervalech, nebylo možné zjistit dobu líhnutí kratší, než

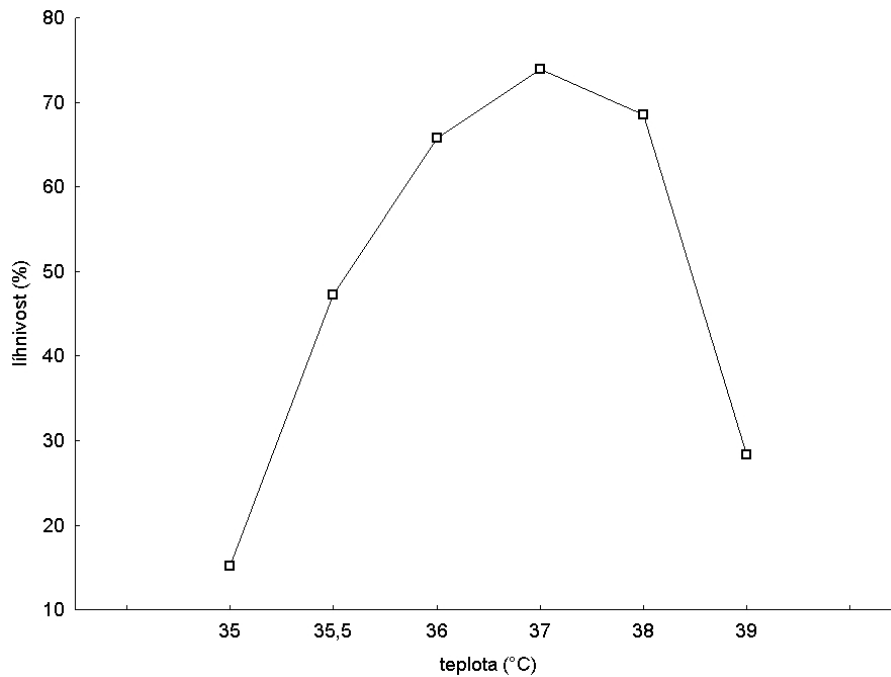
12 hodin, čas naklování vejce i vylíhnutí mláděte jsem proto přiřazovala k času kontroly. Průměrně líhnutí trvalo $29,5 \pm 0,79$ hodiny ($n = 320$). Pro zjištění rozdílů mezi inkubačními teplotami jsem použila neparametrický Kruskal-Wallisův test, protože data neměla normální rozložení. Test ukázal průkazné rozdíly mezi inkubačními teplotami (KW: $H(4; n = 320) = 29,387$; $p < 0,001$). Následným neparametrickým testem mnohonásobného srovnání jsem odhalila průkazné rozdíly mezi inkubačními teplotami 37 °C a $35,5\text{ °C}$ ($p = 0,003$), dále se průkazně lišila teplota 38 °C od teplot 36 °C ($p = 0,028$) a 37 °C ($p < 0,001$). Jak se doba líhnutí mezi inkubačními teplotami měnila, ukazuje obrázek 4.1.5. Nejdéle se líhla mláďata v teplotě 37 °C , nejrychleji mláďata v teplotě 38 °C .



Obr. 4.1.5 Vztah mezi dobou líhnutí (časem mezi prvním naklováním vejce a vylíhnutím mláděte) a inkubační teplotou. Počty jedinců v každé inkubační teplotě jsou uvedeny u příslušných boxů.

4.2 Líhivost

Ze 736 experimentálních vajec se celkem vylíhlo 427 mláďat, tj. 58 %. Líhivost byla nejvyšší v teplotě 37 °C , v nižších i vyšších teplotách byla nižší, viz obr. 4.2.1. Pomocí mnohonásobné logistické regrese jsem testovala, zda pravděpodobnost vylíhnutí vejce závisí na inkubační teplotě a na hmotnosti vejce. Byl prokázán vliv inkubační teploty (Wald = 76,596; $df = 5$; $p \ll 0,001$) i hmotnosti vejce (Wald = 6,950; $df = 1$; $p = 0,008$).



Obr. 4.2.1 Vztah mezi inkubační teplotou a líhivostí

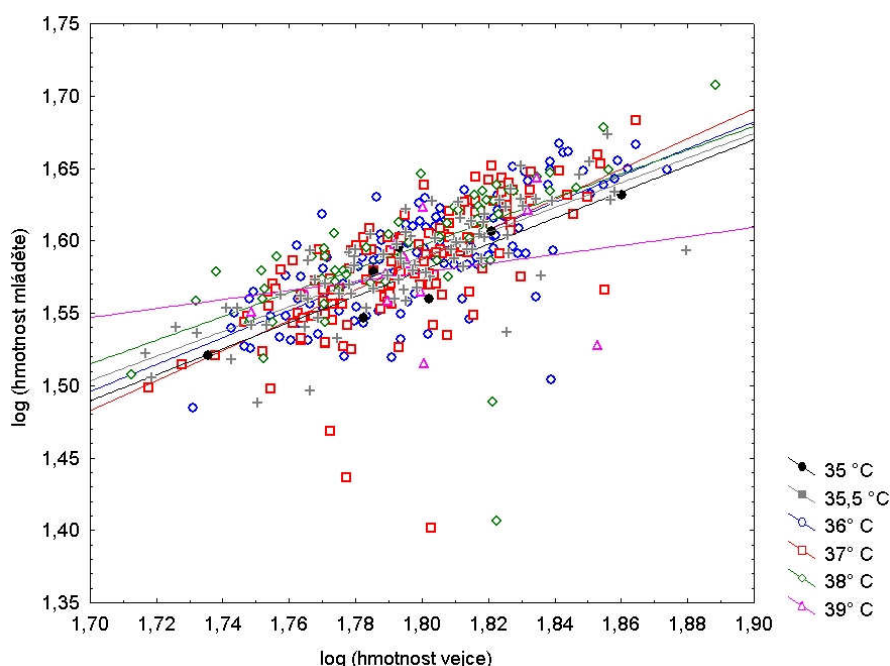
4.3 Hmotnost mlád'at a žloutkových váčků

Průměrná hmotnost vylíhlých mlád'at byla $38,77 \pm 0,170$ g ($n = 427$), průměrné hmotnosti pro jednotlivé inkubační teploty jsou uvedeny v tabulce 4.3.1. Sledovala jsem, jak závisela hmotnost mlád'at na inkubační teplotě a hmotnosti vejce. Hmotnosti jsem nejprve zlogaritovala (pro možnost pozdějšího porovnávání sklonů regresních přímek) a pak jsem použila analýzu kovariance s interakcemi. Interakce mezi inkubační teplotou a hmotností vejce se neprokázala (ANCOVA: $F(5; 415) = 1,405$; $p = 0,221$), proto jsem ji z modelu odstranila. Přestože rozdíl mezi sklony regresních přímek nebyl průkazný, z obrázku 4.3.2 je patrné jisté snížení sklonu pro teplotu 39 °C. Znamenalo by to, že by se v této inkubační teplotě měla z těžších vajec líhnout relativně lehčí mlád'ata. Vliv inkubační teploty na hmotnost mláděte průkazný nebyl (ANCOVA: $F(5; 420) = 1,719$; $p = 0,129$), vliv hmotnosti vejce byl naopak vysoce průkazný ($F(1; 420) = 373,169$; $p \ll 0,001$).

Variabilita v hmotnosti mláděte vysvětlená hmotností vejce s teplotou klesala, viz tabulka 4.3.3. Ve vyšších inkubačních teplotách byla tudíž variabilita v hmotnosti mlád'at pravděpodobně způsobena jinými faktory, než je samotná hmotnost vejce.

Tab. 4.3.1 Hmotnost mláďat v jednotlivých teplotách. Údaje jsou uvedeny v gramech.

| teplota (°C) | průměr ± SE | minimum | maximum | n |
|--------------|---------------|---------|---------|-----|
| 35 | 37,88 ± 1,243 | 33,17 | 42,81 | 7 |
| 35,5 | 38,62 ± 0,336 | 30,78 | 47,15 | 87 |
| 36 | 39,04 ± 0,314 | 30,51 | 46,50 | 121 |
| 37 | 38,42 ± 0,310 | 25,22 | 48,20 | 136 |
| 38 | 39,47 ± 0,500 | 25,50 | 51,00 | 63 |
| 39 | 37,98 ± 0,911 | 32,73 | 44,00 | 13 |



Obr. 4.3.2 Vztah mezi zlogaritmovanou hmotností mláděte a zlogaritmovanou hmotností vejce v jednotlivých teplotách

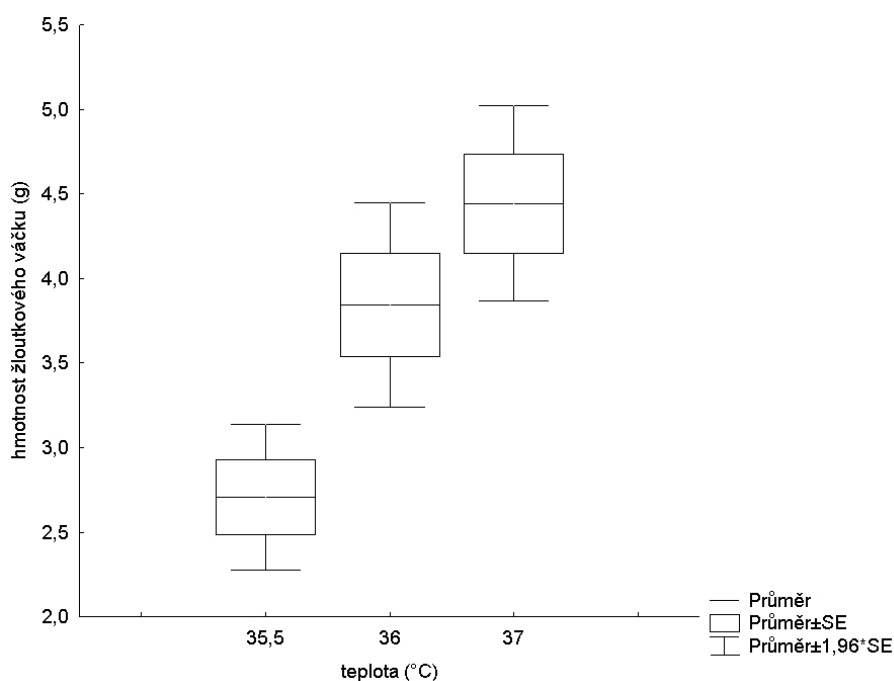
Tab. 4.3.3 Podíl variability zlogaritmované hmotnosti mláděte vysvětlený zlogaritmovanou hmotností vejce v jednotlivých teplotách

| teplota (°C) | 35 | 35,5 | 36 | 37 | 38 | 39 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| r^2 | 0,829 | 0,619 | 0,523 | 0,458 | 0,374 | 0,053 |

Pomocí t-testu jsem dále zjišťovala, jak závisí hmotnost mláděte na hmotnosti vejce v jednotlivých inkubačních teplotách. Testovala jsem, jestli se sklony přímek průkazně odlišují od jedné. Pokud by byl sklon přímky průkazně větší než 1 (pozitivní alometrie), znamenalo by to, že z těžších vajec se v této teplotě líhnou relativně těžší mláďata, než by

odpovídalo izometrickému vztahu se sklonem rovným jedné. Pokud by sklon přímky byl naopak menší, než 1 (negativní alometrie), znamenalo by to líhnutí relativně lehčích mlád'at. Jediný sklon přímky, který se průkazně odlišoval od jedné, byl sklon pro inkubační teplotu 35,5 °C, který byl $0,855 \pm 0,073$ SE. Tato odlišnost však byla na hranici průkaznosti ($t(85) = -1,988$; $p = 0,05$). Pro všechny ostatní inkubační teploty přesahovaly p-hodnoty číslo 0,1.

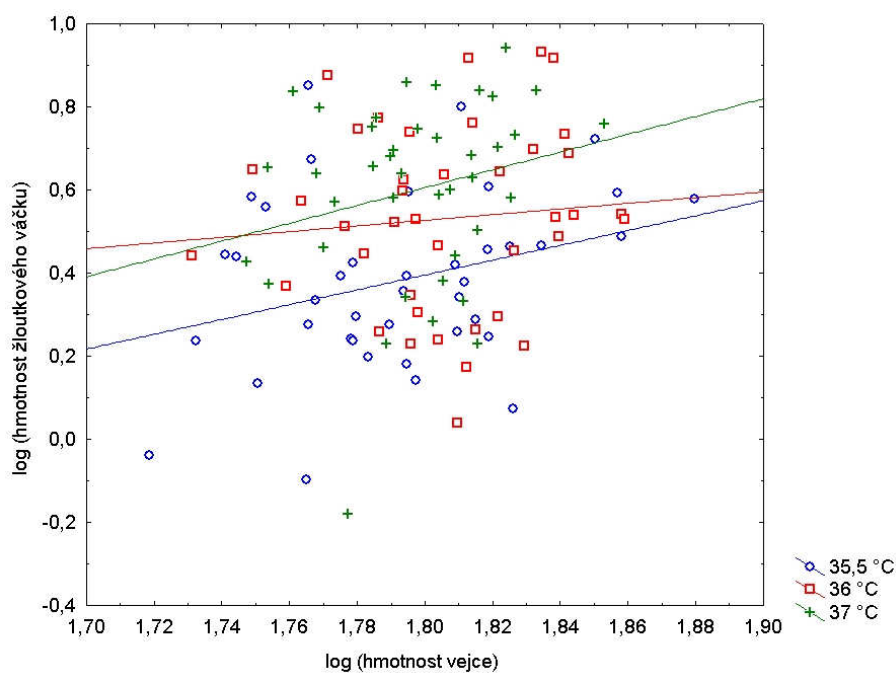
Celkovou hmotnost mláděte lze rozdělit na dvě složky: hmotnost reziduálního žloutkového vřčku a hmotnost vlastního těla. Analýzu hmotnosti reziduálního žloutkového vřčku (dále jen „žloutkový vřček“), stejně jako analýzu chemického složení těla mláděte, jsem provedla pouze u teplot 35,5, 36 a 37 °C. V každé teplotě bylo zanalyzováno 40 jedinců (viz kapitola Metodika). Průměrná hmotnost žloutkového vřčku byla $3,664 \pm 0,171$ g ($n = 120$). Tato hmotnost s teplotou stoupala, viz obr. 4.3.4.



Obr. 4.3.4 Vztah mezi hmotností žloutkového vřčku a inkubační teplotou

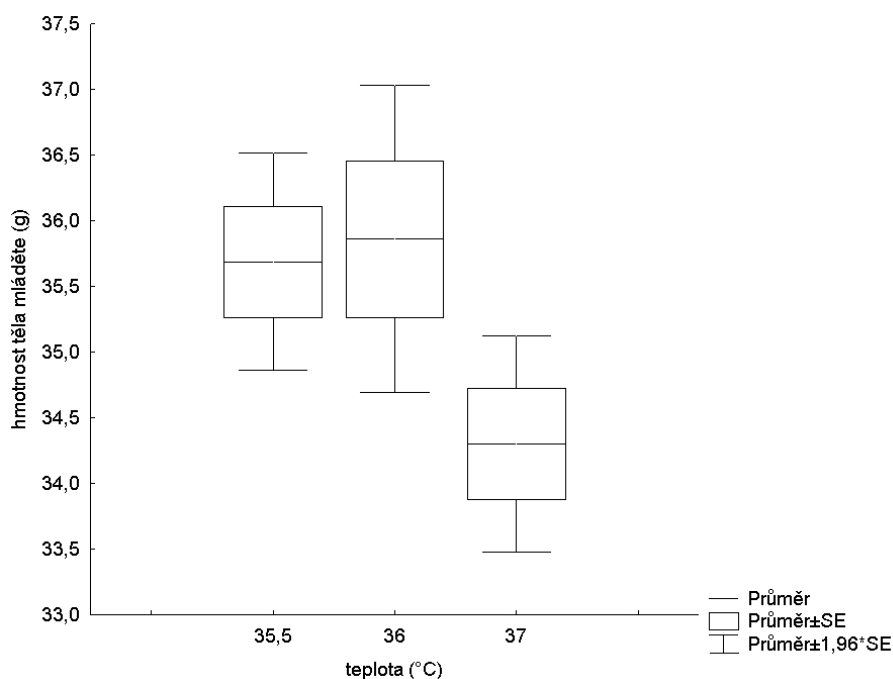
Sledovala jsem, jak závisí hmotnost žloutkového vřčku na inkubační teplotě a hmotnosti vejce. Po zlogaritmování všech hmotností (pro pozdější analýzu sklonů regresních přímek) jsem použila analýzu kovariance s interakcemi. Interakce mezi hmotností vejce a inkubační teplotou se neprokázala (ANCOVA: $F(2; 114) = 0,383$; $p = 0,683$), proto jsem ji z modelu odstranila. Podařilo se prokázat vliv inkubační teploty i hmotnosti vejce na hmotnost žloutkového vřčku (ANCOVA: $F(2; 116) = 9,643$; $p < 0,001$; resp. $F(1; 116) = 5,263$; $p = 0,024$). Průkazně se odlišovala inkubační teplota 35,5 °C od teplot 36 (Tukey HSD: $p =$

0,007) i 37 °C ($p < 0,001$). Vztah mezi hmotnostmi žloutkového váčku a hmotností vejce v jednotlivých inkubačních teplotách je graficky znázorněn na obrázku 4.3.5.



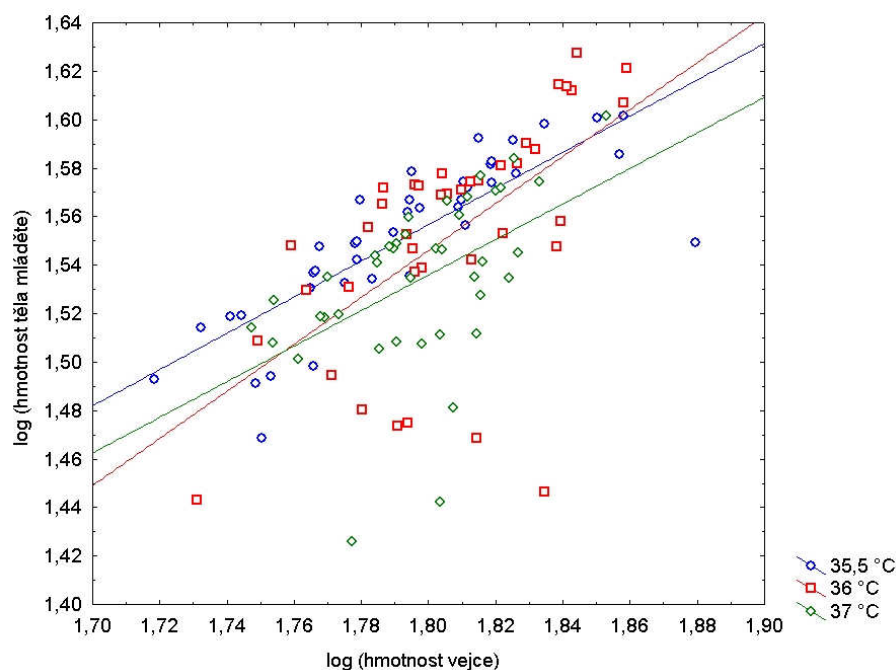
Obr. 4.3.5 Vztah mezi zlogaritmovanou hmotností žloutkového váčku a zlogaritmovanou hmotností vejce v jednotlivých inkubačních teplotách

Průměrná hmotnost vlastního těla mláděte (s vyjmutým žloutkovým váčkem) byla $35,28 \pm 0,286$ g ($n = 120$) a s teplotou na rozdíl od žloutkového váčku stoupala, viz obr. 4.3.6.



Obr 4.3.6 Vztah mezi hmotností vlastního těla mláděte a inkubační teplotou

Podobně jako u žloutkového váčku, i zde jsem zkoumala závislost hmotnosti těla mláděte na inkubační teplotě hmotnosti vejce po logaritmické transformaci obou hmotností. Ani v tomto případě jsem neprokázala interakci mezi hmotností vejce a inkubační teplotou (ANCOVA: $F(2; 114) = 0,642$; $p = 0,528$), proto jsem ji z modelu odstranila. Podařilo se prokázat vliv inkubační teploty i hmotnosti vejce na hmotnost těla mláděte (ANCOVA: $F(2; 116) = 4,805$; $p = 0,010$; resp. $F(1; 116) = 77,393$; $p \ll 0,001$). Průkazně se odlišovala inkubační teplota 37 °C od teplot 35,5 °C (Tukey HSD: $p = 0,032$) a 36 °C ($p = 0,023$). Vztah je graficky znázorněn na obrázku 4.3.7.



Obr. 4.3.7 Vztah mezi zlogaritmovanou hmotností vlastního těla mláděte (s vyjmutým žloutkovým váčkem) a zlogaritmovanou hmotností vejce v jednotlivých inkubačních teplotách

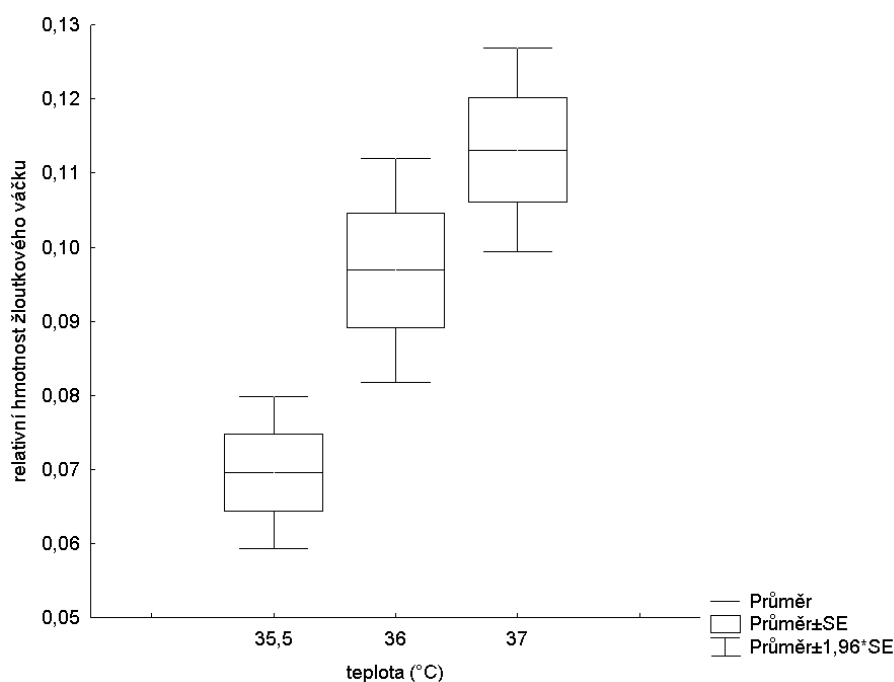
Vztah mezi hmotností těla a hmotností vejce byl těsnější, než tomu bylo u hmotnosti žloutku, jak je vidět při porovnání obrázků 4.3.5 a 4.3.7 a také z podílů vysvětlené variability (viz tabulka 4.3.8), přičemž vysvětlená variabilita hmotnosti těla s rostoucí inkubační teplotou klesala.

Tab. 4.3.8 Podíly variability hmotností žloutkového váčku a vlastního těla mláděte (s vyjmutým žloutkovým váčkem) vysvětlené hmotností vejce v jednotlivých inkubačních teplotách. Všechny hmotnosti byly zlogaritmovány.

| teplota (°C) | 35,5 | 36 | 37 |
|-------------------------|-------|-------|-------|
| r^2 – žloutkový váček | 0,095 | 0,008 | 0,050 |
| r^2 – tělo mláděte | 0,671 | 0,365 | 0,247 |

Stejně, jako u závislosti hmotnosti mláděte na hmotnosti vejce (viz výše), i zde jsem sledovala odlišnost sklonů přímek od jedné. V případě závislosti hmotnosti žloutkového váčku na hmotnosti vejce se žádný sklon průkazně nelišil od jedné (všechna $p > 0,4$). V případě závislosti hmotnosti těla mláděte se od jedné průkazně odlišoval sklon přímky pro teplotu 35,5 °C, který byl $0,747 \pm 0,085$ SE ($t(38) = -2,978$; $p = 0,01$). Sklony regresních přímek pro teploty 36 a 37 °C se od jedné průkazně nelišily ($p = 0,9$, respektive 0,2).

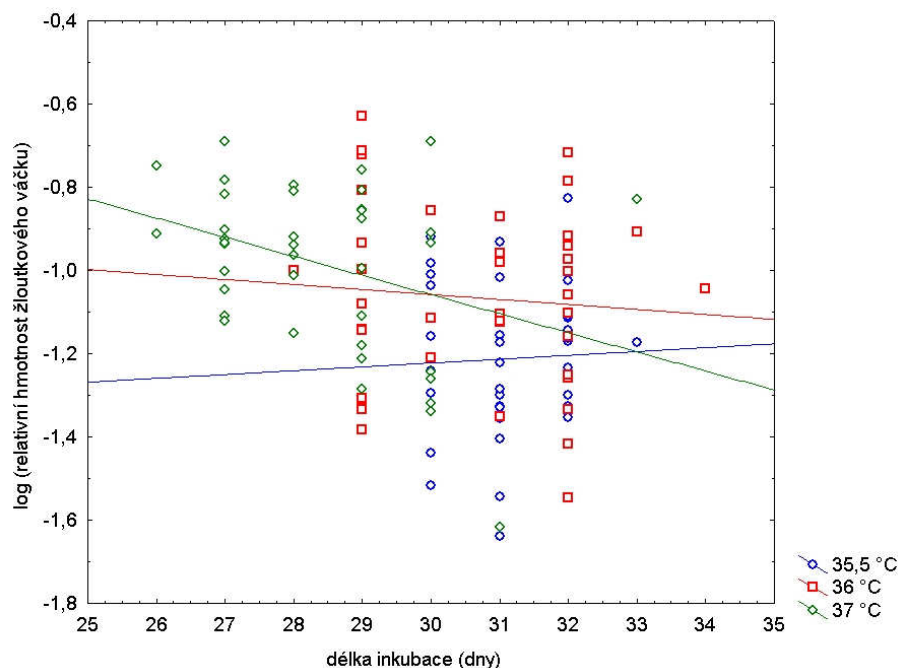
Z obrázků 4.3.4 a 4.3.6 je patrné, že se s teplotou mění podíl hmotnostních složek mláděte, ačkoliv celková hmotnost mláděte se nemění (viz výše). Ještě více byl tento efekt patrný, když jsem proti inkubační teplotě vynesla relativní hmotnost žloutkového vřívku v poměru k hmotnosti celého mláděte. Průměrný hmotnostní podíl žloutkového vřívku k celému mláděti byl $0,093 \pm 0,004$ ($n = 120$) a s rostoucí teplotou stoupal, viz obr. 4.3.9.



Obr. 4.3.9 Vztah mezi hmotnostním podílem žloutkového vřívku v celém mláděti a inkubační teplotou

Pro odhad míry spotřeby žloutkového vřívku vyvíjejícím se embryem jsem relativní hmotnost žloutkového vřívku v jednotlivých inkubačních teplotách vynesla proti délce inkubace, abych tyto dva provázané vlivy rozdělila (viz obr. 4.3.10). Relativní hmotnost žloutkového vřívku jsem zlogaritmovala, protože neměla normální rozložení a odstranila jsem z ní jednu hodnotu z inkubační teploty 35,5 °C, která byla odlehlá v obou osách. Poté jsem použila analýzu kovariance s interakcemi. Interakce mezi inkubační teplotou a délkou inkubace se neprokázala (ANCOVA: $F(2; 113) = 1,022$; $p = 0,363$), proto jsem ji z modelu odstranila. Relativní hmotnost žloutkového vřívku průkazně závisela na inkubační teplotě (ANCOVA: $F(2; 115) = 5,721$; $p = 0,004$), ale ne na délce inkubace ($F(1; 115) = 2,785$; $p = 0,098$). Průkazně se odlišovala inkubační teplota 35,5 °C od teplot 36 °C (Tukey HSD: $p = 0,004$) a 37 °C ($p < 0,001$).

Délka inkubace vysvětlovala jen velmi málo variability v relativní hmotnosti žloutku. V inkubační teplotě 35,5 °C to bylo méně, než 1 %, v teplotě 36 °C 1 % a vůbec nejvíce variability vysvětlovala délka inkubace v teplotě 37 °C – 11 %.

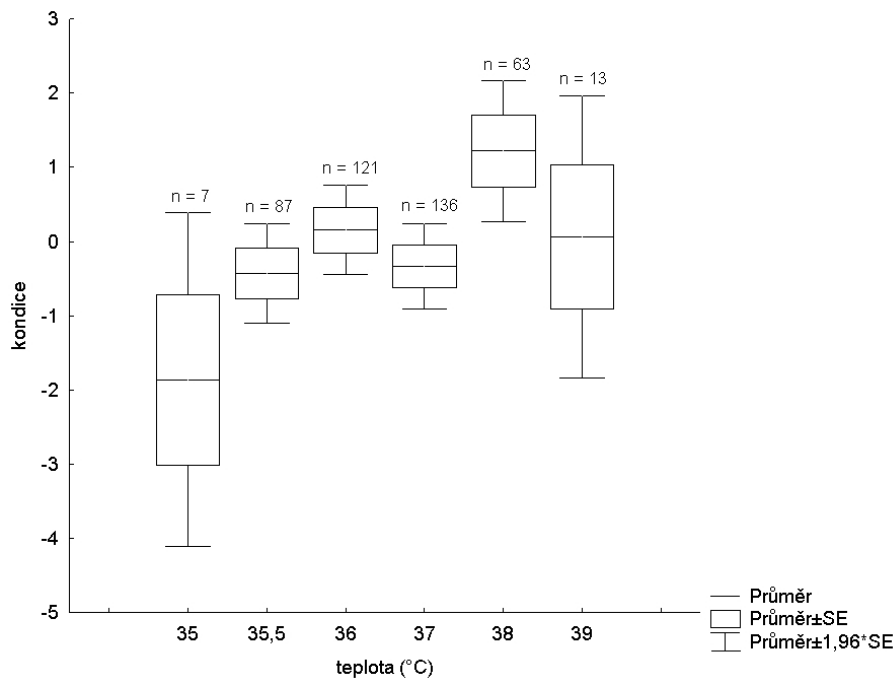


Obr. 4.3.10 Vztah mezi zlogaritmovanou relativní hmotností žloutkového váčku (poměr jeho hmotnosti k hmotnosti celého vylíhlého mláděte) a délkou inkubace v jednotlivých inkubačních teplotách.

4.4. Kondice mláďat

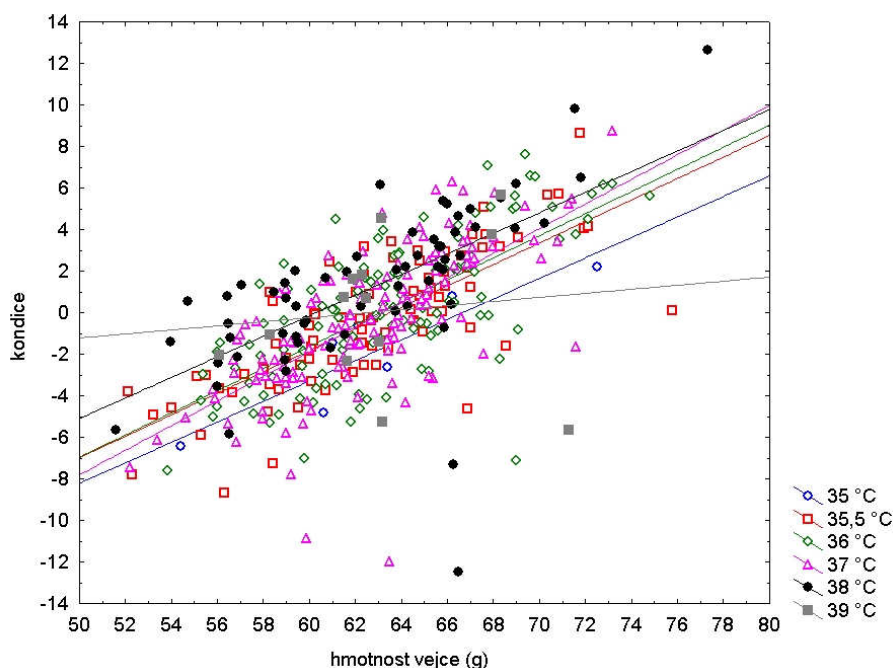
Tělesnou kondici mláďat jsem odhadla jako reziduály závislosti hmotnosti mláděte na délce tarsu podle autorů DuRant et al. (2010).

Zkoumala jsem, jak závisí tělesná kondice mláďat na inkubační teplotě a hmotnosti vejce. Použila jsem analýzu kovariance s interakcemi. Interakce mezi hmotností vejce a inkubační teplotou se neprokázala (ANCOVA: $F(5; 415) = 1,512$; $p = 0,185$), proto jsem ji z modelu odstranila. Kondice mláďat pak průkazně závisela na inkubační teplotě (ANCOVA: $F(5; 420) = 28,775$; $p = 0,001$), i na hmotnosti vejce (ANCOVA: $F(1; 420) = 358,579$; $p \ll 0,001$). Nejvyšší průměrnou kondici měla mláďata z inkubační teploty 38 °C (viz obr. 4.4.1), která se současně průkazně odlišovala od teplot 35 (Tukey HSD: $p = 0,025$), 35,5 ($p = 0,001$) a 37 °C ($p = 0,001$). V inkubační teplotě 39 °C kondice opět klesala, ale rozdíl oproti ostatním teplotám není průkazný ($p > 0,5$ pro všechny teploty).



Obr. 4.4.1 Závislost tělesné kondice na inkubační teplotě. Kondice je vyjádřena jako reziduály vztahu mezi tělesnou hmotností a délkou tarsu. Počty jedinců v jednotlivých teplotách jsou uvedeny u každého boxu.

Z obrázku 4.4.2 je patrné, že tělesná kondice mláďat s hmotností vejce stoupala, nižší sklon regresní přímky pro inkubační teplotu 39 °C by znamenal relativně menší zvýšení kondice pro vejce s vyšší hmotností, ale tento rozdíl nebyl průkazný. V této inkubační teplotě je také velmi malý podíl variability v kondici vysvětlen hmotností vejce, viz tab. 4.4.3. Celkově s rostoucí inkubační teplotou podíl vysvětlené variability klesal.



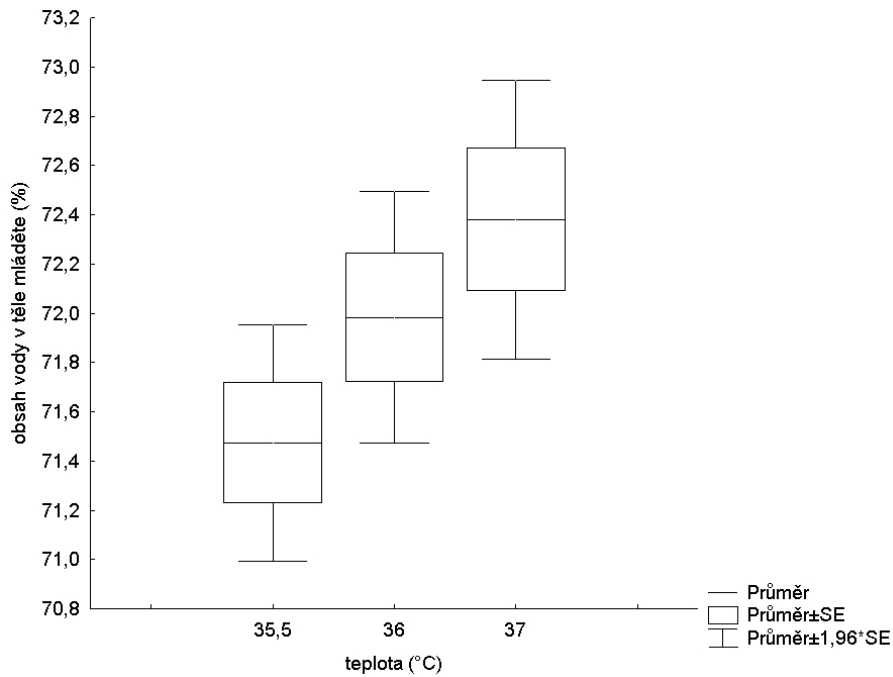
Obr. 4.4.2 Vztah mezi tělesnou kondicí mláďat (vyjádřenou jako reziduály vztahu mezi délkou tarsu a tělesnou hmotností) a hmotností vejce v jednotlivých inkubačních teplotách.

Tab. 4.4.3 Podíl variability v tělesné kondici mláděte (vyjádřené jako reziduály vztahu mezi délkou tarsu a tělesnou hmotností) vysvětlený hmotností vejce v jednotlivých inkubačních teplotách.

| teplota (°C) | 35 | 35,5 | 36 | 37 | 38 | 39 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| r^2 | 0,811 | 0,581 | 0,478 | 0,474 | 0,399 | 0,013 |

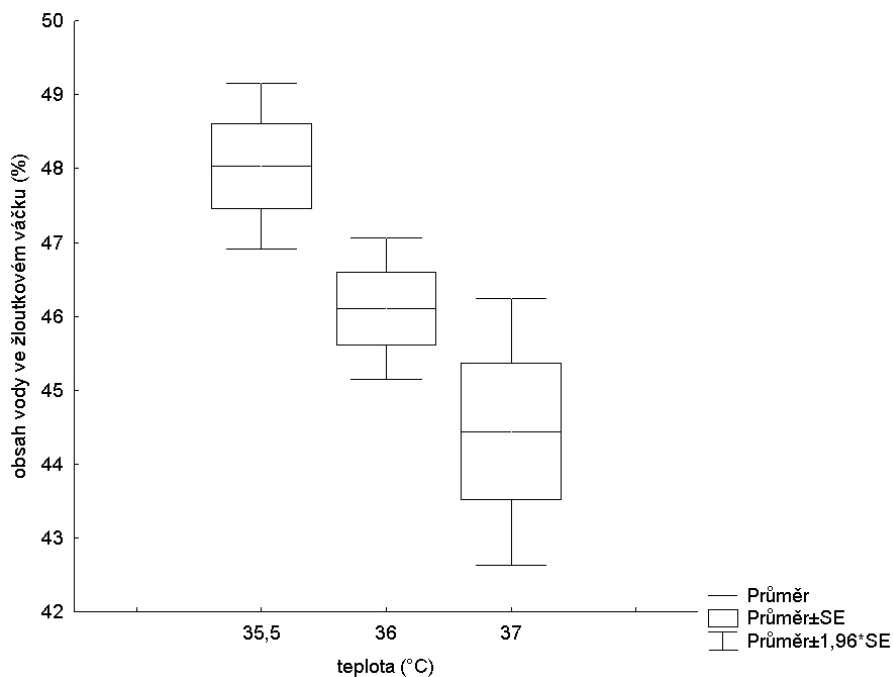
4.5 Chemické složení

Průměrný procentuální obsah vody ve vlastním těle mláděte byl $71,95 \pm 0,156$ % ($n = 120$) a s rostoucí teplotou stoupal (viz obr. 4.5.1), rozdíly mezi teplotami ale byly marginálně nesignifikantní (ANOVA: $F(2; 117) = 2,938$; $p = 0,057$).



Obr. 4.5.1 Vztah mezi procentuálním obsahem vody ve vlastním těle mláděte (s vyjmutým žloutkovým váčkem) a inkubační teplotou

Průměrný procentuální obsah vody ve žloutkovém váčku byl $46,19 \pm 0,416$ % ($n = 120$) a na rozdíl od obsahu vody v těle s rostoucí teplotou klesal, viz obr. 4.5.2. Rozdíly mezi inkubačními teplotami zde byly průkazné (ANOVA: $F(2; 117) = 6,838$; $p = 0,002$). Průkazně se lišila teplota $35,5$ °C od teploty 37 °C (Tukey HSD: $p = 0,001$).

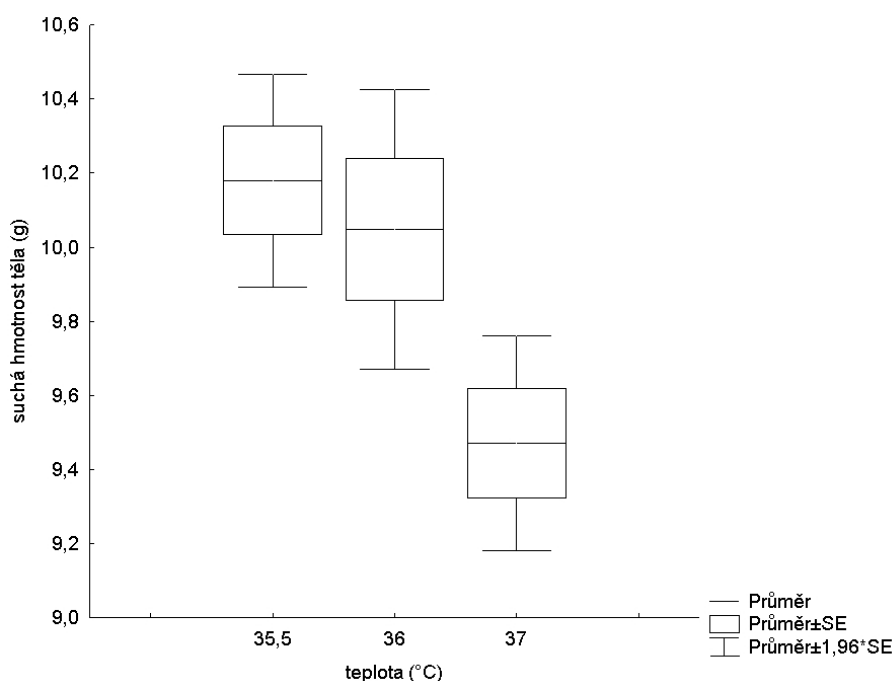


Obr. 4.5.2 Vztah mezi procentuálním obsahem vody ve žloutkovém váčku a inkubační teplotou

Když jsem však sečetla hmotnost vody ve žloutkovém váčku s hmotností vody ve vlastním těle mláděte a výsledek vztáhla k hmotnosti celého mláděte, tak se mezi inkubačními teplotami žádný rozdíl v procentuálním obsahu vody neprokázal (ANOVA: $F(2; 117) = 1,529$; $p = 0,221$).

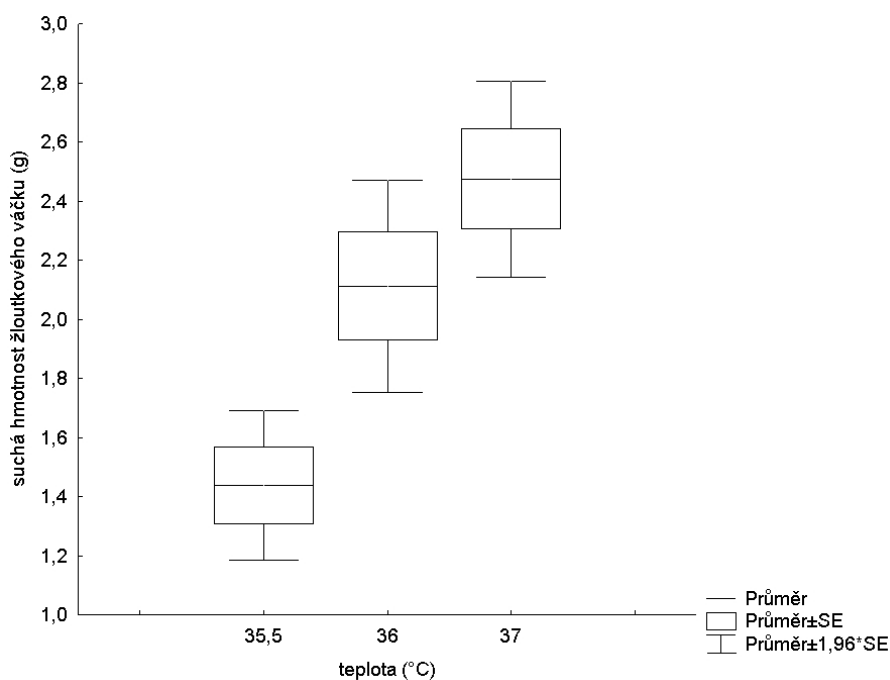
Zjišťovala jsem také, zda se jednalo přímo o přesun určitého množství vody ze žloutkového váčku do těla kachny. Pokud by tomu tak bylo, existovala by zde záporná korelace mezi hmotností vody ve vlastním těle mláděte a hmotností vody ve žloutkovém vaku. Žádný vztah se ale neprokázal ($r^2 = 0,00$; $r = -0,03$; $p = 0,755$).

Protože z výše uvedených analýz vyplývá, že se jak žloutkový vak, tak tělo mláděte mezi teplotami liší v obsahu vody, provedla jsem ještě jednu analýzu vztahu mezi hmotností žloutkového váčku i těla mláděte a inkubační teplotou – tentokrát pro suché hmotnosti. Celková průměrná hmotnost suchého těla byla $9,90 \pm 0,098$ g ($n = 120$), průměrná hmotnost suchého žloutkového váčku byla $2,01 \pm$ g ($n = 120$). Suchá hmotnost těla s teplotou klesala, viz obr. 4.5.3. Rozdíly mezi teplotami byly průkazné (ANOVA: $F(2; 117) = 5,313$; $p = 0,006$). Průkazně se lišila teplota 37°C od $35,5^\circ\text{C}$ (Tukey HSD: $p = 0,008$) a od 36°C ($p = 0,037$).



Obr. 4.5.3 Vztah mezi suchou hmotností těla mláděte (s vyjmutým žloutkovým váčkem) a inkubační teplotou

Suchá hmotnost žloutku s teplotou stoupala, viz obr. 4.5.4. Pro zjištění rozdílů mezi inkubačními teplotami jsem z důvodu nedodržení předpokladu normálního rozložení dat použila neparametrický Kruskal-Wallisův test. Rozdíly mezi teplotami byly průkazné (KW: $H(2; n = 120) = 21,728; p < 0,001$). Průkazně se lišila teplota 35,5 °C od teplot 36 °C (neparametrický test mnohonásobného srovnání: $p = 0,013$) a 37 °C ($p < 0,001$).



Obr. 4.5.4 Vztah mezi suchou hmotností žloutkového váčku a inkubační teplotou

Abych odstranila vliv obsahu vody v těle mláděte, vztáhla jsem obsah tuku, proteinů a anorganických látek k suché hmotnosti těla a dále jsem s nimi pracovala jako s procentuálními obsahy v sušině.

Průměrný obsah tuku v tělesné sušině byl $27,88 \pm 0,279$ % ($n = 120$) a mezi teplotami se průkazně nelišil (ANOVA: $F(2; 117) = 0,295; p = 0,745$). Průměrný obsah proteinů byl $60,87 \pm 0,269$ % ($n = 120$) a mezi teplotami se také nelišil (ANOVA: $F(2; 117) = 1,845; p = 0,163$). Průměrný obsah anorganických látek byl $11,25 \pm 0,173$ % ($n = 120$) a mezi teplotami se lišil (ANOVA: $F(2; 117) = 3,440; p = 0,035$). Průkazně se lišila teplota 36 °C od teploty 37 °C (Tukey HSD: $p = 0,027$). Průměrné obsahy jednotlivých složek v sušině v závislosti na inkubační teplotě jsou uvedeny v tabulce 4.5.5.

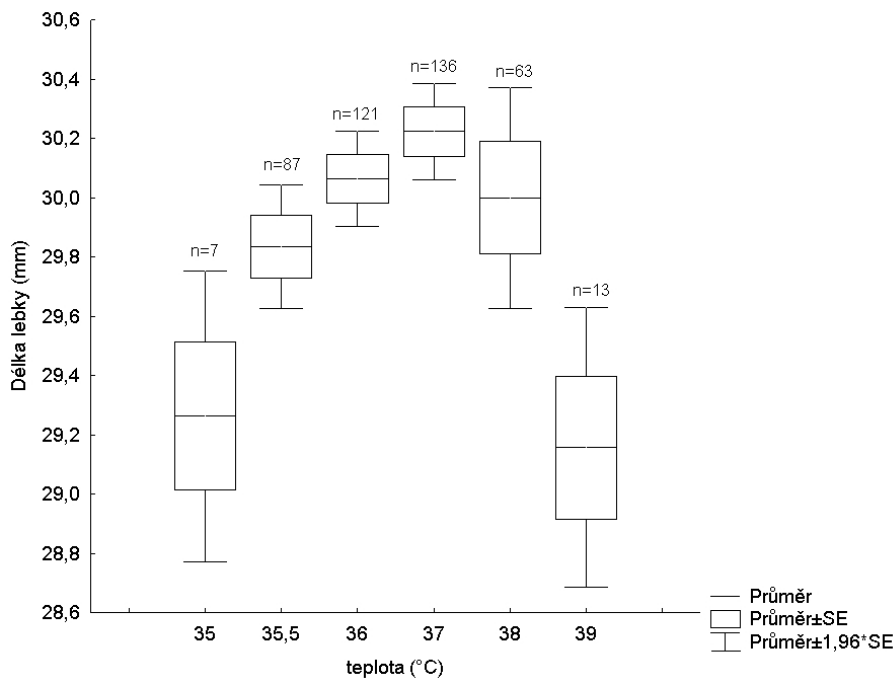
Tab. 4.5.5 Obsah tuků, proteinů a anorganických látek v těle mláděte v jednotlivých inkubačních teplotách. Údaje jsou uvedeny v procentech v sušině.

| teplota (°C) | proměnná | průměr ± SE | minimum | maximum | n |
|--------------|-------------------|---------------|---------|---------|----|
| 35,5 | tuk | 28,19 ± 0,404 | 21,93 | 34,07 | 40 |
| | proteiny | 60,54 ± 0,373 | 55,00 | 66,25 | 40 |
| | anorganické látky | 11,27 ± 0,230 | 7,66 | 14,18 | 40 |
| 36 | tuk | 27,75 ± 0,516 | 19,92 | 34,85 | 40 |
| | proteiny | 60,47 ± 0,517 | 54,29 | 68,93 | 40 |
| | anorganické látky | 11,79 ± 0,380 | 8,62 | 20,67 | 40 |
| 37 | tuk | 27,71 ± 0,528 | 15,57 | 33,42 | 40 |
| | proteiny | 61,59 ± 0,484 | 55,34 | 71,54 | 40 |
| | anorganické látky | 10,70 ± 0,249 | 7,01 | 13,54 | 40 |

Také jsem sledovala, jestli závisí procentuální obsah jednotlivých složek těla mláděte v jednotlivých inkubačních teplotách na hmotnosti vejce. Po zjištění neprůkaznosti interakcí mezi hmotností vejce a inkubační teplotou (všechna $p > 0,5$) jsem je z modelů odstranila a pro všechny výpočty jsem použila analýzu kovariance bez interakcí. Obsah vody a proteinů v těle mláděte na hmotnosti vejce nezávisel (ANCOVA: $F(1; 116) = 2,353$; $p = 0,128$, respektive $F(1; 116) = 1,405$; $p = 0,238$), zatímco obsah tuku na hmotnosti vejce závislý byl ($F(1; 116) = 4,475$; $p = 0,037$) a s hmotností vejce koreloval kladně ($r = 0,196$; $0,341$ a $0,043$ pro teploty $35,5$; 36 a 37 °C). Obsah anorganických látek byl na hmotnosti vejce závislý jen s marginální průkazností ($F(1; 116) = 3,011$; $p = 0,085$) a s rostoucí hmotností vejce koreloval záporně ($r = -0,159$; $-0,176$ a $-0,165$ pro teploty $35,5$; 36 a 37 °C).

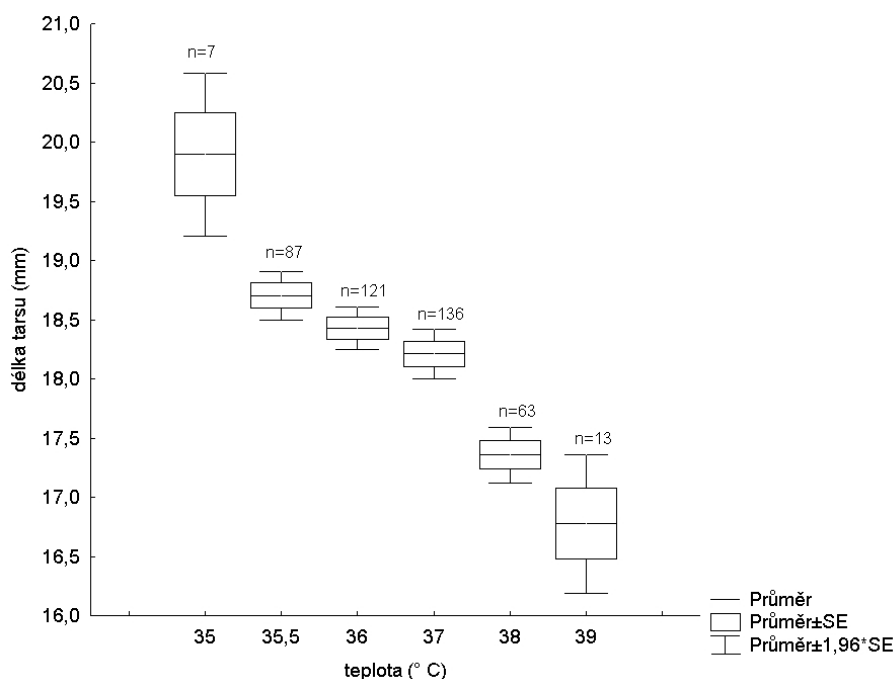
4.6 Strukturální rozměry mlád'at

Délku lebky jsem upravila odečtením délky „zobáku 2“ (viz kapitola Metodika), abych odstranila vliv variability v jeho rozměrech. Celkový průměr takto upravené délky lebky byl $30,02 \pm 0,052$ mm ($n = 427$). Průměrná délka lebky se mezi inkubačními teplotami lišila (ANOVA: $F(5; 421) = 4,091$; $p = 0,001$), přičemž největší byla pro teplotu 37 °C, ve vyšších i nižších teplotách byla lebka průměrně kratší, viz obr. 4.6.1. Průkazně se lišila inkubační teplota 39 °C od teplot 36 °C (Tukey HSD: $p = 0,036$) a 37 °C ($p = 0,006$).



Obr. 4.6.1 Vztah mezi délkou lebky s odečtenou délkou „zobáku 2“ (viz kapitola Metodika). Počet jedinců v každé teplotě je uveden u příslušného boxu.

Průměrná délka tarsu byla $18,23 \pm 0,058$ mm ($n = 427$) a s rostoucí teplotou klesala, jak ukazuje obrázek 4.6.2. Rozdíl mezi teplotami byl průkazný (ANOVA: $F(5; 421) = 20,633$; $p < 0,001$). Klesající trend zde byl velmi výrazný, průkazné rozdíly lze nalézt téměř mezi všemi teplotami, viz tabulka 4.6.3 s výsledky Tukey HSD testu.



Obr. 4.6.2 Vztah mezi délkou tarsu a inkubační teplotou. Počet jedinců v každé teplotě je uveden u příslušného boxu.

Tab. 4.6.3 Výsledky Tukey HSD testu pro délky tarsů. V tabulce jsou uvedeny p-hodnoty, průkazné rozdíly mezi teplotami jsou vyznačeny tučně.

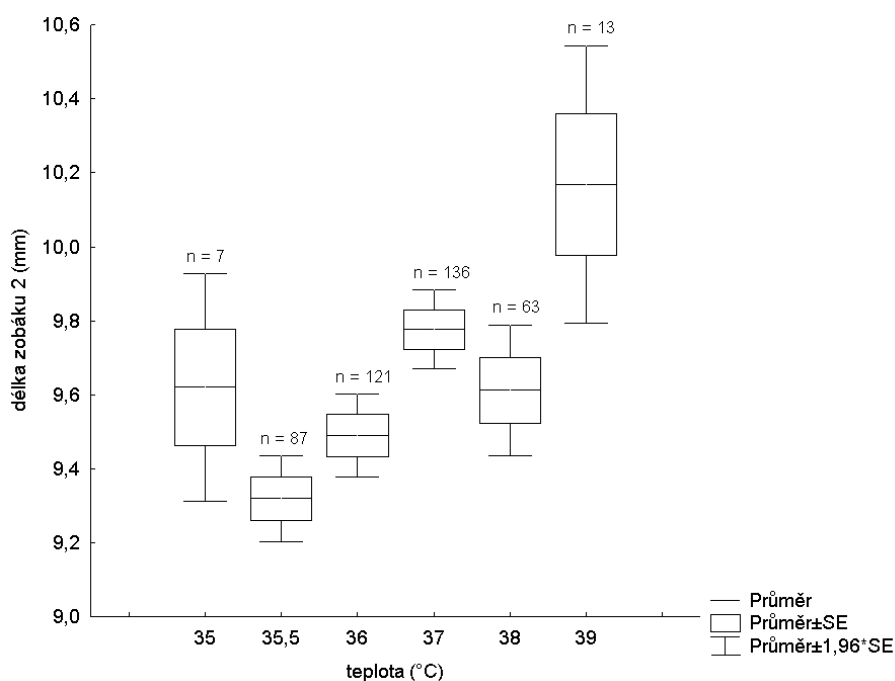
| teplota (°C) | 35 | 35,5 | 36 | 37 | 38 |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
| 35 | - | | | | |
| 35,5 | 0,054 | - | | | |
| 36 | 0,006 | 0,452 | - | | |
| 37 | 0,001 | 0,011 | 0,588 | - | |
| 38 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | - |
| 39 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | 0,478 |

Průměrná délka „zobáku 1“ (viz kapitola Metodika) byla $13,53 \pm 0,037$ mm ($n = 427$) a byla jediným měřeným strukturálním rozměrem, který se s teplotou se průkazně neměnil (ANOVA: $F(5; 421) = 0,260$; $p = 0,935$). Průměrné délky „zobáku 1“ v jednotlivých teplotách jsou uvedeny v tabulce 4.6.4.

Tab. 4.6.4 Délka „zobáku 1“ (viz kapitola Metodika) v jednotlivých teplotách. Údaje jsou uvedeny v milimetrech.

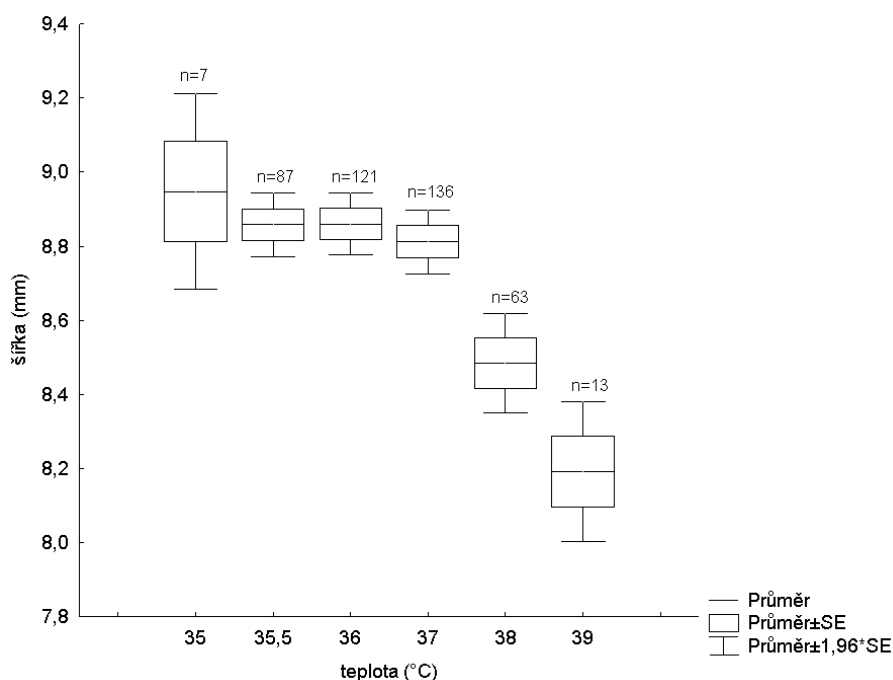
| teplota (°C) | průměr ± SE | minimum | maximum | n |
|--------------|---------------|---------|---------|-----|
| 35 | 13,61 ± 0,126 | 13,20 | 14,13 | 7 |
| 35,5 | 13,53 ± 0,080 | 11,75 | 15,13 | 87 |
| 36 | 13,47 ± 0,065 | 11,83 | 15,50 | 121 |
| 37 | 13,56 ± 0,072 | 11,00 | 17,09 | 136 |
| 38 | 13,57 ± 0,097 | 11,73 | 15,41 | 63 |
| 39 | 13,61 ± 0,226 | 12,72 | 15,52 | 13 |

Průměrná délka „zobáku 2“ (viz kapitola Metodika) byla $9,59 \pm 0,032$ mm ($n = 427$) a s teplotou se měnila způsobem, který ukazuje obrázek 4.6.5. Ve středních inkubačních teplotách zde průměrná délka „zobáku 2“ vykazovala podobný trend, jako délka lebky (viz obr. 4.6.1), v okrajových teplotách ovšem opět rostla. Rozdíly mezi inkubačními teplotami byly průkazné (ANOVA: $F(5; 421) = 8,421$; $p < 0,001$). Průkazně se lišila teplota 37 °C od teplot 35,5 °C (Tukey HSD: $p < 0,001$) a 36 °C ($p = 0,004$) a dále teplota 39 °C od teplot 35,5 °C ($p < 0,001$), 36 °C ($p = 0,003$) a 38 °C ($p = 0,043$).



Obr. 4.6.5 Vztah mezi délkou „zobáku 2“ (viz kapitola Metodika) a inkubační teplotou. Počet jedinců v každé teplotě je uveden u příslušného boxu.

Průměrná šířka zobáku byla $8,77 \pm 0,024$ mm ($n = 427$) a ve vyšších inkubačních teplotách (38 a 39 °C) klesala, zatímco ve středních a nižších teplotách zůstávala relativně neměnná, jak ukazuje obrázek 4.6.6. Rozdíly mezi inkubačními teplotami byly průkazné (ANOVA: $F(5; 421) = 10,126$; $p < 0,001$). Průkazně se lišila teplota 38 °C od teplot 35,5 °C (Tukey HSD: $p < 0,001$), 36 °C ($p < 0,001$) a 37 °C ($p < 0,001$) a dále pak teplota 39 °C od teplot 35 °C ($p = 0,010$), 35,5 °C ($p < 0,001$), 36 °C ($p < 0,001$) a 37 °C ($p < 0,001$).



Obr. 4.6.6 Vztah mezi šířkou zobáku a inkubační teplotou. Počet jedinců v každé teplotě je uveden u příslušného boxu.

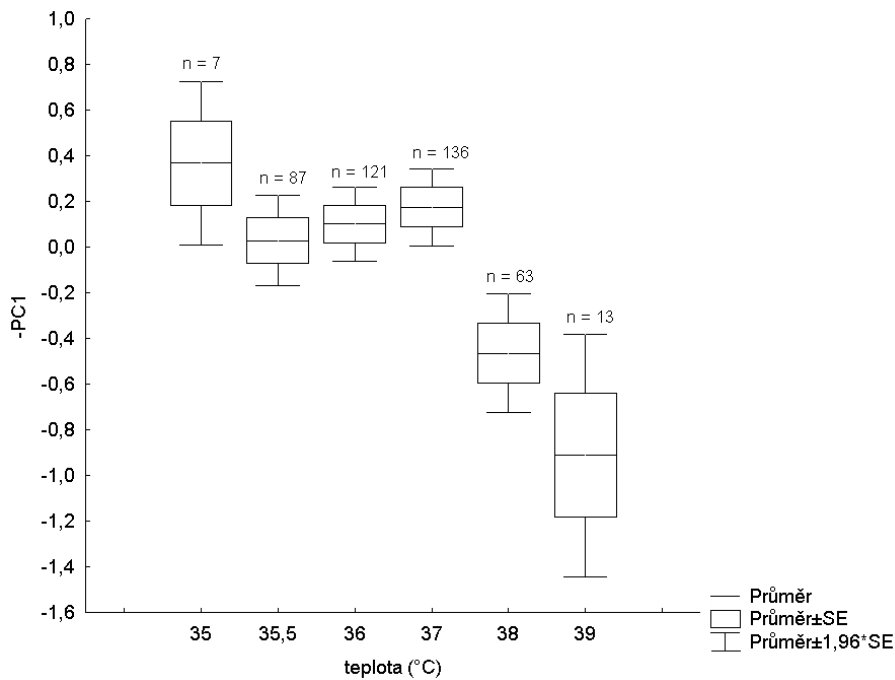
Pro určení variability ve strukturálních rozměrech mláďat jsem použila variační koeficient korigovaný počtem mláďat (viz kapitola Metodika). Sledovala jsem, zda je v některých inkubačních teplotách větší variabilita strukturálních rozměrů, než v jiných a také zda jsou některé rozměry celkově variabilnější. Proto jsem spočítala aritmetické průměry variabilit v jednotlivých teplotách i v jednotlivých rozměrech, viz tabulka 4.6.7. Nejmenší průměrná variabilita byla v teplotě 35 °C. Kromě nejnižšího průměru byla variabilita při této teplotě nejnižší i pro jednotlivé strukturální rozměry. Největší průměrná variabilita byla v teplotě 38 °C. Délka tarsu a „zobáku 1“ však vykazovala největší variabilitu v teplotě 37 °C. Ze strukturálních rozměrů vykazovala největší variabilitu délka „zobáku 2“, naopak nejméně variabilní byla délka lebky.

Tab. 4.6.7 Variační koeficient korigovaný počtem mláďat (viz kapitola Metodika) pro jednotlivé rozměry a inkubační teploty. „Lebka“ je délka lebky s odečtenou délkou „zobáku 2“ (viz kapitola Metodika). Variační koeficienty jsou uvedeny v procentech.

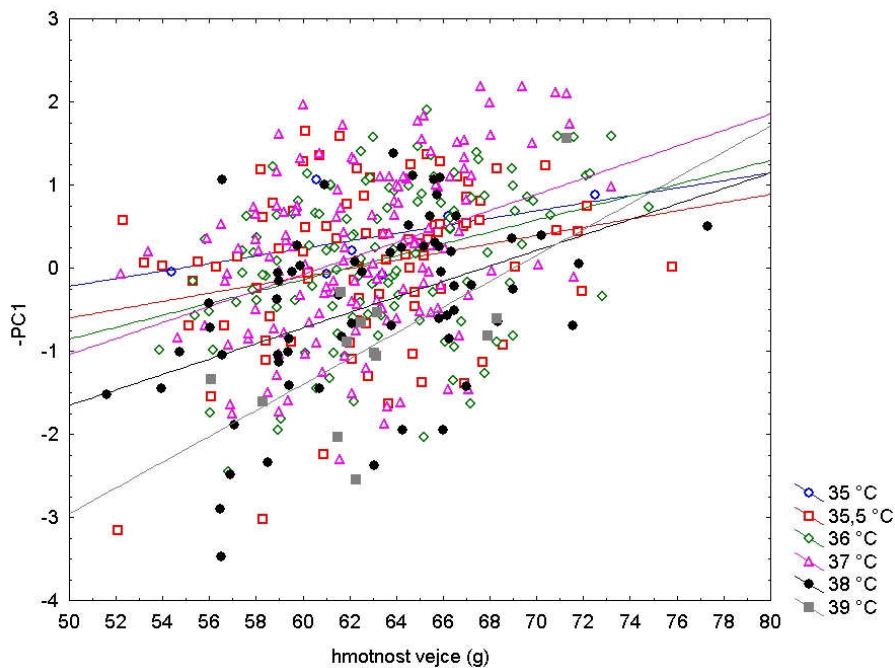
| teplota (°C)/rozměr | 35 | 35,5 | 36 | 37 | 38 | 39 | průměr |
|----------------------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|
| lebka | 2,342 | 3,341 | 3,020 | 3,225 | 5,040 | 3,040 | 3,335 |
| tarsus | 4,829 | 5,312 | 5,408 | 6,831 | 5,490 | 6,552 | 5,737 |
| zobák 1 | 2,534 | 5,518 | 5,323 | 6,169 | 5,715 | 6,099 | 5,226 |
| zobák 2 | 4,458 | 5,964 | 6,687 | 6,498 | 7,411 | 6,906 | 6,321 |
| zobák šířka | 4,124 | 4,595 | 5,265 | 5,848 | 6,421 | 4,308 | 5,093 |
| průměr | 3,657 | 5,635 | 5,793 | 6,369 | 6,716 | 6,048 | |
| n | 7 | 87 | 121 | 136 | 63 | 13 | |

K získání informace o celkové strukturální velikosti mláďate jsem použila PCA skóry z uvedených morfologických rozměrů: délka lebky s odečteným „zobákem 2“, délka „zobáku 2“, šířka zobáku a délka tarsu. První osa udávala celkovou velikost mláďat a vysvětlovala 54,92 % variability. Druhá osa udávala „tvar“ mláďat, tj. variabilitu v rozměrech, která zbyla po odfiltrování velikosti a vysvětlovala 19,27 % variability. Po vynesení strukturální velikosti (PC1) proti délce tarsu jsem zjistila, že tento vztah má klesající směr ($r = -0,75$), také vztah PC1 a šířky zobáku měl směr klesající ($r = -0,85$). Proto jsem všechny PC1 skóry vynásobila číslem -1, aby lépe ilustrovaly skutečnou velikost mláďat.

Sledovala jsem, jak závisí celková strukturální velikost mláďat (PC1) na hmotnosti vejce a inkubační teplotě. Použila jsem analýzu kovariance s interakcemi, interakce mezi hmotností vejce a inkubační teplotou se ale neprokázala (ANCOVA: $F(5; 415) = 0,992$; $p = 0,422$), proto jsem ji z modelu vyloučila. Celková velikost mláďat pak průkazně závisela na inkubační teplotě i na hmotnosti vejce (ANCOVA: $F(5; 420) = 7,575$; $p < 0,001$; respektive $F(1; 420) = 60,957$; $p < 0,001$). Průkazně se odlišovala inkubační teplota 38 °C od teplot 35,5 (Tukey HSD: $p = 0,013$), 36 ($p = 0,001$) a 37 °C ($p < 0,001$), dále pak teplota 39 °C od teplot 35 ($p = 0,032$), 35,5 ($p = 0,007$), 36 ($p = 0,002$) a 37 °C ($p = 0,001$). V těchto vyšších inkubačních teplotách se líhla mláďata celkově menší, viz obr. 4.6.8. V závislosti na hmotnosti vejce celková velikost mláďat stoupala, viz obr. 4.6.9.



Obr. 4.6.8 Závislost celkové strukturální velikosti mláděte (PC1) násobené číslem -1 na inkubační teplotě. Počet jedinců v každé teplotě je uveden u jednotlivých boxů.



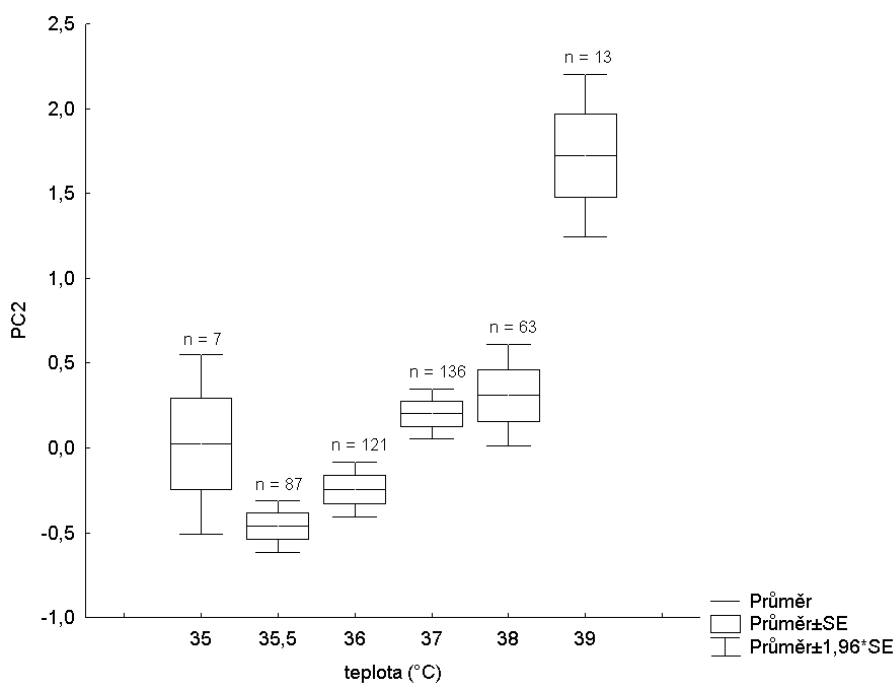
Obr. 4.6.9 Závislost celkové strukturální velikosti mláděte (PC1) násobené číslem -1 na hmotnosti vejce v jednotlivých inkubačních teplotách.

Průměrný „tvar“ mláděte (PC2) se mezi teplotami také průkazně lišil (ANOVA: $F(5; 421) = 18,289$; $p < 0,001$). Teploty, které se od sebe průkazně odlišovaly, jsou uvedené v tabulce 4.6.10. Průměrná hodnota „tvaru“ pro teplotu 39 °C byla výrazně vyšší, než pro ostatní

teploty (viz obr. 4.6.11) a odlišovala se od nich s vysokou průkazností (viz tab. 4.6.10). Průměrné hodnoty „tvaru“ pro ostatní teploty (kromě teploty 35 °C) také vykazovaly stoupající tendenci (viz obr 4.6.11).

Tab. 4.6.10 Výsledky Tukey HSD testu pro „tvar“ mlád'at (PC2). V tabulce jsou uvedeny p-hodnoty, průkazné rozdíly jsou vyznačeny tučně.

| teplota (°C) | 35 | 35,5 | 36 | 37 | 38 | 39 |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|----|
| 35 | - | | | | | |
| 35,5 | 0,757 | - | | | | |
| 36 | 0,975 | 0,536 | - | | | |
| 37 | 0,996 | < 0,001 | 0,001 | - | | |
| 38 | 0,969 | < 0,001 | 0,001 | 0,973 | - | |
| 39 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | - |



Obr. 4.6.11 Závislost celkového „tvaru“ mlád'at (PC2) na inkubační teplotě. Počet jedinců v každé teplotě je uveden u jednotlivých boxů.

4.7 Poměr pohlaví

Celkem se podařilo určit pohlaví u 412 vylíhlých kachen a u 171 nevlíhlých embryí. V inkubační teplotě 39 °C se podařilo určit pohlaví pouze u 7 jedinců z celkových 13 vylíhlých, navíc se jednalo pouze o samce. Proto jsem tuto teplotu z analýzy poměru pohlaví vyloučila.

Celkový poměr pohlaví vylíhlých i nevlíhlých mláďat byl 285 samic a 298 samců. Tento poměr se průkazně nelišil od předpokládaného poměru pohlaví 1:1 (Pearsonův chí-kvadrát test s Yatesovou korekcí: $\chi^2 = 0,104$; $df = 1$, $p = 0,747$). Mezi vylíhlými mláďaty bylo 207 samic a 205 samců, tento poměr se také nelišil od poměru 1:1 (Pearsonův chí-kvadrát test s Yatesovou korekcí: $\chi^2 = 0$; $df = 1$; $p = 1$). Mezi nevlíhlými mláďaty bylo 78 samic a 93 samců. Ani tento poměr se nelišil od poměru 1:1 (Pearsonův chí-kvadrát test s Yatesovou korekcí: $\chi^2 = 0,495$, $df = 1$, $p = 0,482$).

Poměry pohlaví mezi vylíhlými mláďaty v jednotlivých teplotách ukazuje tabulka 4.7.1. Pearsonův chí-kvadrát test neodhalil mezi inkubačními teplotami průkazné rozdíly: $\chi^2 = 3,920$; $df = 4$, $p = 0,417$).

Tab. 4.7.1 Počty samic a samců vylíhnuté v jednotlivých inkubačních teplotách

| teplota (°C)/pohlaví | 35 | 35,5 | 36 | 37 | 38 |
|----------------------|----|------|----|----|----|
| samice | 3 | 40 | 58 | 68 | 38 |
| samci | 4 | 46 | 63 | 68 | 24 |

Poměry pohlaví mezi nevlíhlými mláďaty (viz tab. 4.7.2) se mezi jednotlivými teplotami také průkazně nelišily (Pearsonův chí-kvadrát test: $\chi^2 = 4,088$, $df = 4$, $p = 0,394$).

Tab. 4.7.2 Počty nevlíhlých samic a samců v jednotlivých inkubačních teplotách

| teplota (°C)/pohlaví | 35 | 35,5 | 36 | 37 | 38 |
|----------------------|----|------|----|----|----|
| samice | 20 | 28 | 14 | 13 | 3 |
| samci | 14 | 44 | 19 | 13 | 3 |

Průměrná hmotnost vejce se samičím zárodkem (bez ohledu na to, zda se vylíhl, či ne) byla $62,78 \pm 0,268$ g. Průměrná hmotnost vejce se samčím zárodkem byla $62,84 \pm 0,263$ g. Průměrné hmotnosti vajec se mezi pohlavími nelišily (ANOVA: $F(1; 590) = 0,050$; $p = 0,822$).

Dále jsem sledovala, zda má pohlaví nějaký vliv na délku inkubace. Použila jsem dvoucestnou analýzu variance s interakcemi pro zjištění závislosti délky inkubace na pohlaví a inkubační teplotě. Interakce mezi inkubační teplotou a pohlavím se neprokázala (ANOVA: $F(4; 403) = 1,033$; $p = 0,390$), proto jsem ji z modelu odstranila. Délka inkubace pak s vysokou průkazností závisela na inkubační teplotě (podobně, jako ukazují výsledky výše) (ANOVA: $F(4; 407) = 249,893$; $p \ll 0,001$), ale na pohlaví mláděte nikoliv ($F(1; 407) = 1,226$; $p = 0,269$).

5. Diskuse

5.1 Délka inkubace a líhivost

Průměrná délka inkubace přes všechny inkubační teploty byla $29,1 \pm 0,11$ dne ($n = 427$). Délka inkubace pozorovaná u kachny divoké v přírodě je kratší, obvykle 24 – 26 dní (Caldwell a Cornwell 1975; Feldheim 1997). Těchto hodnot bylo dosaženo jen ve vyšších inkubačních teplotách, 38 a 39 °C, kde byla průměrná délka inkubace $25,9 \pm 0,16$ dne ($n = 63$), respektive $25,9 \pm 0,25$ dne ($n = 13$). Caldwell a Cornwell (1975) přitom ve své práci uvádějí průměrnou teplotu přirozeně inkubovaných vajec 36,3 °C ($n = 1655$). V této inkubační teplotě byla v mém experimentu průměrná délka inkubace o 4 dny delší ($30,1 \pm 0,11$ dne; $n = 121$). Wells-Berlin et al. (2005) ve své práci inkubovali vejce kachny divoké uměle v inkubátoru při teplotách 37,5 °C a 38,3 °C. Průměrná délka inkubace zde byla 25,0 dne pro teplotu 37,5 °C ($n = 32$) a 24,0 dne pro teplotu 38,3 °C ($n = 4$), což je stále kratší doba inkubace, než v případě mé práce a více se přibližuje hodnotám zjištěným v terénu. Také Prince et al. (1969), kteří inkubovali vejce v umělých podmínkách a větším rozsahu inkubačních teplot (35,6 - 39,4 °C), uvádějí délku inkubace o 2 - 4 dny kratší. Celkový trend zkracování délky inkubace s rostoucí inkubační teplotou jsem však pozorovala v souladu s pracemi Hepp et al. (2006) – studie na kachničce karolínské, Prince et al. (1969) – studie na kachně divoké a Wells-Berlin et al. (2005) – studie na kachně divoké, kopřivce obecné (*Anas strepera*), čírce modrokřídlé (*Anas discors*) a lžičákovi pestrém (*Anas clypeata*). Délka inkubace v inkubační teplotě 39 °C se nelišila od teploty 38 °C. Je možné, že v takto vysokých teplotách už vývoj zárodku naráží na fyziologické limity a již nemůže probíhat rychleji. Také úmrtnost zárodků v teplotě 39 °C rapidně vzrostla.

Je možné, že delší dobu inkubace způsobil nedostatek vzájemného kontaktu vajec, který jsem v inkubátoru nemohla nijak ovlivnit. Kontakt vajec vede k lepší zvukové komunikaci mezi vyvíjejícími se mláďaty, která tak mohou synchronizovat líhnutí, jak zjistili Persson a Andersson (1999) u kachen divokých a bažantů obecných (*Phasianus colchicus*) nebo Woolf et al. (1976) u křepelek japonských (*Coturnix japonica*). Navíc trvalo relativně dlouho, než se vylíhla všechna vejce z jednoho inkubátoru, v průměru 3 - 4 dny. Caldwell a Cornwell (1975) uvádí interval mezi vylíhnutím prvního a posledního vejce v přirozené snůšce 6 - 10 hodin, nutno ovšem vzít v úvahu, že v přirozené snůšce je přibližně 10 vajec, zatímco v inkubátorech jich bylo celkem 46. V mém experimentu mohlo ale také docházet ke zpoždění později se líhnoucích mláďat z důvodu nedostatku zvukových podnětů od již

vylíhnutých mládřat, která byla z inkubátoru vyjmuta do dvanácti hodin od vylíhnutí a v neposlední řadě zde chyběla přirozená akustická komunikace líhnoucích se mládřat s matkou (Abraham 1974; Dmitrieva a Gottlieb 1994). Použitá umělá líheň měla zdroj tepla ve svém středu, je tedy možné, že na okrajích inkubátoru byla o něco nižší teplota. Čidlo dataloggeru, které jsem do inkubátoru umisťovala, bylo také spíše ve středu, takže nemohlo zaznamenat případný pokles teploty na okrajích. Vejce nebyla v průběhu inkubace mezi okrajem a prostředkem vyměňována, na rozdíl od vajec v přírodním hnízdě, která samice přeskupuje (Caldwell a Cornwell 1975).

Kromě data a času vylíhnutí jsem také sledovala datum a čas prvního naklování vejce. Průměrný interval mezi naklováním a vylíhnutím ve všech sledovaných teplotách byla 29,5 hodiny, což souhlasí s výsledky práce Caldwell a Cornwella (1975), kteří uvádějí interval 24 – 36 hodin pro přirozeně inkubovaná vejce. Prince et al. (1969) uvádějí podobné výsledky pro vejce uměle inkubovaná ve více inkubačních teplotách, přičemž nejdelší průměrný interval mezi naklováním a vylíhnutím sledovali v teplotě 37,5 °C (48,5 h) a naopak nejkratší průměrný interval v teplotě 38,3 °C (30,8 h). Mnou zjištěné výsledky jsou podobné, i když průměrné intervaly jsou kratší: nejdelší průměrný interval jsem pozorovala v teplotě 37 °C (34,1 h) a nejkratší v teplotě 38 °C (21,6 h). Do procesu líhnutí jsem nezasahovala, mládřata, která se nedokázala sama vylíhnout, jsem označila za uhynulé, ačkoliv vejce již bylo naklováno, na rozdíl od Hepp et al. (2006), kteří mládě hned po naklování vyjímali ze skořápky. Sice jsem tím zmenšila velikost experimentálního souboru o několik jedinců, převážně z nízkých inkubačních teplot, ale získala jsem cenná data.

Sledovaný vliv hmotnosti vejce na délku inkubace se mi nepodařilo prokázat, ale ve vyšších inkubačních teplotách (38 a 39 °C) se objevil mírný vzestup sklonu regresní přímky mezi délkou inkubace a hmotností vejce, ačkoliv tento vzestup nebyl statisticky průkazný. Znamená to, že se v těchto teplotách těžší vejce líhla relativně později a délka jejich inkubace se více blížila teplotě 37 °C. V nižších inkubačních teplotách nevysvětlovala hmotnost vejce téměř žádnou variabilitu v délce inkubace. V teplotách 38 a 39 °C vysvětlovala 10, respektive 30 % variability. MacCluskie et al. (1997) ve své práci sledovali vliv objemu vejce kachny divoké na délku inkubace a nenašli žádný vztah. Svůj experiment ovšem prováděli pouze v teplotě 37,5 °C. Martin a Arnold (1991) v podobné studii o křepelkách japonských zjistili slabou závislost mezi hmotností vejce a délkou inkubace, přičemž těžší vejce se líhla později. I zde ovšem autoři pracovali pouze s jednou inkubační teplotou. Domnívám se, že by delší doba inkubace pro těžší vejce ve vyšších teplotách mohla souviset s rychlostí metabolismu vyvíjejících se embryí. Menší vejce mají větší povrch ku objemu a tím i větší tepelnou

vodivost (Rahn a Ar 1974), což může zvýšit rychlost metabolismu vyvíjejícímu se zárodku (Boonstra et al. 2010). Menší vejce bývají často ta, která jsou nakladena později (Boonstra et al. 2009). Současně mohou mít embrya z později nakladených vajec rychlejší metabolismus, díky kterému v přirozených podmínkách mohou dohnat vývoj dříve nakladených vajec (Boonstra et al. 2010). Pokud by tedy embrya v lehčích vejcích měla rychlejší metabolismus, mohla by snadněji reagovat na zvýšení teploty zrychlením vývoje. Těžší vejce s embryi s hypoteticky pomalejším metabolismem by nemohla na zvýšení teploty reagovat v takové míře, navíc objemnější vejce by se mělo hůře zahřívat (Rahn a Ar 1974). Otázkou zůstává, jestli by to mělo nějaký vliv v umělých podmínkách, kde se teplota téměř nemění, na rozdíl od přirozené inkubace. V případě, že by uvedená hypotéza platila, by ale prodloužení doby inkubace bylo patrné spíše u mláďat z nižších inkubačních teplot. Také vliv objemu vejce na rychlost metabolismu zárodku ještě není dostatečně prozkoumán. Například MacCluskie et al. (1997) ho ve své práci neprokázali.

Nejvyšší líhnivost jsem pozorovala v inkubační teplotě 37 °C, v nižších i vyšších inkubačních teplotách líhnivost klesala, podobně jako u kachen divokých (Prince et al. 1969) nebo u kachniček karolínských (DuRant et al. 2010). Očekávala jsem, že se v okolí této inkubační teploty bude pohybovat teplotní optimum pro vývoj embryí. Caldwell a Cornwell (1975) sice uvádí průměrnou teplotu vajec inkubovaných v přírodě nižší, ale v případě umělé inkubace kachních vajec se obvykle používá teplota přibližně 37,5 °C (Persson a Andersson 1999; Wells-Berlin et al. 2005).

Pomocí mnohonásobné logistické regrese jsem zjistila, že pravděpodobnost vylíhnutí vejce je závislá na inkubační teplotě i na hmotnosti vejce. Nižší líhnivost menších vajec uvádí také Martin a Arnold (1991) u křepelek japonských.

V nízkých inkubačních teplotách u mláďat vzrůstal počet různých vývojových vad, jednalo se hlavně o malformity patního kloubu. Dále se některá mláďata vylíhla s nezataženým žlutkovým váčkem nebo měla problémy s motorikou. Tyto vývojové vady jsem sledovala pouze v roce 2009, takže nemohu říct, jestli jejich četnost rostla i v inkubační teplotě 39 °C, kterou jsem v roce 2009 pro experiment nepoužila. Rozhodně ale snižují počet úspěšně vyvedených mláďat, protože je zřejmé, že vývojové vady neumožňují přežití mláděte po delší dobu. Při odebrání vzorků pro analýzu DNA jsem si také všimla, že část mláďat, která uhynula těsně před vylíhnutím, měla špatně vyvinutý patní kloub. Bohužel jsem tento jev zaregistrovala až ke konci svého výzkumu, takže nemohu učinit žádný závěr. Vrozené vady a onemocnění končetin jsou studovány hlavně u kura domácího z důvodu jeho významu

v produkci potravin, například v práci (LeBihanDuval et al. 1997). U ostatních druhů se tímto problémem autoři vědeckých prací detailně nezabývají.

Prince et al. (1969) kromě inkubační teploty sledovali i vzdušnou vlhkost v inkubátorech a zjistili, že se vejce z nižších vlhkostí při stejné inkubační teplotě líhla dřív. V mé práci jsem vzdušnou vlhkost v inkubátoru sice měřila, ale nemanipulovala jsem s ní. Z údajů sbíraných dataloggerem každých 10 minut jsem vytvořila průměr pro každý inkubátor. Průměrně se vlhkost pohybovala mezi 42 a 52 % pro všechny zahrnuté inkubační teploty, rozdíly v průměrech mezi teplotami jsem testovala analýzou variance, která neodhalila průkazné rozdíly ($F(4; 7) = 0,804$; $p = 0,560$; $n = 12$). Tato vzdušná vlhkost je však nižší, než 70 %, při kterých inkubovali vejce několika druhů kachnovitých (*Anatidae*) autoři Wells-Berlin et al. (2005). Domnívala jsem se, že by tento fakt mohl vysvětlovat relativně delší délky inkubace v mé práci. Avšak Prince et al. (1969) uvádějí, že délka inkubace u kachen divokých byla kratší pro vzdušnou vlhkost 35 %, než pro 85 %.

5.2 Hmotnost mlád'at a žloutkových váčků

Hmotnost vylíhlých mlád'at nebyla závislá na inkubační teplotě. Ke stejnému závěru došli Prince et al. (1969). V případě, že jsem jako kovariátu použila hmotnost vejce, se také žádná závislost hmotnosti mláděte na inkubační teplotě neprojevila, což je v rozporu s výsledky Hepp, et al. (2006); Göth (2007) a Eiby a Booth (2009), kteří zjistili, že se v nižších inkubačních teplotách líhla mlád'ata celkově lehčí.

Závislost hmotnosti mláděte na hmotnosti vejce byla naopak průkazná, což je v souladu s výsledky řady publikovaných vědeckých prací (Williams 1994). S rostoucí inkubační teplotou procento variability v hmotnosti mláděte vysvětlené hmotností vejce klesalo, od 82,9 % v inkubační teplotě 35 °C až k pouhým 5 % v teplotě 39 °C. Znamená to, že v nižších inkubačních teplotách má hmotnost vejce na hmotnost mláděte silnější vliv. Z obrázku 4.3.2 v kapitole Výsledky je patrné, že i když je změna sklonu regresní přímky pro teplotu 39 °C neprůkazná, jistá odlišnost tam existuje. Nutno vzít v potaz, že v inkubační teplotě 39 °C se vylíhlo jen 13 mlád'at. Kdyby byl počet pozorování v této teplotě vyšší, mohla bych dojít k jednoznačnějšímu závěru.

Ačkoliv největší líhivost byla v teplotě 37 °C, největší tělesnou kondici mlád'at jsem pozorovala v inkubační teplotě 38 °C. Také DuRant et al. (2010) uvádí vyšší tělesnou kondici ve vyšších inkubačních teplotách. Tělesná kondice mlád'at průkazně závisela kromě inkubační

teploty také na hmotnosti vejce. Největší procento variability v kondici vysvětlené hmotností vejce bylo v inkubační teplotě 35 °C (81,1 %), s rostoucí teplotou pak procento vysvětlené variability klesalo. V teplotě 38 °C, kde byla průměrná kondice nejvyšší, bylo hmotností vejce vysvětleno 39,9 % její variability, ale v teplotě 39 °C již to bylo pouze 1,3 %.

Z každé z inkubačních teplot 35,5, 36 a 37 °C jsem použila 40 mláďat pro analýzu hmotnosti reziduálního žloutkového vřáku a základního chemického složení řtěla mláďete. Vyjmutím žloutkového vřáku se hmotnost mláďete rozdělila na dvě řásti, které byly, na rozdíl od celkové hmotnosti, závislé na inkubační teplotě. Hmotnost žloutkového vřáku s teplotou stoupala. Hmotnost vlastního řtěla mláďete se mezi inkubačními teplotami 35,5 a 36 °C neliřila, ale v teplotě 37 °C byla nižří. Vztah mezi hmotností řtěla mláďete a teplotou byl ovšem na hranici průkaznosti. Yalcin et al. (2008b) sledovali vliv krátkodobého zvýření inkubační teploty v průběhu inkubace na různé řtělesné parametry domácích kuřat. Ve zvýřené inkubační teplotě sice zjistili vyšří průměrnou hmotnost žloutkového vřáku, ale současně i mírně zvýřenou průměrnou hmotnost řtěla bez žloutkového vřáku. Také Boonstra et al. (2010) uvádějí, že mláďata berneřky velké (*Branta canadensis maxima*) s těžřším žloutkovým vřákem měla současně i těžřší vlastní řtělo bez žloutkového vřáku. Tato závislost byla ovšem na hranici průkaznosti ($p = 0,057$). Eiby a Booth (2009) oproti tomu ve své práci na tabonovi lesním (*Alectura lathami*) uvádějí, v souladu s mými výsledky, že s rostoucí inkubační teplotou současně roste hmotnost reziduálního žloutkového vřáku a klesá hmotnost vlastního řtěla mláďete. Tato práce je ovšem ojedinělá, navíc řtěled tabonovitých má mezi ptáky, co se týče způsobu inkubace, zvlářtní postavení. Vejce nejsou inkubována přímým kontaktem s řtělem rodiče, ale teplem z různých vněřjších zdrojů (např. rozkládající se rostlinný materiál), tudíž jejich teplota nemůže být rodiči tak přesně ovlivňována. Embrya jsou proto odolněřší vůči teplotním výkyvům a obecně mají nižří teplotní optimum pro inkubaci, než ostatní ptáci (Booth a Jones 2002). K podobným výsledkům docházejí také vědci pracující na plazech, například Lin et al. (2005), kteří zkoumali vliv inkubační teploty na fenotyp mláďat ploskolebce nosorohého (*Deinagkistrodon acutus*) z řtěledi zmijovitých (*Viperidae*). Zjistili, že se ve vyšřích inkubačních teplotách líhnou mláďata s těžřším žloutkovým vřákem a současně s lehčím vlastním řtělem. Tato mláďata byla také strukturálně menří, autoři to vysvětlují tím, že z vysokých inkubačních teplot se mláďata líhla celkově méně vyvinutá.

Yalcin et al. (2008b) se ve své práci zabývali vlivem stáří matky na hmotnost řtěchto dvou složek mláďat. Z jejich výsledků vyplývá, že mladří samice měly celkově lehčí mláďata, také žloutkový vřáek i řtělo mláďat bylo lehčí. Oproti tomu Bogdanova et al. (2006) uvádějí, že mladří samice snářely strukturálně menří vejce, ze kterých se líhla menří, ale ne lehčí

mlád'ata. Ve své práci jsem bohužel neměla možnost zjistit příslušnost samice ke snůšce, takže je možné, že by například zmíněný věk samice mohl vysvětlit další variabilitu ve sledovaných proměnných. Když samice vytváří přirozenou snůšku, může mít pořadí naklazení vejce vliv na hmotnost reziduálního žloutkového váčku, jak zjistili Boonstra et al. (2010) ve své práci na bernešce velké. Uvádějí, že mlád'ata z dříve naklazených vajec se líhnou s těžším žloutkovým váčkem.

V mé práci byl průměrný relativní podíl reziduálního žloutkového váčku v těle mláděte $9,3 \pm 0,4 \%$, což je sice méně, než $18 \pm 7 \%$, které uvádí Vleck a Vleck (1996) ex Prinzinger et al. (1997) jako typické pro prekociální ptáky, ale nutno vzít v potaz, že inkubační teplota $35,5$ a pravděpodobně i 36 °C jsou pro kachnu divokou suboptimální. V inkubační teplotě 37 °C byl průměrný podíl žloutkového váčku $11,3 \pm 0,7 \%$ a předpokládám, že v teplotě 38 °C by mohl být ještě vyšší. S rostoucí inkubační teplotou tedy relativní podíl reziduálního žloutkového váčku v hmotnosti mláděte stoupal. Tento trend by se dal vysvětlit dvěma způsoby: ve vyšších inkubačních teplotách může embryo mít pomalejší metabolismus díky nižším nárokům na termoregulaci a tudíž nepotřebuje tolik energie ze žloutku (Olso et al. 2006) nebo může být hlavním vysvětlujícím faktorem délka inkubace. Ta totiž s rostoucí inkubační teplotou klesá, embryo má tudíž méně času na to, aby spotřebovávalo žloutek. V případě mého experimentu relativní podíl žloutkového váčku sice na délce inkubace průkazně závislý nebyl, ale nízká p-hodnota (0,098) ukazuje, že zde jistý vztah může existovat. Bohužel se mi nepodařilo najít práci, která by se tímto vztahem u ptáků zabývala.

Hmotnost reziduálního žloutkového váčku byla sice v jednotlivých inkubačních teplotách závislá na hmotnosti vejce, ale tento vztah nebyl tak těsný, jako v případě závislosti hmotnosti vlastního těla na hmotnosti vejce (viz obr. 4.3.5 a 4.3.7 v kapitole Výsledky). K podobnému výsledku dospěli Eiby a Booth (2009), když zjistili, že hmotnost vlastního těla mlád'at tabona lesního byla na hmotnosti vejce závislá s větší průkazností ($p < 0,001$), než hmotnost reziduálního žloutkového váčku ($p = 0,066$). Dzialowski a Sotherland (2004) oproti tomu u emu hnědého (*Dromaius novaehollandiae*) závislost hmotnosti žloutkového váčku na hmotnosti vejce prokázali, stejně jako závislost hmotnosti vlastního těla mláděte, s vysokou průkazností ($p \leq 0,001$). Závislost reziduálního žloutkového váčku na hmotnosti vejce prokázali i Reidy et al. (1998). Sledovali také závislost hmotnosti celého krocaního mláděte (*Meleagris gallopavo f. domestica*) na hmotnosti vejce. Bohužel, hmotnost vlastního těla mláděte do analýzy nezahrnuli. Předpokládali totiž, že počáteční investice do velkého vejce zajistí mláděti při vylíhnutí hlavně velké energetické rezervy v podobě žloutkového váčku.

Mé výsledky podporují spíše opačnou hypotézu, a to že počáteční investice do velkého vejce zajistí mláděti hlavně velké tělo.

5.3 Strukturální rozměry mlád'at

Obě měřené délky zobáků vykazovaly velkou variabilitu. Délka „zobáku 1“ nebyla na inkubační teplotě závislá vůbec, v případě délky „zobáku 2“ sice byly mezi teplotami průkazné rozdíly, ale celkově se nejednalo o žádný trend. Oproti tomu šířka zobáku měla variabilitu relativně malou a silněji reagovala na inkubační teplotu. V nižších inkubačních teplotách se prakticky neměnila, v teplotách 38 a 39 °C byly zobáky užší. Šířka zobáku u ptáků se v okamžiku vylíhnutí blíží svému rozměru v dospělosti více, než délka zobáku (Gille a Salomon 1999). To naznačuje, že mlád'ata ve vysokých inkubačních teplotách se líhnou méně vyvinutá. Práci, která by k takovému závěru dospěla u ptáků, se mi bohužel nepodařilo nalézt, ale Lin et al. (2005) došli ke stejnému závěru v případě ploskolebce nosorohého. Variabilní délka zobáku má tak větší prostor na to, aby dosáhla délky obvyklé v dospělosti, zatímco šířka zobáku je ovlivněna velikostí mozku a z ní vyplývající šířky lebky (Caccamise 1980).

Šířku lebky jsem bohužel neměřila, takže nemohu ověřit, zda korelovala s šířkou zobáku. Délka lebky měla své maximum v inkubační teplotě 37 °C, kde byla současně největší líhnivost a spolu s ní klesala směrem k nižším, i vyšším teplotám. Také délka lebky koreluje s velikostí mozku, ale ne tak významně, jako její šířka, tj. šířka mozkovny (Caccamise 1980). Ale vzhledem k tomu, že ve vysokých inkubačních teplotách se vyskytuje současně kratší lebka a užší zobák, je pravděpodobné, že i mozkovna bude nejmenší. Největší by pak měla být v prostředních teplotách, 36 a 37 °C, kde se vyskytuje širší zobák a délka lebky je současně největší. V tomto rozmezí se také pohybuje obvyklá inkubační teplota kachny divoké (viz výše). Bohužel jsem nenašla práci, který by dostatečně vysvětlovala růst lebky v nízkých inkubačních teplotách a objasnila tak, proč byla lebka v těchto teplotách průměrně kratší. Předpokládám, že růst lebky je složitější, než růst zobáku nebo tarsu, které rostou převážně do délky. Lebka je oproti nim „více trojrozměrný“ útvar a v jejím prodloužení bude nejspíš hrát roli více faktorů, než v prodloužení tarsu. Také mnou zjištěná variabilita v rozměrech lebky v jednotlivých inkubačních teplotách byla nízká, z měřených strukturálních rozměrů vůbec nejnižší.

Délka tarsu s rostoucí teplotou klesala. Možné vysvětlení tohoto efektu je již výše zmíněná nižší vyvinutost mláďat ve vysokých inkubačních teplotách. Pro mláďata kachen, která jsou prekociální a nidifugní, je mobilita klíčová (Anderson a Alisauskas 2001). Proto se domnívám, že selekce upřednostňuje mláďata s delším tarsem. Pokud má zárodek více času na vývoj, tarsus stihne více vyrůst. V nižších inkubačních teplotách je ale zárodek limitovaný fyziologickými omezeními, takže ačkoliv se líhnou mláďata s delším tarsem, je to na úkor počtu úspěšně vylíhnutých jedinců. Göth a Booth (2005) ovšem uvádí, že mezi délkou tarsu a inkubační teplotou žádná závislost není, Yalcin a Siegel (2003) neprokázali rozdíl v délce tarsu mezi periodicky chlazenými, periodicky ohříványými a ve stabilních podmínkách inkubovanými domácími kuřaty a Hammond et al. (2007) dokonce u domácích kuřat zjistili větší průměrnou délku tarsu ve vyšší inkubační teplotě, což by naznačovalo vyšší rychlost vývoje ve vyšších inkubačních teplotách. Polovintseva a Suleimanov (2008) srovnávali růst kostí nohy u zárodků domácích kuřat ve stabilních a měnících se teplotních podmínkách. Zjistili, že měnící se inkubační teplota (klesající vždy po několika dnech v průběhu inkubace) zrychlí metabolismus mláďat, která se pak líhla s delšími kostmi nohy a zároveň byla aktivnější. Tento výsledek podporuje hypotézu, že s vyšší rychlostí metabolismu dochází k rychlejšímu růstu. Otázkou ovšem zůstává, při jakých podmínkách dojde ke zrychlení metabolismu. V případě této práce to bylo při nestabilních podmínkách, v práci Hammond et al. (2007) to byla vyšší inkubační teplota. Výsledky mé práce (viz dále) spíše naznačují, že se rychlost růstu s inkubační teplotou neměnila. Olson et al. (2006) uvádějí, že periodicky ochlazovaná embrya zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) měla rychlejší metabolismus a větší spotřebu žloutku, než embrya v konstantní inkubační teplotě. Současně ale pomaleji rostla. Spotřeba energie ze žloutku na termoregulaci zde není příliš pravděpodobná, protože se jedná o altriciální ptáky, u kterých není termoregulace v embryonální fázi ještě vyvinuta (Olson et al. 2006).

Je možné, že klesající délka tarsů ovlivnila můj odhad tělesné kondice mláděte. DuRant et al. (2010) odhadovali tělesnou kondici jako reziduály vztahu mezi délkou tarsu a hmotností mláděte, ovšem v jejich případě nebyla délka tarsu na inkubační teplotě závislá. V mé práci nebyla hmotnost mláděte závislá na inkubační teplotě, zatímco délka tarsu ano, proto by se nabízel závěr, že tělesná kondice odhadnutá podle DuRant et al. (2010) by měla být nejvyšší v inkubační teplotě s nejkratší průměrnou délkou tarsu. To byla teplota 39 °C. Mnou odhadovaná tělesná kondice byla přesto nejvyšší v teplotě 38 °C, v teplotě 39 °C byla nižší. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že ačkoli hmotnost celého mláděte nebyla na inkubační teplotě průkazně závislá, malé rozdíly ve hmotnosti mezi teplotami existovaly.

Celková strukturální velikost, vyjádřená jako PC skóry ze čtyř strukturálních rozměrů (viz kapitola Výsledky) s inkubační teplotou klesala, přičemž největší pokles byl v teplotách 38 a 39 °C. K podobnému výsledku dospěli u tabonů lesních Eiby a Booth (2009), když vytvořili PC skóry z následujících rozměrů: délka lebky, délka tarsu, délka třetího prstu a délka prostředního drápu.

Celková velikost (PC1) rostla s hmotností vejce, z těžších vajec se tedy líhla mláďata nejen těžší, ale také strukturálně větší, což je výhodné pro další růst a přežívání (Slattery a Alisauskas 1995; Anderson a Alisauskas 2001). Je tedy zřejmé, že investice matky do vejce je pro úspěšnou reprodukci klíčová.

Celkový „tvar“ mláďat (PC2) se s inkubační teplotou také měnil a byl výrazně odlišný pro teplotu 39 °C. Mohlo to být způsobeno tím, že v této inkubační teplotě byly všechny měřené rozměry malé, kromě délky „zobáku 2“, která zde naopak měla svůj nejvyšší průměr. Zatímco rozměry mláďat v ostatních teplotách se navzájem doplňují, v teplotě 39 °C se líhla mláďata celkově malá, avšak s dlouhým, úzkým zobákem. Nedomnívám se, že by se jednalo o nějakou adaptaci, ačkoliv větší délka zobáku může být pro mláďata prekociálních ptáků důležitá pro lepší získávání potravy (Gille a Salomon 1999).

5.4 Chemické složení

Obsah vody ve vlastním těle mláděte a v reziduálním žloutkovém váčku

S rostoucí inkubační teplotou současně stoupal procentuální podíl vody ve vlastním těle mláděte a klesal podíl vody v reziduálním žloutkovém váčku. Nabízelo by se proto vysvětlení, že se s rostoucí inkubační teplotou přesunuje více vody ze žloutku do těla mláděte. Průměrný obsah vody ve žloutku je 47,5 %, zatímco průměrný obsah vody v bílku je 88,5 % (Burley a Vadhera (1989) ex Deeming (2002c)). Mnou zjištěný průměrný obsah vody v reziduálním žloutkovém váčku byl $46,19 \pm 0,416$ %, což je údaj srovnatelný se stavem na počátku inkubace. Také hmotnost vody ve vlastním těle mláděte nebyla závislá na hmotnosti vody ve žloutkovém váčku. Pravděpodobně se tedy nejednalo o pouhý přesun vody ze žloutku do těla mláděte, spíše se na obsahu vody v těle mláděte podílel bílek. Jak uvádí Finkler et al. (1998), množství bílku ve vejci má vliv na obsah vody v těle mláděte i ve žloutkovém váčku. Eiby a Booth (2009), kteří sledovali chemické složení mláďat tabonů lesních ve třech různých inkubačních teplotách neprokázali žádný vztah mezi teplotou a obsahem vody v reziduálním

žloutkovém váčku nebo ve vlastním těle mláděte. Hepp et al. (2006) ve své práci prokázali s rostoucí inkubační teplotou mírný vzestup obsahu vody v celém mláděti kachničky karolínské. Tito autoři bohužel nerozdělovali mládě na žloutkový váček a tělo, takže nelze určit, v jaké z těchto dvou složek obsah vody ve skutečnosti stoupal.

Z uvedených výsledků vyplývá, že obsah vody v obou složkách mláděte se s inkubační teplotou měnil opačným směrem, než mokrá hmotnost těchto složek. Suchá hmotnost žloutkového váčku i vlastního těla se naopak měnila souběžně s mokrou hmotností. Znamená to, že vliv obsahu vody na hmotnost obou složek byl zanedbatelný.

Obsah tuku, proteinů a anorganických látek ve vlastním těle mláděte

Obsah tuku v těle mláděte byl pozitivně korelován s hmotností vejce, tedy spíše s hmotností žloutku, která je na hmotnosti vejce závislá, viz obr. 4.1 v kapitole Výsledky. Žloutek je pro vyvíjející se embryo hlavním zdrojem energie, která je uložena převážně v podobě tuku (Deeming 2002b). Přesun tuku ze žloutku do těla mláděte se může odehrávat v různé míře, například v závislosti na věku matky (Braun et al. 2001). Snažila jsem se zjistit, jestli se míra přesunu tuku ze žloutkového váčku do těla mláděte mění mezi inkubačními teplotami.

Protože se s inkubační teplotou měnil procentuální obsah vody v těle mláděte a tím i procentuální obsah sušiny a v ní obsažených látek, vztáhla jsem obsah tuku, proteinů a anorganických látek k sušině. Ani poté jsem ale neprokázala žádný vztah mezi obsahem tuku a inkubační teplotou. Předpokládala bych proto, že vylíhlé mládě spoléhá spíše na tukové zásoby ještě obsažené ve žloutkovém váčku. Eiby a Booth (2009) sledovali obsah tuku v sušině celého mláděte, jeho žloutkového váčku i vlastního těla a také nezjistili žádný vztah mezi procentuálním obsahem tuku a inkubační teplotou, stejně jako Hepp et al. (2006), kteří sledovali obsah tuku v celém mláděti.

Obsah vody a proteinů v těle mláděte souvisí spíše s vaječným bílkem, než se žloutkem (Finkler et al. 1998; Deeming 2002b; Deeming 2002c). a na hmotnosti vejce nezávisel. To je v rozporu se zjištěním Slattery a Alisauskas (1995), v jejichž experimentu se z těžších vajec líhla mláďata s celkově větším obsahem proteinů.

Obsah proteinů v suchém těle mláděte nebyl závislý na inkubační teplotě. Ke stejnému výsledku došli i Eiby a Booth (2009), zatímco Hepp et al. (2006) uvádějí, že obsah proteinů v celém mláděti byl nejvyšší ve vysokých inkubačních teplotách, stejně, jako celková hmotnost mláďat. Ve své práci jsem z technických a časových důvodů bohužel neměla možnost měřit obsah tuku, proteinů a anorganických látek také v reziduálním žloutkovém

váčku. Proteiny z bílku totiž během inkubace přecházejí jak do těla mláděte, tak do jeho žloutkového váčku (Deeming 2002b). Je tudíž možné, že variabilita v obsahu proteinů, kterou zjistili Hepp et al. (2006) může být způsobena odlišným obsahem proteinů ve žloutkovém váčku.

Obsah proteinů se obvykle vypočítává z celkového obsahu dusíku ve vzorku (Hepp et al. 2006; Yalcin et al. 2008a; Eiby a Booth 2009). Tato metoda neumožňuje od sebe rozlišit jednotlivé typy proteinů. V citovaných pracích, stejně jako v mé práci, mělo kromě svaloviny vliv na změřený obsah proteinů také opeření mláděte díky vysokému obsahu keratinu. Lze ale říci, že i opeření má značný termoregulační význam a přispívá tak k celkové zdatnosti vylíhlého mláděte.

Obsah anorganických látek v těle mláděte byl s hmotností vejce korelován negativně, ale výsledek nebyl statisticky průkazný, byť jen marginálně ($p = 0,085$). Anorganické látky pochází hlavně ze skořápky vejce (Deeming 2002b). Předpokládala bych, že těžší vejce by mělo mít i těžší skořápku a tudíž vyšší dostupné množství anorganických látek. Ty však mohou v průběhu vývoje přecházet také do žloutkového váčku (Packard (1994) ex Deeming (2002b)). Mechanismus, kterým se tento proces odehrává, však ještě není příliš prozkoumán. Navíc se domnívám, že mnou zjištěný záporný vztah mezi hmotností vejce a obsahem anorganických látek v těle mláděte nemá příliš velkou vypovídací hodnotu, protože jsem obsah anorganických látek neměřila přímo, nýbrž dopočítávala do sta procent z ostatních naměřených údajů.

Obsah anorganických látek v suchém těle mláděte na inkubační teplotě závislý byl, přičemž nejvyšší byl pro teplotu 36 °C, pro teploty 35,5 a 37 °C byl nižší. Hepp et al. (2006) pro celá mláďata kachničky karolínské uvádějí nejvyšší obsah anorganických látek v inkubační teplotě 34,6 °C, pro teploty 36 a 37,4 °C byl jimi pozorovaný obsah anorganických látek nižší. Eiby a Booth (2009) oproti tomu žádný vliv inkubační teploty na obsah anorganických látek v celém mláděti, ani v jeho těle a žloutkovém váčku nezjistili. Anorganické látky, hlavně vápenaté ionty slouží převážně ke stavbě kostry mláděte (Deeming 2002b), takže by se při jejich nedostatku dal očekávat zhoršený vývoj kostí (Finkler et al. 1998). Moje výsledky měření strukturálních rozměrů mláďat ale nenaznačují, že by v inkubačních teplotách 35,5 nebo 37 °C docházelo ke zkracování měřených rozměrů. Není ale zřejmé, do jaké míry byly kosti osifikovány. Protože však část anorganických látek zůstává uložena ve žloutkovém váčku, může k osifikaci kostí docházet i po vylíhnutí mláděte (Packard (1994) ex Deeming (2002)).

5.5 Pohlaví mlád'at

Vzhledem ke genetickému určení pohlaví u ptáků jsem předpokládala vyrovnaný podíl samců a samic ve vejcích, ale chtěla jsem zjistit, zda v nějaké teplotě existuje pohlavně specifická úmrtnost, která by posléze ovlivnila poměr pohlaví vylíhlých mlád'at. Žádné rozdíly v poměru pohlaví mezi mlád'aty vylíhlými a mlád'aty uhynulými v průběhu inkubace jsem ale neodhalila – ani celkově, ani při srovnání jednotlivých inkubačních teplot.

Odběr DNA z nevyvíhlých zárodků probíhal až v roce 2009 a podařilo se mi zjistit pohlaví pouze u 171 embryí z celkových 229 nevyvíhlých vajec. U ostatních vajec došlo k úhynu embrya tak časně, že jsem měla obtíže ho ve žloutku najít, vejce v inkubátoru podléhalo degradaci a navíc hrozila kontaminace vzorku díky DNA matky (Arnold et al. 2003). Pohlaví jiných embryí pak nebylo možné určit díky zmíněné degradaci.

Vliv inkubační teploty na pohlavně specifickou mortalitu prokázali Göth a Booth (2005) a Eiby et al. (2008) ve studiích na tabonovi lesním. Ve vyšších inkubačních teplotách zde byla větší úmrtnost samčích embryí, v nižších inkubačních teplotách naopak samičích embryí. V teplotách obvyklých pro přirozenou inkubaci byl však poměr pohlaví vyrovnaný.

Zkoumala jsem také vliv pohlaví na délku inkubace. Žádný rozdíl mezi pohlavími jsem neprokázala, na rozdíl od Burke (1992), který u mlád'at kura domácího zjistil, že samice se líhnou průkazně dříve, než samci.

V souladu s výsledky práce Atamian a Sedingeir (2010) na tetřívkoví pelyňkovém (*Centrocercus urophasianus*) jsem neprokázala žádný rozdíl mezi hmotností vejce se samčím a samičím zárodkem. Znamená to, že samice investuje stejně do tvorby samčího i samičeho vejce (Atamian a Sedingeir 2010). Ani u čejky chocholaté (*Vanellus vanellus*), kde samci kompetují o samice a dalo by se předpokládat, že by bylo výhodné, kdyby samice investovala více energie do samčích vajec, se rozdíl v hmotnostech vajec neprokázal (Lislevand et al. 2005). Za nepříznivých a měnících se podmínek může být pro samici výhodné, když manipuluje s velikostí vajec v závislosti na pohlaví a tím i s šancí vylíhlého mláděte na přežití (Rubolini et al. 2009).

Ve své práci jsem ale mohla sledovat jen obecné trendy. Větší investice samice do jednoho pohlaví zprostředkovaná větším vejcem může být individuální záležitost. Protože jsem ve své práci příslušnost vajec k samičím neznala, pravděpodobně by mi tento efekt unikl, i kdyby se mezi kachnami objevoval.

6. Závěr

Délka inkubace a líhnivost

Mnou pozorovaná délka inkubace byla větší, než jakou ve stejných inkubačních teplotách v laboratorních podmínkách uvádí většina autorů. Mohlo to být způsobeno nedostatečným kontaktem velkého počtu vajec inkubovaných ve společném inkubátoru, který zabraňoval komunikaci mezi líhnoucími se mláďaty.

Na rozdíl od většiny autorů zabývajících se délkou inkubace jsem do experimentu zahrнула také inkubační teploty na samé hranici podmínek, za kterých ještě probíhá vývoj embrya. Díky tomu jsem zjistila, že délka inkubace s rostoucí inkubační teplotou neklesá lineárně, ale spíše po křivce ve tvaru písmena S, přičemž se od sebe krajní teploty v délce inkubace takřka neliší. Pravděpodobně tam již vývoj embrya naráží na fyziologické limity.

Hmotnost mláďat a žloutkových váčků

Autoři většiny prací, které se zabývaly vlivem inkubační teploty na hmotnost mláděte uvádějí, že hmotnost mláděte na inkubační teplotě nějakým způsobem závisí. Avšak hmotnost mláďat v mé práci na inkubační teplotě závislá nebyla. Namísto toho se mezi teplotami lišila míra přesunu materiálu ze žloutkového váčku do vlastního těla, přičemž byla nejvyšší pro nízké inkubační teploty. To mohlo být způsobeno dlouhou dobou inkubace v těchto nízkých teplotách, takže by embryo mělo více času na svůj vývoj. Poněkud překvapivě jsem dospěla k podobným výsledkům, jako autoři prací na hadech, například Lin et al. (2005) a Lu et al. (2009).

Z neprůkaznosti závislosti hmotnosti mláděte na inkubační teplotě také vyplývá, že teplota pravděpodobně neměla vliv na rychlost embryonálního metabolismu a produkci tepla, což je v rozporu se zjištěním většiny citovaných prací.

Strukturální rozměry mláďat

Mláďata v nižších inkubačních teplotách nejen, že mají těžší vlastní tělo, ale jsou také celkově strukturálně větší. To naznačuje, že růstová rychlost je ve všech inkubačních teplotách

přibližně stejná a teploty se mezi sebou liší jen v délce působení na zárodek, tj. v délce inkubace. To je v rozporu z výsledky většiny prací, ve kterých autoři uvádějí neprůkaznost závislosti strukturálních rozměrů mláděte na inkubační teplotě.

Délka lebky je, pravděpodobně díky její komplikovanější stavbě, závislá na teplotě zcela jiným způsobem, než délka jedné dlouhé kosti, jakou je tarsus. Růst lebky je pravděpodobně ovlivňován růstem mozku. Lebka byla největší v teplotě 37 °C, kde současně byla největší líhnivost a která se z mnoha použitých teplot nejvíce blíží běžné inkubační teplotě kachen divokých uváděné v literatuře (Caldwell a Cornwell 1975).

Chemické složení mlád'at

Obsah vody ve žloutkovém váčku a vlastním těle mláděte

Z výsledků vyplývá, že ve vyšších inkubačních teplotách obsahuje vlastní tělo mláděte vyšší podíl vody a jeho suchá hmotnost současně klesá. Žloutkový váček reaguje na rostoucí inkubační teplotu opačně, jeho obsah vody s rostoucí inkubační teplotou klesá, jeho suchá i mokrá hmotnost stoupá. Voda, která ze žloutkového váčku ubývá, však není zodpovědná za přibývající obsah vody v těle mláděte. Spíše se s inkubační teplotou mění způsob využívání vody z vaječného bílku. Tyto výsledky by ale ještě bylo potřeba rozšířit o data z nadoptimálních inkubačních teplot, kde se může obsah vody v jednotlivých složkách mláděte měnit jiným způsobem.

Obsah tuku, proteinů a anorganických látek ve vlastním těle mláděte

Obsah tuku v těle mláděte byl závislý na hmotnosti vejce, nikoliv však na inkubační teplotě, což je v souladu s výsledky většiny autorů. Znamená to, že míra jeho přesunu ze žloutku do těla se s teplotou neměnila.

Výsledky mé práce ukazují, že obsah proteinů v těle mláděte nebyl závislý ani na hmotnosti vejce, ani na inkubační teplotě, což je v rozporu s prací Slattery a Alisauskas (1995), kteří zjistili závislost obsahu proteinů v celém mláděti na hmotnosti vejce.

Pro lepší zhodnocení vlivu inkubační teploty na chemické složení mláděte by bylo potřeba použít mlád'ata z více inkubačních teplot a analyzovat také chemické složení žloutkového váčku. To z časových a technických důvodů bohužel nebylo možné.

Pohlaví mlád'at

Z mých výsledků vyplývá, že se celkový poměr pohlaví u vylíhlých mlád'at neliší od celkového primárního poměru pohlaví embryí, že se zde tedy v žádné inkubační teplotě nevyskytuje pohlavně specifická mortalita. Nepodařilo se mi prokázat ani vliv pohlaví na délku inkubace, ani na hmotnost vejce.

7. Souhrn

- 1) Během svého výzkumu jsem inkubovala postupně 736 vajec, z toho 184 v roce 2008 a 552 ve třech běžích inkubace v roce 2009. Z vajec se vylíhlo v obou letech celkem 427 mlád'at.
- 2) Pro inkubaci jsem použila 6 inkubačních teplot z rozmezí pozorovaného u kachen divokých v přírodě (35; 35,5; 36; 37; 38 a 39 °C). V průběhu experimentu jsem zjistila, že teploty 35 a 39 °C leží zřejmě na samé hranici umožňující vývoj mlád'at.
- 3) Pro udržování vzdušné vlhkosti v inkubátorech jsem postupovala podle návodu přiloženého výrobcem, po přečtení dat z dataloggerů jsem ale zjistila, že se vlhkost ve všech inkubačních teplotách pohybovala mezi 42 a 52 %, což bylo méně, než kolik se obvykle uvádí v literatuře jako vzdušná vlhkost používaná pro inkubaci v laboratorních podmínkách.
- 4) Pro analýzu chemického složení vlastního těla mláděte jsem použila pouze mlád'ata z inkubačních teplot 35,5; 36 a 37 °C, z každé teploty 40 mlád'at.
- 5) Pohlaví se podařilo určit celkem u 412 vylíhlých mlád'at a u 171 nevylíhlých embryí.
- 6) Mnou pozorovaná délka inkubace byla větší, než délky inkubace uváděné ve stejných teplotách v jiných studiích. Domnívám se, že to mohla ovlivnit nedostatečná komunikace mezi mlád'aty ve velkém počtu vajec v inkubátoru.
- 7) Délka inkubace s rostoucí inkubační teplotou klesala, ale krajní teploty se od sebe nelišily. Pravděpodobně zde mělo vliv fyziologické omezení.
- 8) Líhivost byla nevyšší v inkubační teplotě 37 °C, směrem k vyšším i nižším inkubačním teplotám klesala. Je pravděpodobné, že optimální teplota pro inkubaci vajec kachny divoké se pohybuje právě v okolí této teploty. Počet úspěšně vyvedených mlád'at může být v krajních teplotách hned zpočátku snížen díky větší četnosti vývojových vad.

9) Nejdelší průměrný interval mezi naklováním a vylíhnutím vejce byl v teplotě 37 °C (34,1 h), nejkratší v teplotě 38 °C (21,6 h). Domnívám se ale, že délka tohoto intervalu může být silně ovlivněna komunikací mezi mládřaty, kterou jsem neměla možnost sledovat.

10) Vliv hmotnosti vejce na délku inkubace se nepodařilo prokázat, i když moje výsledky naznačují, že by se ve vyšších inkubačních teplotách mohla těžší vejce líhnout relativně později. Mohlo by to souviset s rozdílnou rychlostí metabolismu v různě objemných vejcích, ta však zatím nebyla dostatečně prozkoumána.

11) Hmotnost vejce má průkazný pozitivní vliv na pravděpodobnost vylíhnutí, na hmotnost a celkovou strukturální velikost vylíhlého mláděte a na procentuální obsah tuku v jeho těle.

12) Hmotnost vejce má vliv na hmotnost žloutkového váčku mláděte i jeho vlastního těla, ale vliv na hmotnost vlastního těla je větší. Znamená to, že hmotnost vejce působí pozitivně hlavně na hmotnost a velikost těla mláděte, množství energetických zásob ve formě reziduálního žloutkového váčku je až druhotné.

13) Inkubační teploty se mezi sebou nelišily v hmotnosti vylíhých mládřat, ale v míře přesunu materiálu ze žloutku do těla mláděte. Zdá se, že by tento přesun mohl být závislý i na délce inkubace, ale výsledek není signifikantní.

14) V nižších inkubačních teplotách se líhnou mládřata se strukturálně větším a těžším vlastním tělem a současně s lehčím reziduálním žloutkovým váčkem. V jejich těle je menší procentuální obsah vody a tím i vyšší procentuální obsah sušiny. Současně je vyšší procentuální obsah vody v jejich reziduálním žloutkovém váčku a tím i nižší obsah sušiny. Celkově se zdá, že mládřata z nižších inkubačních teplot využijí více materiálu ze žloutkového váčku a líhnou se více vyvinuta.

15) Ve vysokých inkubačních teplotách (38 a 39 °C) jsem sice neměřila obsah žloutkového váčku, ale zjistila jsem, že se mládřata líhnou strukturálně menší. Mohla by za to být zodpovědná kratší délka inkubace, která je s vysokými inkubačními teplotami spojená. Moje výsledky tedy naznačují, že rychlost vývoje zárodku není závislá na inkubační teplotě. To je v práci na ptácích neobvyklé zjištění, ve většině prací autoři uvádějí, že v nižších inkubačních

teplotách je růstová rychlost menší, protože embryo musí vynakládat více energie na termoregulaci.

16) Délka lebky byla pravděpodobně korelována s velikostí mozku a byla nejdelší v teplotě 37 °C, směrem k nižším i vyšším inkubačním teplotám se zkracovala. Rychlost růstu mozku a lebky tedy reaguje na inkubační teplotu jiným způsobem, než ostatní měřené strukturální rozměry.

17) Kondice mláďat, vyjádřená jako reziduály vztahu mezi délkou tarsu a hmotností mláďate byla nejvyšší v inkubační teplotě 38 °C. Její vypovídací hodnota je ale sporná, protože zatímco hmotnost mláďate, jakožto důležitý ukazatel jeho kondice, se s teplotou neměnila, délka tarsu, ke které se hmotnost vztahuje, s rostoucí teplotou klesala.

18) Procentuální obsah tuku v těle mláďate nebyl závislý na inkubační teplotě. Znamená to, že míra přesunu tuku ze žloutkového vřčku do těla není na teplotě závislá. Mláďe s menším vlastním tělem a tím i menším absolutním množstvím tuku v něm může po vylíhnutí využívat tuk obsažený v reziduálním žloutkovém vřčku. Jeho obsah jsem bohužel neměla možnost změřit.

19) Procentuální obsah proteinů v těle mláďate nebyl závislý ani na inkubační teplotě, ani na hmotnosti vejce. Zvláště neprůkaznost závislosti na hmotnosti vejce může být způsobena tím, že proteiny se v průběhu inkubace přesunují z vaječného bílku také do žloutkového vřčku. Tudíž se v mém experimentu mohly reziduální žloutkové vřčky mezi teplotami lišit v obsahu proteinů, což jsem bohužel neměla možnost změřit.

20) Procentuální obsah anorganických látek v těle mláďate na inkubační teplotě závislý byl, přičemž byl nejvyšší pro teplotu 36 °C, pro teploty 35,5 a 37 °C byl nižší. Současně byl negativně korelován s hmotností vejce, i když tento vztah byl marginálně nesignifikantní. Nejednoznačnost těchto výsledků může být zapříčiněna způsobem, jakým jsem obsah anorganických látek odhadovala (tj. dopočítáváním do sta procent) a pro jejich zpřesnění by bylo potřeba další studium, včetně zahrnutí analýzy složení reziduálního žloutkového vřčku.

21) Poměr pohlaví vylíhlých mláďat se v žádné inkubační teplotě nelišil od primárního poměru pohlaví inkubovaných embryí, který se nelišil od poměru 1:1. Nejistila jsem tudíž žádnou pohlavně specifickou mortalitu.

22) Pohlaví embrya nijak neovlivňovalo hmotnost vejce. Je tudíž nepravděpodobné, že by samice kachny divoké obecně investovaly do jednoho pohlaví více energie. Pokud ale existovaly nějaké rozdíly ve velikosti vajec v závislosti na pohlaví v rámci jednotlivých snůšek, nemohla jsem je odhalit, protože jsem neznala příslušnost experimentálních vajec k samicím.

23) Pohlaví embrya také neovlivňovalo délku inkubace, je tedy pravděpodobné, že inkubační teplota působí na vývoj obou pohlaví stejným způsobem.

Literatura

- Abraham, R. L. (1974). Vocalizations Of Mallard (*Anas-Platyrhynchos*). Condor **76**(4): 401-420.
- Adeyeye, E. I. (2009). Comparative Study On The Characteristics Of Egg Shells Of Some Bird Species. Bulletin Of The Chemical Society Of Ethiopia **23**(2): 159-166.
- Aldrich, T. W. and D. G. Raveling (1983). Effects Of Experience And Body-Weight On Incubation Behavior Of Canada Geese. Auk **100**(3): 670-679.
- Amat, J. A. and J. A. Masero (2007). The functions of belly-soaking in Kentish Plovers *Charadrius alexandrinus*. Ibis **149**(1): 91-97.
- Anderson, V. R. and R. T. Alisauskas (2001). Egg size, body size, locomotion, and feeding performance in captive King Eider ducklings. Condor **103**(1): 195-199.
- Arnold, K. E., K. J. Orr, et al. (2003). Primary sex ratios in birds: problems with molecular sex identification of undeveloped eggs. Molecular Ecology **12**(12): 3451-3458.
- Atamian, M. T. and J. S. Sedingeir (2010). Balanced Sex Ratio At Hatch In A Greater Sage-Grouse (*Centrocercus Urophasianus*) Population. Auk **127**(1): 16-22.
- Bogdanova, M. I., R. G. Nager, et al. (2006). Does parental age affect offspring performance through differences in egg quality? Functional Ecology **20**(1): 132-141.
- Bolton, M. (1991). Determinants Of Chick Survival In The Lesser Black-Backed Gull - Relative Contributions Of Egg Size And Parental Quality. Journal Of Animal Ecology **60**(3): 949-960.
- Boonstra, T. A., M. E. Clark, et al. (2009). Maternal resource variation across the laying sequence in Canada geese *Branta canadensis maxima*. Journal Of Avian Biology **40**(5): 520-528.
- Boonstra, T. A., M. E. Clark, et al. (2010). Position In The Sequence Of Laying, Embryonic Metabolic Rate, And Consequences For Hatching Synchrony And Offspring Survival In Canada Geese. Condor **112**(2): 304-313.
- Booth, D. T. and D. N. Jones (2002). Underground nesting in the megapods. Avian Incubation: Behaviour, Environment, and Evolution. D. C. Deeming. New York, Oxford University Press Inc.: 192-206.
- Braun, C. M., J. R. Burgess, et al. (2001). Liver lipid accumulation in duck embryos and hatchlings change with parental age. Biology Of The Neonate **80**(3): 228-234.
- Burke, W. H. (1992). Sex-Differences In Incubation Length And Hatching Weights Of Broiler Chicks. Poultry Science **71**(11): 1933-1938.

- Burley, R. W. and D. V. Vadhera (1989). The Avian Egg, Chemistry and Biology. New York, John Wiley and Sons.
- Caccamise, D. F. (1980). Growth And Development Of Major Body Components In The Monk Parakeet. Wilson Bulletin **92**(3): 376-381.
- Caldwell, P. J. and G. W. Cornwell (1975). Incubation behavior and temperatures of mallard-duck. Auk **92**(4): 706-731.
- Crisuolo, F., G. W. Gabrielsen, et al. (2002). Body mass regulation during incubation in female common eiders *Somateria mollissima*. Journal of Avian Biology **33**(1): 83-88.
- Deeming, D. C. (2002a). Behaviour patterns during incubation. In: Avian Incubation: Behaviour, Environment, and Evolution. D. C. Deeming. New York, Oxford University Press, Inc.: 63-87.
- Deeming, D. C. (2002b). Embryonic development and utilisation of egg components. In: Avian Incubation: Behaviour, Environment, and Evolution. D. C. Deeming. New York, Oxford University Press, Inc.: 43-53.
- Deeming, D. C. (2002c). Functional characteristics of eggs. In: Avian Incubation: Behaviour, Environment, and Evolution. D. C. Deeming. New York, Oxford University Press, Inc.: 28-42.
- Deeming, D. C. (2002d). Importance and evolution of incubation in avian reproduction. In: Avian Incubation: Behaviour, Environment, and Evolution. D. C. Deeming. New York, Oxford University Press, Inc.: 1-7.
- Dmitrieva, L. P. and G. Gottlieb (1994). Influence Of Auditory Experience On The Development Of Brain-Stem Auditory-Evoked Potentials In Mallard Duck Embryos And Hatchlings. Behavioral And Neural Biology **61**(1): 19-28.
- DuRant, S. E., G. R. Hepp, et al. (2010). Slight differences in incubation temperature affect early growth and stress endocrinology of wood duck (*Aix sponsa*) ducklings. Journal of Experimental Biology **213**(1): 45-51.
- Dzialowski, E. M. and P. R. Sotherland (2004). Maternal effects of egg size on emu *Dromaius novaehollandiae* egg composition and hatchling phenotype. Journal Of Experimental Biology **207**(4): 597-606.
- Eiby, Y. A. and D. T. Booth (2009). The effects of incubation temperature on the morphology and composition of Australian Brush-turkey (*Alectura lathami*) chicks. Journal Of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic And Environmental Physiology **179**(7): 875-882.
- Eiby, Y. A., J. W. Wilmer, et al. (2008). Temperature-dependent sex-biased embryo mortality in a bird. Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences **275**(1652): 2703-2706.
- Feldheim, C. L. (1997). The length of incubation in relation to nest initiation date and clutch size in dabbling ducks. Condor **99**(4): 997-1001.

- Finkler, M. S., J. B. Van Orman, et al. (1998). Experimental manipulation of egg quality in chickens: influence of albumen and yolk on the size and body composition of near-term embryos in a precocial bird. Journal Of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic And Environmental Physiology **168**(1): 17-24.
- Flint, P. L. and J. B. Grand (1999). Incubation behavior of spectacled eiders on the Yukon-Kuskokwim Delta, Alaska. Condor **101**(2): 413-416.
- Gille, U. and F. V. Salomon (1999). Growth of duck bills. Condor **101**(3): 710-713.
- Göth, A. (2002). Behaviour of Australian brush-turkey (*Alectura lathami*, Galliformes: Megapodiidae) chicks following underground hatching. Journal Fur Ornithologie **143**(4): 477-488.
- Göth, A. (2007). Incubation temperature and sex ratios in Australian brush-turkey (*Alectura lathami*) mounds. Austral Ecology **32**: 378-385.
- Göth, A. and D. T. Booth (2005). Temperature-dependent sex ratio in a bird. Biology Letters **1**(1): 31-33.
- Griffiths, R., M. C. Double, et al. (1998). A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology **7**(8): 1071-1075.
- Halupka, K. (1994). Incubation feeding in meadow pipit *Anthus pratensis* affects female time budget. Journal of Avian Biology **25**(3): 251-253.
- Hammond, C. L., B. H. Simbi, et al. (2007). In ovo temperature manipulation influences embryonic motility and growth of limb tissues in the chick (*Gallus gallus*). Journal Of Experimental Biology **210**(15): 2667-2675.
- Handrych, Y. (1989). Incubation Water Loss in King Penguin Egg. I. Change in Egg and Brood Pouch Parameters. Physiological Zoology **62**(1): 96-118.
- Hassan, S. M., A. A. Siam, et al. (2004). Incubation temperature for ostrich (*Struthio camelus*) eggs. Poultry Science **83**(3): 495-499.
- Hepp, G. R., R. A. Kennamer, et al. (2006). Maternal effects in Wood Ducks: incubation temperature influences incubation period and neonate phenotype. Functional Ecology **20**(2): 307-314.
- Hepp, G. R., D. J. Stangohr, et al. (1987). Factors Affecting Variation In The Egg And Duckling Components Of Wood Ducks. Auk **104**(3): 435-443.
- Hořák, D. and T. Albrecht (2007). Using net sacks to examine the relationship between egg size and young size in Common Pochards. Journal Of Field Ornithology **78**(3): 334-339.
- Hudec, K. (1994). Fauna ČR a SR - Ptáci 1. Praha, Academia.

- Hulet, R., G. Gladys, et al. (2007). Influence of egg shell embryonic incubation temperature and broiler breeder flock age on posthatch growth performance and carcass characteristics. Poultry Science **86**(2): 408-412.
- Kahn, N. W., J. St John, et al. (1998). Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. Auk **115**(4): 1074-1078.
- Kjeldahl, J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **22**(1): 366-382.
- Kreisinger, J. and T. Albrecht (2008). Nest protection in mallards *Anas platyrhynchos*: untangling the role of crypsis and parental behaviour. Functional Ecology **22**(5): 872-879.
- Lea, R. W. and H. Klandorf (2002). The brood patch. Avian Incubation: Behaviour, Environment, and Evolution. D. C. Deeming. New York, Oxford University Press, Inc.: 100-118.
- LeBihanDuval, E., C. Beaumont, et al. (1997). Estimation of the genetic correlations between twisted legs and growth or conformation traits in broiler chickens. Journal Of Animal Breeding And Genetics-Zeitschrift Fur Tierzucht Und Zuchtungsbiologie **114**(4): 239-259.
- Lee, J. C. I., L. C. Tsai, et al. (2010). A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. Molecular And Cellular Probes **24**(1): 27-31.
- Lin, Z. H., X. Ji, et al. (2005). Incubation temperature affects hatching success, embryonic expenditure of energy and hatchling phenotypes of a prolonged egg-retaining snake, *Deinagkistrodon acutus* (Viperidae). Journal Of Thermal Biology **30**(4): 289-297.
- Lislevand, T., I. Byrkjedal, et al. (2005). Egg size in relation to sex of embryo, brood sex ratios and laying sequence in northern lapwings (*Vanellus vanellus*). Journal Of Zoology **267**: 81-87.
- Lu, H. L., R. B. Hu, et al. (2009). The variance of incubation temperatures does not affect the phenotype of hatchlings in a colubrid snake, *Xenochrophis piscator*. Journal Of Thermal Biology **34**(3): 138-143.
- MacCluskie, M. C., P. L. Flint, et al. (1997). Variation in incubation periods and egg metabolism in Mallards: Intrinsic mechanisms to promote hatch synchrony. Condor **99**(1): 224-228.
- Maltby, V., A. Somaiya, et al. (2004). In ovo temperature manipulation influences post-hatch muscle growth in the turkey. British Poultry Science **45**(4): 491-498.
- Martin, P. A. and T. W. Arnold (1991). Relationships Among Fresh Mass, Incubation-Time, And Water-Loss In Japanese-Quail Eggs. Condor **93**(1): 28-37.

- Mead, P. S., M. L. Morton, et al. (1987). Sexual Dimorphism In Egg Size And Implications Regarding Facultative Manipulation Of Sex In Mountain White-Crowned Sparrows. Condor **89**(4): 798-803.
- Olson, C. R., C. M. Vleck, et al. (2008). Decoupling morphological development from growth in periodically cooled zebra finch embryos. Journal Of Morphology **269**(7): 875-883.
- Olson, C. R., C. M. Vleck, et al. (2006). Periodic cooling of bird eggs reduces embryonic growth efficiency. Physiological And Biochemical Zoology **79**(5): 927-936.
- Packard, M. J. (1994). Patterns Of Mobilization And Deposition Of Calcium In Embryos Of Oviparous, Amniotic Vertebrates. Israel Journal Of Zoology **40**(3-4): 481-492.
- Pelayo, J. T. and R. G. Clark (2003). Consequences of egg size for offspring survival: A cross-fostering experiment in ruddy ducks (*Oxyura jamaicensis*). Auk **120**(2): 384-393.
- Perez, C., A. Velando, et al. (2006). Parental food conditions affect sex-specific embryo mortality in the yellow-legged gull (*Larus michahellis*). Journal Of Ornithology **147**(4): 513-519.
- Persson, I. and G. Andersson (1999). Intraclutch hatch synchronization in pheasants and mallard ducks. Ethology **105**(12): 1087-1096.
- Polovintseva, T. M. and F. I. Suleimanov (2008). Development of hind limb bones in chicken embryos under altered temperature and humidity conditions. Russian Journal Of Developmental Biology **39**(3): 185-187.
- Prince, H. H., P. B. Siegel, et al. (1969). Incubation Environment And Development Of Mallard Embryos. Journal Of Wildlife Management **33**(3): 589-&.
- Prinzinger, R., V. Dietz, et al. (1997). Respiratory quotient and embryological development of metabolic heat production in the Rhea (*Rhea americana*). Journal Of Thermal Biology **22**(3): 223-226.
- Rahn, H. and A. Ar (1974). Avian Egg - Incubation-Time And Water-Loss. Condor **76**(2): 147-152.
- Reidy, T. R., J. L. Atkinson, et al. (1998). Size and components of poult yolk sacs. Poultry Science **77**(5): 639-643.
- Rubolini, D., R. Ambrosini, et al. (2009). Within-clutch egg size asymmetry covaries with embryo sex in the yellow-legged gull *Larus michahellis*. Behavioral Ecology And Sociobiology **63**(12): 1809-1819.
- Slattery, S. M. and R. T. Alisauskas (1995). Egg Characteristics And Body Reserves Of Neonate Ross And Lesser Snow Geese. Condor **97**(4): 970-984.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf (1995). Biometry. New York, Freeman.

- Szigeti, B., J. Torok, et al. (2007). Egg quality and parental ornamentation in the blue tit *Parus caeruleus*. Journal Of Avian Biology **38**(1): 105-112.
- Vieira, S. L. and E. T. Moran (1998). Eggs and chicks from broiler breeders of extremely different age. Journal Of Applied Poultry Research **7**(4): 372-376.
- Vleck, C. M. and D. Vleck (1996). Embryonic energetics. Avian Energetics and Nutritional Ecology. C. Carey. New York, Chapman and Hall: 417-460.
- Weller, M. W. (1956). A Simple Field Candler for Waterfowl Eggs. The Journal of Wildlife Management **20**(2): 111-113.
- Wells-Berlin, A. M., H. H. Prince, et al. (2005). Incubation length of dabbling ducks. Condor **107**(4): 926-929.
- White, D. W. and E. D. Kennedy (1997). Effect of egg covering and habitat on nest destruction by House Wrens. Condor **99**(4): 873-879.
- Williams, T. D. (1994). Intraspecific Variation In Egg Size And Egg Composition In Birds - Effects On Offspring Fitness. Biological Reviews Of The Cambridge Philosophical Society **69**(1): 35-59.
- Wolf, N. K., J. L. Bixby, et al. (1976). Prenatal Experience And Avian Development - Brief Auditory-Stimulation Accelerates Hatching Of Japanese Quail. Science **194**(4268): 959-960.
- Yahav, S., R. S. Rath, et al. (2004). The effect of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chicks (*Gallus domesticus*) on hatchability, body weight and thermoregulation after hatch. Journal Of Thermal Biology **29**(4-5): 245-250.
- Yalcin, S., N. Bagdatlioglu, et al. (2008a). Acclimation to heat during incubation. 2. Embryo composition and residual egg yolk sac fatty acid profiles in chicks. Poultry Science **87**(6): 1229-1236.
- Yalcin, S., M. Cabuk, et al. (2008b). Acclimation to heat during incubation. 1. Embryonic morphological traits, blood biochemistry, and hatching performance. Poultry Science **87**(6): 1219-1228.
- Yalcin, S. and P. B. Siegel (2003). Exposure to cold or heat during incubation on developmental stability of broiler embryos. Poultry Science **82**(9): 1388-1392.
- Young, A. D. (1993). Intraspecific Variation In The Use Of Nutrient Reserves By Breeding Female Mallards. Condor **95**(1): 45-56.
- Zar, J. H. (1996). Biostatistical Analysis, Third Edition. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall International, Inc.