

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie



Bc. Stanislav Valášek

**Oxidační stres a kondiční závislost ornamentálních signálů
kvality u sociálně monogamního pěvce**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: MVDr. Oldřich Tomášek, Ph.D.

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

2016

Charles University in Prague

Faculty of Science

Department of Zoology



Bc. Stanislav Valášek

**Oxidative stress and condition-dependence of ornamental signals
of quality in socially monogamous song bird**

DIPLOMA THESIS

Supervisor: MVDr. Oldřich Tomášek, Ph.D.

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

2016

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Já, níže podepsaný/á student/ka tímto čestně prohlašuji, že text mnou odevzdané závěrečné práce v písemné podobě, nebo na CD nosiči, je totožný s textem závěrečné práce vloženým v databázi VŠKP UK.

V Cambridge dne 18. července 2016

Stanislav Valášek

(podpis)

(Zadání vysokoškolské kvalifikační práce)

ABSTRAKT

Kondiční ornamenty plní nenahraditelnou funkci v pohlavním výběru nemalé části pohlavně se rozmnožujících živočichů. Náročnost vytvoření a později také nošení těchto ornamentů, signalizujících stav jejich nositele, zatěžuje v nemalém měřítku mj. také metabolismus. Tato práce testuje hypotézu vzájemné závislosti kondičních ornamentů, jakožto ukazatelů kvalit jedinců, a metabolismu jakožto nejvýznamnějšího zdroje volných radikálů zodpovědných za oxidační stres. Reálná váha vlivu nákladnosti ornamentu na organismus, resp. na jeho redoxní stav, je v této práci experimentálně testována. Manipulace provedené na jednotlivých odchycených samcích modelového druhu, kterým je vlaštovka obecná (*Hirundo rustica*), by měly ověřit, do jaké míry navzájem korelují uvedené faktory.

Analýza údajů získaných během odchytů uskutečněných v průběhu hnízdních období v letech 2012 a 2013 nevykazuje významné trendy mezi sledovanými proměnnými. Tento fakt potvrzují minimální rozdíly a také nejednotná variabilita hladin měřených antioxidantů – oxidoreduktáz, superoxid–dismutázy a glutathion peroxidázy. Minimální vliv manipulací s jedním z kondičních ornamentů, přítomných u modelového druhu na hladiny enzymů, podporuje hypotézu kondičních ornamentů jako signálů kvality jedinců.

Vzhledem k době sběru dat je však vhodné uvést také možnost minimálního vlivu manipulací na organismus. Tuto možnost lze odůvodnit energetickou nákladností hnízdního období a s ním související možnost dosažení maximální produkce metabolismem produkováných volných radikálů. Tuto možnost podporují tyto faktory: snaha o maximalizaci inkluzivní fitness samců, obhajoba hnízda či teritoria nebo v neposlední řadě nákladnost péče o potomstvo. Do jaké míry tyto faktory skutečně ovlivňují produkci volných radikálů a jaká je jejich variabilita během hnízdního a mimohnízdního období u migrujících i stálých druhů mohou případně zjistit budoucí studie zabývající se biologií vybraných druhů.

Klíčová slova: pohlavní výběr, druhotné pohlavní znaky, nákladnost exprese ornamentů, oxidační stres, antioxidační enzymy, čestnost signalizace

ABSTRACT

Conditional ornaments plays irreplaceable role in sexual selection in non-small part of by sexual reproduction reproducing animals. Fastidiousness of generating and later also carrying of these ornaments which show condition of their wearer, burdens also metabolism in non-small scale. This thesis tests hypothesis of mutual addiction between conditional ornaments, as the indicators of qualities of individuals and metabolism, as the most significant source of free radicals which are responsible for oxidative stress. The real weight of influence of ornament fastidiousness on organism, resp. on redox state, is tested in this thesis. Manipulations which were performed with individual males of model species should point how much the selected factors correlate each other. The barn swallow (*Hirundo rustica*) is the model species.

Analyses of dates collected during trapping which were realized in breeding seasons in 2012 and 2013 does not show any important trends between observing variables. This fact is confirmed by minimal differences and inconsistent variability of levels of measured antioxidants – oxidoreductases, superoxide dismutase and glutathione peroxidase. The marginal effect of manipulations with one of the conditional ornaments which are presented in model species supports the hypothesis of conditional ornaments as indicators of quality of individuals.

Due to the time of collecting of dates, possibility of minimal influence of manipulations to organism is appropriate to state. This possibility can be justified by energetic expensiveness of breeding season and within related to possibility. This possibility is supported by these factors: effort to maximizing the inclusive fitness of males, nest or territorial defense or last but not least the expensiveness of parental care. How much these factors really affect the production of free radicals and how high is their variability during breeding and non-breeding season between migratory and sedentary species could be discovered by the future studies focused on biology of selected species.

Keywords: sexual selection, secondary sexual traits, costs of ornament expression, oxidative stress, antioxidant enzymes, signalling honesty

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu práce MVDr. Oldřichu Tomáškoví, Ph.D. za vedení práce a trpělivost při jejím vypracovávání, konzultantovi této práce doc. Mgr. Tomáši Albrechtovi, Ph.D. za možnost seznámení se s řešenou problematikou.

Velké poděkování za veškerou podporu při psaní této práce patří mé rodině a přátelům. V neposlední řadě děkuji také své přítelkyni Veronice Hypšové, bez jejíž podpory by tato práce nejspíše nebyla dokončena

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval/a samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal/a, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Cambridge dne 18.července 2016

Stanislav Valášek

(podpis)

OBSAH

ÚVOD	10
1. OXIDAČNÍ STRES	11
1.1. Geneze nejvýznamnějších volných radikálů v živých soustavách	13
1.1.1. Průběh geneze volných radikálů	13
1.2. Oxidační poškození	14
1.3. Antioxidační mechanismy	15
1.3.1. Klasifikace antioxidantů	15
1.4. Oxidační stres jako hlavní mediátor senescence	16
2. POHLAVNÍ VÝBĚR A EVOLUCE ORNAMENTŮ	17
2.1. Role ornamentů v pohlavním výběru	18
2.2. Mechanismy zbarvení u ptáků	20
2.2.1. Pigmentové zbarvení	20
2.2.2. Strukturální zbarvení	24
3. MODELOVÝ DRUH	25
4. MATERIÁL A METODIKA	28
4.1. Experimentální část	29
4.1.1. Měření aktivity vybraných enzymů	30
4.1.2. Statistické vyhodnocení výsledků	31
5. VÝSLEDKY	32
5.1. Vliv manipulací na hladiny vybraných oxidoreduktáz	32
5.1.1. Vliv manipulací na hladiny GPx	32
5.1.2. Vliv manipulací na hladiny SOD	33
5.1.3. Vzáemé vztahy hladin měřených oxidoreduktáz	34
5.2. Analýza vztahů mezi antioxidanty a nákladností ornamentů	35
5.2.1. Analýza vztahů mezi antioxidanty a morfologickými znaky	35
5.3. Analýza vztahů mezi antioxidanty a zbarvením	36
5.3.1. Analýza vztahů mezi antioxidanty a žlutým zbarvením – Jas zbarvení	36
5.3.2. Analýza vztahů mezi antioxidanty a zbarvením – Sytost zbarvení	37
5.4. Analýza vzájemných vztahů mezi ornamenty	39
5.4.1. Analýza vztahů mezi zbarvením a morfologickými znaky	39

6. DISKUZE	40
ZÁVĚR	45
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	55
SEZNAM GRAFICKÝCH PŘÍLOH	56

Úvod

Pohlavní výběr je jedním z nejčastějších zaměření biologických či také ekologických studií. K maximalizaci úspěchu v uvedeném pohlavním výběru, tzn. k maximalizaci fitness, se u různých skupin živočichů vyvinuly typy indikátorů indikující určité charakteristiky jedinců. Mezi obratlovci nacházíme největší spektrum těchto indikátorů mezi ptáky. Za vysokou rozmanitost kondičních ornamentů, jak lze tyto indikátory označit, zodpovídá největší počet mechanismů zbarvení mezi obratlovci a také poměrně často výrazný pohlavní dimorfismus. Nákladnost těchto ornamentů, jakožto indikátorů kvality jedinců, může do určité míry zatěžovat metabolismus a s tím související fyziologické procesy.

Právě metabolismus zatěžující nákladnost ornamentů může, společně s dalšími pochody probíhajícími v živých soustavách, zodpovídat za zvýšenou produkci volných radikálů. Tyto molekuly pak mohou zpětně negativně ovlivňovat organismus ve formě oxidačního stresu. K minimalizaci negativního působení tohoto patobiochemického procesu pak slouží antioxidační mechanismy.

Cílem této práce je zjistit významnost vztahů mezi kondičními ornamenty, resp. mezi jejich nákladností a antioxidačními mechanismy. Tato práce testuje hypotézu kondičních ornamentů jakožto ukazatelů kvalit jedinců a předpokládá vyšší zátěž oxidačním stresem u jedinců s rozvinutějšími ornamenty. U jedinců s rozvinutějšími ornamenty zároveň také hypotéza předpokládá vyšší hladiny sledovaných oxidoreduktáz.

1 Oxidační stres

Jako oxidační stres je označován biochemický proces, jehož spouštěcím mechanismem je porušení rovnovážného zastoupení pro-oxidantů a antioxidantů v živých soustavách. V případě narušení této, v optimální situaci rovnovážné bilance dochází k zvýšené produkci volných radikálů zodpovídajících za následné oxidační poškození. Jako volné radikály jsou souhrnně označovány částice, molekuly či atomy, s nespárovanými elektrony v nejsvrchnější, tzn. valenční vrstvě. Mezi volné radikály řadíme reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS) a oxidanty neradikálové povahy. Mezi biologicky nejvýznamnější reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) patří: superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$), hydroxylový radikál (HO^{\bullet}), peroxylový radikál (RO_2^{\bullet}), alkoxylový radikál (RO^{\bullet}), hydroperoxylový radikál (HO_2^{\bullet}), oxid dusnatý (NO^{\bullet}) a oxid dusičitý (NO_2^{\bullet}). Druhou skupinou podílející se na oxidačním stresu jsou látky neradikálové povahy, někdy také označovány jako neradikálové deriváty kyslíku a dusíku, zahrnující tyto molekuly: peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná ($HOCl$), ozón (O_3), singletový kyslík (1O_2), peroxynitrit ($ONOO^-$), peroxid dusíku N_2O_2 , kyselina dusitá (HNO_2), oxid dusitý (N_2O_3), oxid dusičitý (N_2O_4), nitronium (NO_2^+), kyselina peroxydusitá ($ONOOH$), alkylperoxynitrit ($ROONO$), nitroxyl (NO^-), nitrosyl (NO^+), nitryl chlorid (NO_2Cl) (HALLIWELL&GUTTERIDGE 2015).

Zdroje indukující oxidační stres mohou být jak endogenního, tak exogenního původu. Hlavními endogenními generátory kyslíkových radikálů jsou oxidativní fosforylace (OXPHOS) probíhající v respiračním řetězci mitochondrií, peroxizómy, endoplasmatické retikulum, fagocytující buňky, záněty a reaktivita přechodných kovů v živých soustavách. Samotná oxidativní fosforylace, v případě fotosyntetizujících organismů pak fotofosforylace, tvoří společně s Krebsovým cyklem a dýchacím řetězcem – komplexy I, III a IV v mitochondriích nejvýznamnější zdroj volných radikálů v živých soustavách. Včetně tří uvedených fází buněčného dýchání se na to produkci volných radikálů poměrně podílí např. oxidace mastných kyselin, a to jak β -oxidace probíhající stejně jako buněčné dýchání v mitochondriích, tak α - či ω -oxidace probíhající v ribozomech, resp. v drsném endoplasmatickém retikulu (SCHRADER & FAHIMI 2006).

Druhým, po metabolismu nejvýznamnějším endogenním zdrojem volných radikálů je imunitní systém. Na produkci volných radikálů se v tomto případě podílí obě komponenty imunitního systému, tzn. jak specifická, tak pouze u obratlovců se vyskytující

nespecifická neboli vrozená imunita. Hlavními procesy, na jejichž průběhu se podílí obě složky imunitního systému, jsou respirační vzplanutí a zánětlivé reakce. V případě respiračního nebo také oxidačního vzplanutí dochází k zvýšené produkci volných, zejména superoxidových radikálů krátce po fagocytóze patogenů neutrofily či makrofágy. Druhým nejdůležitějším zdrojem volných radikálů imunitním systémem jsou pak zánětlivé reakce fungující jako obranné reakce v poškozených tkáních. Podobně jako u respiračního vzplanutí se zde na produkci volných radikálů podílí zejména leukocyty (NATHAN & CUNNINGHAM-BUSSEL 2013). V neposlední řadě jsou dalšími, s imunitním systémem úzce souvisejícími zdroji volných radikálů apoptóza či nekróza. V případě exogenních zdrojů se pak na vzniku RONS nejvíce podílí radiace a kontaminace životního prostředí a polutanty (STADTMAN 2004).

Tab. 1 – Hlavní zdroje produkce RONS(dle STADTMAN 2004)

Zdroje	Vzniklé RONS
Atmosférické znečištění	CO, O ₃ , NO ₂ , N ₂ O ₂
Oxidační fosforylace	O ₂ ^{•-}
Iradiace (X-, β-, γ-, UV)	O ₂ ^{•-} , HO [•] , ¹ O ₂
Přechodné kovy	HO [•] , H ₂ O ₂ , ferrylový ion
Záněty, neutrofily a makrofágy	OCl [•] , H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-} , NO, ONOO ⁻
Oxidázy	H ₂ O ₂
Metabolismus argininu	NO

1.1 Geneze nevýznamnějších volných radikálů v živých soustavách

Přítomnost dvouatomárního molekulárního kyslíku, nezbytného pro existenci aerobních organismů nebyla doposud v celém vesmíru prokázána na žádném objektu s výjimkou Země. Tento fakt tak poukazuje na skutečnost, že se jedná o molekuly vznikající výhradně jako vedlejší produkty fotosyntézy (BENZIE 2000). Samotný molekulární (dvouatomární) kyslík je jako takový v základním stavu relativně málo reaktivní. Aktivace vedoucí k zvýšení jeho reaktivity, resp. k vzniku radikálů může probíhat dvěma způsoby: 1. absorpcí energie vedoucí k obrácení spinu jednoho z nepárových elektronů (vznik singletového kyslíku) a 2. redukcí počtu elektronů (PITERKOVÁ ET AL 2005).

1.1.1 Průběh geneze volných radikálů

- **Superoxidový radikál** - Vznik přijetím volného elektronu molekulárním kyslíkem (např. OXPHOS)
- **Hydroperoxylový radikál** - Vznik protonací superoxidového radikálu vodíkem
- **Hydroxylový radikál** - Vznik během Fentonovy či Haber-Weissovy reakce za účasti atomů přechodných kovů (Cu, Fe)
- **Peroxylový a alkoxylový radikál** - Vznik při působení hydroxylového radikálu během peroxidace mastných kyselin
- **Oxid dusnatý a oxid dusičitý** - Vznik zejména činností enzymů syntáz NO (NOS, *Nitric oxide synthases*), společně se superoxidovým radikálem tvoří peroxyinitrit (ONOO⁻), v případě NO₂ vznik při reakci oxidu dusatého s kyslíkem, při reakci H₂O₂ tvoří rovněž peroxyinitrit

1.2 Oxidační poškození

V případě nedostačujících antioxidačních mechanismů, sloužících jako primární ochrana před působením volných radikálů, dochází v živých soustavách k oxidačnímu poškození. Tento proces může být jak reverzibilní, kdy jsou následky působení oxidačního stresu v buňkách opravovány reparačními mechanismy, tak ireverzibilní, tzn. vedoucí k apoptóze. Hlavními oblastmi působení volných radikálů jsou buněčné membrány, jaderná i mitochondriální DNA a proteiny. U všech tří z uvedených oblastí dochází vzhledem k jejich odlišné struktuře k různému působení oxidačního stresu. Např. v případě buněčných membrán, kde dochází vlivem působení RONS k peroxidaci lipidů, jsou terčem zejména polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), kde dochází narušování dvojných vazeb zodpovědných za fluiditu a propustnost membrán a také produkci reaktivních metabolitů, zejména pak lipoperoxylových a alkoxylových radikálů a také izoprostanů, oxysterolů a aldehydů jako např. malondialdehyd (MDA), či 4-hydroxynonenal (4-HNE), které se mohou dále podílet na modifikaci proteinů (MONTUSCHI ET AL 2004).

Při oxidaci DNA, na které se podílí převážně hydroxylový radikál, dochází zejména k štěpení kruhu deoxyribózy a k modifikacím bází, zejména guaninu. V případě chromozomů se pak oxidační stres podílí na zkracování telomer a tvorbě chromozomových mutací. V souvislosti právě s uvedeným zkracováním telomer bývá oxidační stres často brán jako jeden z hlavních mediátorů senescence. Nejznámějšími markery oxidačního poškození DNA jsou např. 8-hydroxyguanin, 8-hydroxyguanosin, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin a 5-hydroxymethyluracil. U proteinů se pak jedná např. o *o*-tyrosin, 3-nitrotyrosin, 3-chlortyrosin, *o,o'*-dityrosin (COOKE ET AL 2003; MONTGOMERY 2011).

Přítomnost těchto molekul však nemusí mít pouze nežádoucí účinky, účastní se totiž řady nejen patobiochemických pochodů v organismech. Nenahraditelná je jejich přítomnost nejen v již uvedených biochemických drahách tzn. v energetickém metabolismu buňky, kde fungují jako transmittery, resp. donory elektronů či v imunitním systému, ale významnou funkci plní radikály a jejich deriváty také v buněčné signalizaci (ROBINSON 2008). Např. při vzniku zygoty, kdy superoxidový radikál rozrušuje membránu vajíčka a peroxid vodíku blokuje vstup dalších spermií do vajíčka. Hydroxylový radikál vznikající v živých soustavách, mimo jiné také činností enzymu monooxygenázy, se podílí na hydroxylaci xenobiotik a steroidních hormonů. (MONCADA ET AL 1989)

1.3 Antioxidační mechanismy

Jako obrana vůči působení oxidačního stresu se u všech eukaryotických organismů žijících v aerobním prostředí vyvinuly určité bariéry sloužící k eliminaci nepříznivých účinků volných radikálů, popř. k reparaci jejich působení. Antioxidační obranu tvoří u eukaryotických organismů několikastupňový systém fyziologických bariér odpovídající de facto kategorizaci antioxidačních mechanismů dle funkce. Funkcí primárních obranných mechanismů je inhibice vzniku volných radikálů. Pokud je tato obranná bariéra překonána, uplatňují se sekundární a terciární antioxidanty. V případě sekundárních antioxidantů se jedná o tzv. scavengery – lapače či vychytávače vzniklých radikálů. Jako terciární antioxidanty jsou označovány molekuly zodpovědné za reparaci vzniklých poškození. Včetně funkční klasifikace, je možné antioxidanty členit také dle jejich struktury nebo lokalizace, resp. místa působení a také dle původu.

1.3.1 Klasifikace antioxidantů

1. dle funkce jsou antioxidanty členěny do tří výše uvedených skupin, tzn. na primární, sekundární a terciární antioxidanty
2. dle struktury jsou antioxidanty děleny do dvou skupin, a to na antioxidanty enzymatické povahy, kam náleží některé oxidoreduktázy, a na antioxidanty neenzymatické povahy
3. dle lokalizace lze antioxidanty členit na intracelulární, membránové a extracelulární
4. dle původu jsou členěny antioxidanty na endogenní – syntetizované a exogenní – získané z potravy

1.4 Oxidační stres jako hlavní mediátor senescence

V roce 1956 navrhl, a v letech 1984 a 1987 také posléze rozvinul, americký vědec Denham Harman hypotézu poukazující na možné souvislosti mezi působením oxidačního stresu a senescencí (HARMAN 1956). Tato dnes uznávaná teorie známá jako radikálová teorie stárnutí (*Free radical theory of aging*) se doznala několika modifikací, z nichž lze za nejvýznamnější považovat tyto dvě: 1. mitochondriální teorie stárnutí (*Mitochondrial theory of aging*) a 2. Metabolická teorie stárnutí (*Metabolic stability theory of aging*). Včetně samotné radikálové teorie stárnutí bývá oxidační stres často spojován také s telomerovou teorií stárnutí (*Telomere shortening theory of aging*) odkazující na situaci, při které jsou oxidací více stresované buňky nuceny k častějšímu dělení za účelem reparace poškození původních buněk. Tato situace může vést až k dosažení tzv. Hayflickova limitu, tzn. maximálního počtu dělení buňky. Tato hodnota je pro jednotlivé typy buněk specifická (SHAY & WRIGHT 2000). Obdobně platí, že délka telomer je u jednotlivých typů buněk variabilní a také, že jejich délka klesá s rostoucím věkem organismu (KOLIADA ET AL. 2015).

V souvislosti s těmito třemi teoriemi je tak oxidační stres chápán jako jeden z hlavních mediátorů senescence organismu, a to jak na buněčné, tak organismální úrovni (FINKEL & HOLBROOK 2000; COLAVITTI & FINKEL 2005; BALABAN ET AL 2005; MONAGHAN ET AL 2008). Společně s uvedenými, mezi sebou vzájemně propojenými mechanismy se na stárnutí podílejí také další procesy a to např. imunosenescence poukazující na negativní korelaci mezi klesající funkcí imunitního systému a rostoucí náchylností k výskytu infekcí či tumorů v souvislosti s biologickým věkem, anebo také hormonální regulace mající společně s nervovým systémem nenahraditelnou roli podílející se na vzájemné kooperaci všech typů funkčně specifických živých soustav (VLECK ET AL 2007). Závislost aerobních organismů na kyslíku, který je v důsledku strůjcem jejich konečného zániku je někdy označována jako kyslíkový paradox. Tento termín poukazuje na určité nevýhody existence živých soustav v aerobním prostředí, jež je i přes svou primárně vyšší evoluční vyspělost ve srovnání s životem v anaerobním prostředí více negativně ovlivňována pro sebe jinak nenahraditelnou substancí – kyslíkem. Kyslíkový paradox neboli paradox aerobního života tedy poukazuje na to, že aerobní organismy jsou na přítomnosti kyslíku závislé i přesto, že je ze své podstaty nebezpečný pro jejich existenci (DAVIES 1995).

2 Pohlavní výběr a evoluce ornamentů

Úspěšnost jednotlivých jedinců v pohlavním výběru může být ovlivněna mnoha faktory, a to jak abiotickými, resp. environmentálními, tak biotickými. Mezi environmentální aspekty ovlivňující úspěšnost v pohlavním výběru a následně také v hnízdění lze zařadit např. dostupnost zdrojů, anebo pozici hnízdního okrsku či samotného hnízda v rámci areálu výskytu populace či celého druhu. Mezi s předchozí skupinou úzce spjaté biotické faktory pak náleží poměrové zastoupení jednotlivých pohlaví v populaci, samotná úspěšnost v jak pre-, tak post-kopulačním pohlavním výběru, ale také akustická či vizuální signalizace, anebo např. predace. Nežřídká je právě vizuální signalizace, kam lze zařadit kondiční ornamentaci či také pohybové projevy, brána jako nejvhodnější ukazatel kvality jedinců v pohlavním výběru. Mezi ukazatele kvality jedince, plnící určitou roli v pohlavním výběru, lze v tomto případě zařadit jak zbarvení (pigmentózní i strukturní), tak také rozměry vybraných morfologických znaků. Význam těchto jednotlivých ukazatelů a jejich role v pohlavním výběru, jakožto sekundárních pohlavních znaků, je jak na interspecifické, tak často i na intraspecifické úrovni poměrně variabilní. Zatímco morfologické ornamenty jako např. délka rýdovacích per, složitě utvářená pera přítomná např. u čeledi *Paradisaeidae* či různé výrůstky (chocholky, hřebínky, kožní laloky aj.) mají významnou roli zejména u monochromatických druhů s výraznějším pohlavním dimorfismem, zbarvení má výraznější funkci naopak spíše u dichromaticky zbarvených druhů. Jako taková je kondiční ornamentace ovlivňována jak geneticky, tak prostředím. Samotný pohlavní výběr je obecně chápán jako zvláštní typ přirozeného výběru poukazující na význam pohlavního rozmnožování, jako mechanismu zodpovídajícího za upřednostňování z fenotypového hlediska kvalitnějších a zpravidla nápaditějších jedinců jednoho pohlaví před ostatními. Jak již vychází z názvu tohoto evolučního procesu, je pohlavní výběr uplatňován pouze u pohlavně se rozmnožujících skupin. Přirozený výběr přitom poukazuje na větší význam genotypu před fenotypem a není tedy nijak přímo ovlivňován primárními ani sekundárními pohlavními znaky (GELDANI & DAVIN 2013; HOQUET 2015).

2.1 Role ornamentů v pohlavním výběru

Význam kondiční ornamentace v pohlavním výběru podporuje několik hypotéz, jako např. hypotéza dobrých genů (*Good genes hypothesis*) nebo tzv. hypotéza „sexy syna“ (*Sexy son hypothesis*) navržená v r. 1930 anglickým biologem a matematikem Ronaldem Fischerem, podle kterých jsou zbarvením tvořené ornamenty brány jako nejvýznamnější ukazatele signalizující kvality jedince. Obě tyto hypotézy také poukazují na vysokou míru dědičnosti těchto znaků (MØLLER & ALATALO 1998; MEAD & ARNOLD 2004). Dalšími hypotézami podporující majoritní význam ornamentů v pohlavním výběru jsou pak hypotéza od Hamiltona a Zuka z roku 1982 (*Hamilton-Zuk hypothesis*) nebo hypotéza mitonukleární kompatibility (*Mitochondrial compatibility hypothesis of sexual selection*). Třetí uvedená hypotéza potvrzuje korelaci mezi kondičními signály a jejich funkcí ukazatelů rezistence vůči parazitům a nemocem (HAMILTON & ZUK 1982; BALENGER & ZUK 2014; MØLLER 1990). Hypotéza mitonukleární kompatibility pak poukazuje na propojenost, s produkcí ROS a samotným oxidačním stresem úzce spjatých, OXPHOS komplexů a samotných investic jedinců do kondičních ornamentů (HILL & JOHNSON 2013). Také hypotéza imunokompetentního handicapu (*Immunocompetence handicap hypothesis*) poukazuje, podobně jako hypotéza mitonukleární kompatibility, na vztah ornamentace a kondice jedince. Spojitost mezi ornamentací a kondicí vysvětluje skrz vliv testosteronu na organismus. Testosteron podporuje rozvoj sekundárních pohlavních znaků, ale zároveň také působí v souvislosti s produkcí kortikosteronu imunosupresivně a mj. negativně ovlivňuje antioxidační mechanismy (ALONSO-ALVAREZ ET AL 2007; ROBERTS ET AL 2007). Další hypotézou vysvětlující význam ornamentice a její role v pohlavním výběru je hypotéza či teorie signálu kvality (*Signalling theory*). Tato teorie opírající se o hypotézu dobrých genů, ale také o hypotézu handicapu (ZAHAVI 1974), vysvětluje přítomnost ornamentů jakožto přímých indikátorů kvality jedince. Podobně jako u Fischerovy hypotézy jsou atraktivnější jedinci samci s rozvinutějšími ornamenty, avšak nošení a nákladnost do značné míry limitují či jak uvádí Zahavi handicapují samotného nositele (ANDERSSON & SIMMONS 2006; COTTON ET AL 2003). Na rozdíl od Fischerovy hypotézy, je však v tomto případě exprimace daných ukazatelů kondičního stavu jedince podmíněna nejen geneticky, ale také environmentálně (GRUNST ET AL 2014). V případě všech výše uvedených hypotéz jde také o přímé důkazy výběru partnera podle fenotypu. Existují však také hypotézy, podle nichž nehraje rozhodující roli v úspěšnosti v pohlavním výběru samotné zbarvení. Mezi tyto hypotézy náleží např. hypotéza přímého výběru (*Direct*

selection hypothesis) platná např. u monogamních a zároveň teritoriálních druhů (HALL ET AL 2004) nebo hypotéza fluktuální asymetrie (*Fluctuating asymmetry hypothesis*) předpokládající čestnost kondičních ornamentů a úspěšnost v pohlavním výběru založenou na přítomnosti více autonomních ornamentů (MØLLER & POMIANKOWSKI 1993). Na základech této hypotézy byly následně navrženy ještě další tři a to: 1. *Multiple message hypothesis*, 2. *Redundant signal hypothesis* a 3. *Unreliable signal hypothesis* (PTÁČKOVÁ 2016).

Samotný evoluční původ kondiční ornamentace a její význam v pohlavním výběru u sexuálně dimorfních druhů se snaží vysvětlit hned několik hypotéz. První hypotéza, jejíž autorem je stejně jako v případě hypotézy „sexy syna“ Ronald Fischer, nazývaná právě podle svého autora Fischerova hypotéza („*Fischer's runaway*“), je platná u sexuálně dimorfních druhů. Tato myšlenka odůvodňuje vznik ornamentace za účelem zvýšení atraktivity a úspěšnosti v pohlavním výběru. Zároveň také potvrzuje vyšší úspěšnost a také fitness u jedinců, resp. samců s rozvinutějšími ornamenty. Exprimace těchto znaků však neukazuje s reálnou kvalitou samců. Obdobně jako hypotéza „sexy syna“ rovněž poukazuje na vyšší predaci samicemi preferovanějších samců s rozvinutějšími ornamenty (ANDERSSON & SIMMONS 2006).

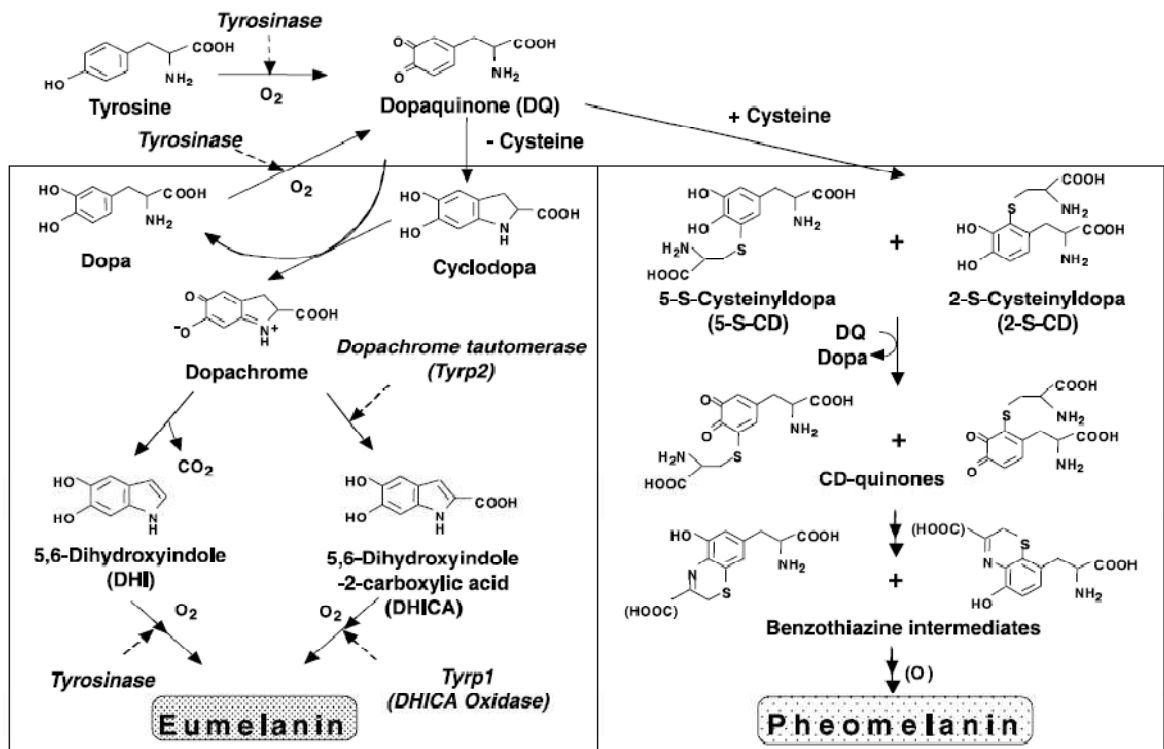
Druhá z hypotéz, hypotéza smyslového tahu (*Aesthetic and Sensory bias*), předpokládá, že samice mají predispozice preferovat určitý znak (stimul), který se vyvinul v průběhu evoluce druhu, ale ne v souvislosti s pohlavním výběrem. Lze zde rovněž předpokládat pravděpodobnost vyššího úspěchu v pohlavním výběru u samců fenotypicky podobnějších samicím. Takto specifikovaná preference, označována též jako skrytá, bývá odůvodňována přítomností tzv. sobeckého genu (BULLOCK & CLIFF 1997; FULLER ET AL 2005). Velký význam zde bývá přisuzován také symetrii preferovaných znaků (ENQUIST & ARAK 1994; MØLLER 1992).

2.2 Mechanismy zbarvení u ptáků

2.2.1 Pigmentové zbarvení

Ve spojitosti s počtem mechanismů zodpovědných za zbarvení jsou ptáci nejdíverzifikovanější skupinou mezi obratlovci. Tyto mechanismy jsou obecně děleny do dvou skupin a to na 1. pigmentová a 2. strukturní zbarvení. Do první z uvedených skupin, tzn. mezi pigmentová zbarvení, bývají obecně zařazovány celkově čtyři typy, a to: melaninové zbarvení, karotenoidní, porfyrinové a v poslední řadě se jedná o psittacofulviny. Melaniny, zastoupené mezi obratlovci eumelaninem či pheomelaninem, tvoří skupinu pigmentů endogenního původu syntetizovaných z fenylalaninu či oxidací a následnou polymerizací tyrosinu. Exprese těchto pigmentů probíhá ve specializovaných buňkách – melanocytech, a je regulována výhradně geneticky (ITO 2003). Na rozdíl od ostatních mechanismů zbarvení přítomných u ptáků, regulují syntézu jak eu-, tak pheomelaninu pleiotropní geny POMC (SAINO ET AL 2013). Podle fosilních dokladů jsou melaniny přítomny u ptáků a jejich evolučních předchůdců minimálně 160 mil. let a s největší pravděpodobností se také jedná o původní mechanismus zbarvení u všech obratlovců (THOMAS ET AL 2014).

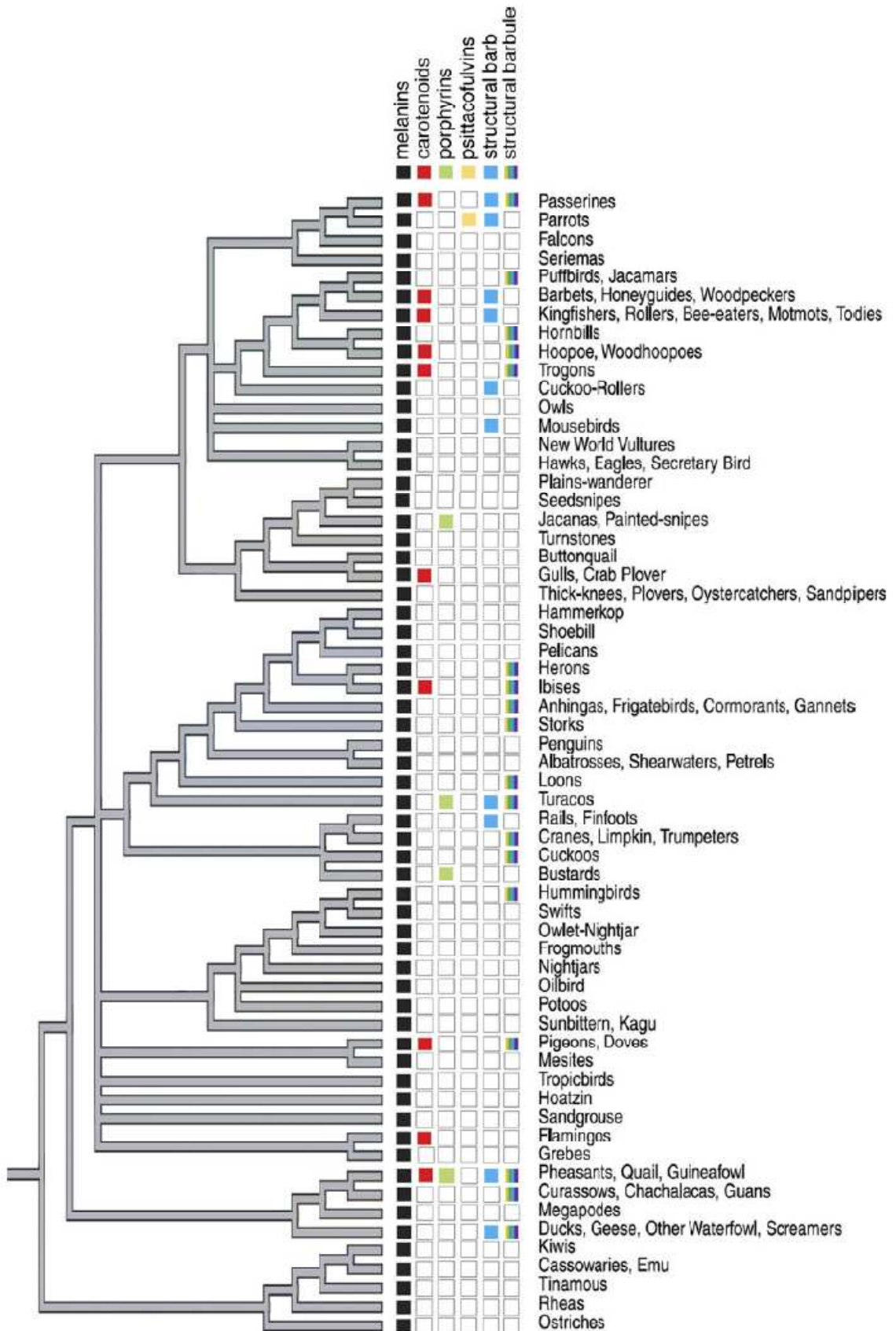
Obr. 1 – Biosyntéza melaninových pigmentů (převzato z ITO 2003)



Dalším typem zbarvení u ptáků jsou karotenoidy. Karotenoidní zbarvení, resp. pigmenty zodpovědné za tento typ zbarvení, jsou obecně brány na rozdíl od ostatních typů jako pigmenty exogenního původu, nejsou tedy syntetizovány de novo, ale získávány z potravy. Podle několika studií však také dochází u několika ptačích čeledí, konkrétně *Cotingidae*, *Eurylaimidae* a *Pipridae*, k přímé syntéze karotenoidů de novo (LAFOUNTAIN ET AL 2015; HUDON ET AL 2012). Evoluční stáří tohoto mechanismu zbarvení u ptáků není doposud určeno, v rámci recentních skupin ptáků se však jedná o celkově druhý nejběžnější mechanismus zbarvení vyskytující se v 13 z 39 řádů a v 95 z 230 čeledí (THOMAS ET AL 2014). Celkový počet karotenoidních pigmentů podílejících se na zbarvení u některých skupin ptáků není doposud přesně stanoven, McGraw však uvádí ve své studii celkem 24 typů karotenoidů (HILL & MCGRAW 2006). Obecně jsou karotenoidy děleny do dvou skupin, a to na karoteny zodpovědné podobně jako pheomelanin za načervenalé zbarvení a xantofyly způsobující žluté zbarvení (KRISHNASWAMY & NEELAKANTAN 2012). Inkorporace samotných karotenoidů do zbarvení je regulována celkově třemi skupinami genů, a to 1. geny zodpovědné za příjem karotenoidů, 2. geny podílející se na depozici karotenoidů a 3. geny odbourávající karotenoidy (WALSH ET AL 2011). Vedle možnosti či nemožnosti syntézy dvou nejvýznamnějších skupin pigmentů de novo, jsou významnými faktory ovlivňující jejich kvantitu také věk jedince a s ním související rychlost metabolismu a v případě karotenoidů také dostupnost zdrojů (HILL 1995). Včetně role pigmentů pak mohou karotenoidy, v případě jejich nezabudování do zbarvení, plnit také funkci antioxidantů (MARTÍNEZ ET AL 2009; ISAKSSON & ANDERSSON 2007).

Ve srovnání s předchozími dvěma mechanismy méně rozšířenými dvěma typy pigmentového zbarvení jsou porfyriny a psittacofulviny. Porfyriny zodpovědné, jak za zbarvené peří (turacoverdin, turacin, coproporfyryl), tak rovněž za barvitost vaječné skořápky (protoporfyryl), mohou být jak endogenního, tak exogenního původu (BEREITER-HAHN ET AL 1986). Endogenně syntetizované porfyriny mohou vznikat během katabolismu hemoglobinu v játrech, de novo za přítomnosti glycinu, anebo ve vejcovodu, kde se posléze podílí na zbarvení vaječných skořápek (FLORKIN ET AL 1978). Poslední psittacofulviny tvoří unikátní skupinu pěti pigmentů s výskytem pouze u řádu *Psittaciformes*. Podobně jako u karotenoidního zbarvení zde platí, že se u jedinců či samotných druhů se sytější zbarveným peřím nachází vyšší koncentrace těchto pigmentů, než u skupin méně zřetelným zbarvením. Přímou syntézu těchto pigmentů de novo podporuje jejich absence v krevní plazmě (MCGRAW & NOGARE 2004).

Obr. 2 – Výskyt jednotlivých typů zbarvení mezi ptáky (dle STODDARD & PRUM 2011)



Včetně čtyř uvedených typů pigmentového zbarvení jsou u několika ptačích čeledí či řádů uváděny také další dva mechanismy. V prvním případě se jedná o rezavé zbarvení, vyskytující se u cca 120 druhů náležících do řádů *Anseriformes*, *Falconiformes* a *Ralliformes*, za které zodpovídá přítomnost oxidu železitého v půdách, konkrétně ve ferralsolech. Oxid železitý je odtud přenášen a následně akumulován v jednotlivých vrstvách peří (BEREITER–HAHN ET AL 1986; NEGRO ET AL 1999). Za poslední doposud zjištěný mechanismus zbarvení prokázaný pouze u řádu *Sphenisciformes* zodpovídá pterinům podobný, pro tento řád unikátní typ pigmentů, označovaný jako sphenisciny (THOMAS ET AL 2012, MCGRAW ET AL 2007).

2.2.2 Strukturální zbarvení

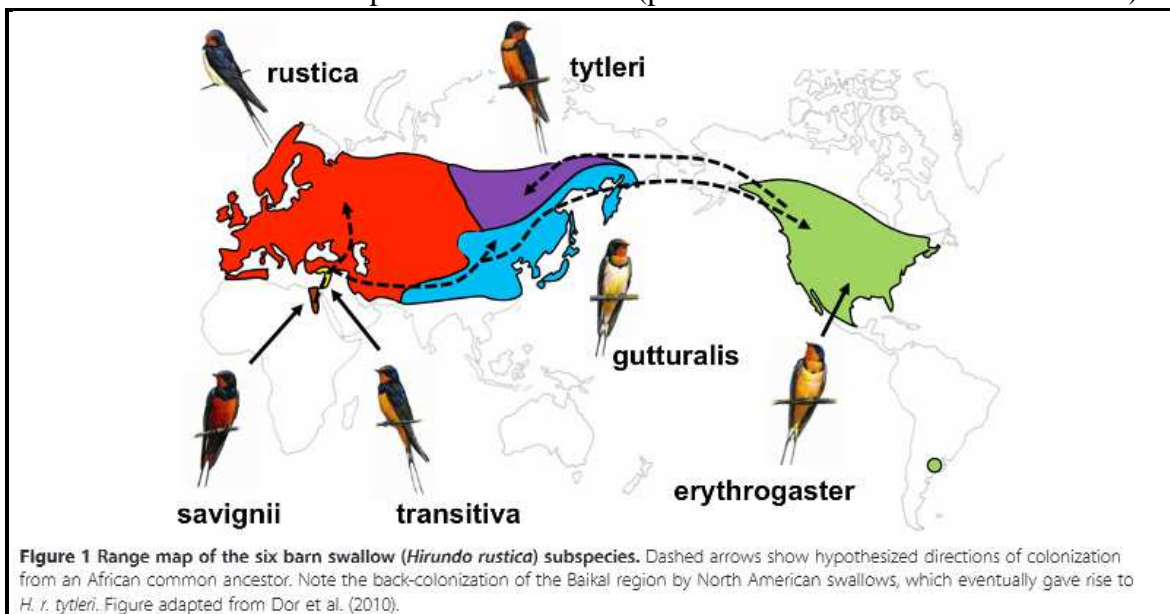
Druhým typem zbarvení u ptáků je strukturální zbarvení. Označení tohoto typu zbarvení, souvisejícího mj. také s přítomností tetrachromatického vidění, jako strukturální poukazuje na význam nejen pigmentace tělního povrchu ptáků, ale také na schopnosti reflektance určité části ultrafialového (UV) vlnění. Právě uvedený tetrachromatismus, tzn. přítomnost čtyř druhů čípků, zodpovídá za možnost vidění v UV spektru (RAJCHARD 2009). Zastoupení jednotlivých typů čípků je však v důsledku evolučních tlaků a ekologických adaptací mezi jednotlivými skupinami variabilní. Mezi hlavní faktory určující poměrové zastoupení jednotlivých typů čípků v očích patří doba aktivity, struktura biotopu a potravní strategie a specializace (HÅSTAD ET AL 2004). Variabilní však není mezi druhy pouze kvantita jednotlivých očních čípků, ale také samotný rozsah UV spektra, v které jsou dané druhy schopné vnímat (ZEIGLER & BISCHOF 1993). Vznik tetrachromatismu umožňující vidění v UV spektru není doposud zcela objasněn, existují však minimálně tři hypotézy poukazující na jeho možný význam. První hypotéza poukazuje na možnost synchronizace cirkadiálního systému a také význam UV záření při orientaci v prostoru při využívání slunečního kompasu, který s dalšími faktory jako např. geomagnetické pole Země značně ovlivňuje dráhy letu migrujících druhů. Dalšími oblastmi, kde by mohlo mít UV záření určitý význam, jsou potravní chování nebo také signalizace mezipohlavních interakcí v pohlavním výběru (BENNETT & CUTHILL 1994; CHURCH ET AL 2001; RAJCHARD 2009).

Jako takové lze strukturální zbarvení členit do dvou podskupin, a to na: 1. iridescentní zbarvení a 2. neiridescentní zbarvení. První z uvedených – iridescentní zbarvení se na rozdíl od neiridescentního mění s úhlem dopadajícího světla a jeho následnou reflektancí (OSORIO & HAM 2002). Neiridescentní barvy jsou naopak nezávislé na úhlu dopadu záření, odráží záření kratších vlnových délek a produkují tyrkysové, modré, fialové a také UV zbarvení (PRUM ET AL. 1999).

3 Modelový druh

Modelovým druhem této studie zkoumaným z hlediska vztahu kondiční signalizace, resp. její nákladnosti a pohlavního výběru je vlaštovka obecná (*Hirundo rustica*). Jedná se o nejrozšířenější druh čeledi *Hirundinidae* s téměř kosmopolitním rozšířením a s 6 poddruhy (*H. r. rustica*, *H. r. erythrogaster*, *H. r. transitiva*, *H. r. savignii*, *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri*) (SCORDATO & SAFRAN 2014). U všech z těchto 6 poddruhů bylo prokázáno, že využívají v rámci pohlavního výběru odlišné ornamenty (SAFRAN & MCGRAW 2004). Určité rozdílnosti se vyskytují nejen mezi jednotlivými poddruhy, ale také v rámci samotných poddruhů. Např. u asijského poddruhu *Hirundo rustica gutturalis*, resp. u japonských populací tohoto poddruhu, kde plní roli hlavních ukazatelů kvality – kondičních ornamentů samců zbarvení hrudi a bílé skvrny na ocasních perech, byl zjištěn latitudinální gradient ve velikosti uvedených kondičních ornamentů, tzn. ve zbarvení hrudi a u bílých skvrn v ocasní oblasti. Mezi těmito ornamenty byl v rámci latitudinálního gradientu také prokázán antagonistický vztah. Zatímco ve vyšších zeměpisných šířkách, tzn. v severnějších oblastech Japonska, plní významnější roli v pohlavním výběru rozsah bílých skvrn na ocasních perech, tak u jižněji žijících populací tuto funkci zastává rozsah červených skvrn v hrudní oblasti (HASEGAWA & ARAI 2013).

Obr. 3 – Hnízdní distribuce poddruhů *H. rustica* (převzato z SCORDATO&SAFRAN 2014)



Rovněž u eurasijského poddruhu *H. r. rustica*, který je průměrně největší, s nejsvětlejším zbarvením ventrální části těla a také s nejdelšími ocasními pery, nacházíme určitý vztah latitudinálního gradientu a kondiční ornamentace (HASEGAWA & ARAI 2013). Hlavní roli v pohlavním výběru zde podle Møllera neplní, jako u již probíraného východoasijského poddruhu *H. r. gutturalis*, zbarvení hrudi a bílé skvrny na ocasních perech, ale délka samotného ocasu. U samců z populací žijících v severnějších oblastech, např. na území skandinávského poloostrova, nacházíme průměrně delší ocasní pera než u populací žijících v jižnějších částech areálu, a to i přesto, že délka těchto per může být významně limitujícím faktorem handicapující letové schopnosti jedinců (MØLLER 1994). Mj. poukazuje Møller ve svých studiích také na spojitost délky ocasních per samců s úspěchy v mimopárové paternitě (EPP; *Extra-Pair Paternity*), kdy samci s delšími ocasními pery mají vyšší reprodukční úspěch, než samci s pery kratšími (MØLLER ET AL 1997; MØLLER & TEGELSTRÖM 1997).

Samotná mimopárová paternita není mezi ptáky nijak vzácný jev, a to i přesto, že drtivá většina ptačích podčeledí (93 %) je označována za primárně monogamní (LACK 1968 in GRIFFITH ET AL 2002). Vlaštovka obecná však není jediným druhem své čeledě, u kterého byla doložena EPP, dalšími druhy u kterých byla v rámci populačních studií doložena tato strategie zvyšování individuální fitness, jsou např. jiříčka obecná (*Delichon urbica*) (RILEY ET AL 1995), vlaštovka australská (*Petrochelidon ariel*) (MARATH ET AL 2002) nebo také vlaštovka stromová (*Tachycineta bicolor*) s rozšířením v téměř celé nearktické oblasti (KEMPENAERS ET AL 2000).

Jak již bylo uvedeno, signifikance všech z tří uvedených kondičních ornamentů (délka ocasních per, rozsah bílých skvrn na kostřci a zbarvení ventrální části trupu) se u jednotlivých poddruhů vlaštovky obecné poměrně liší. Zatímco u poddruhů náležících do tzv. euro-mediteránního kladu, zahrnujícího *H. r. sangvini*, *H. r. transitiva* a *H. r. rustica*, plní roli hlavního kondičního ornamentu a ukazatele kvalit jedinců délka ocasních per, u zbylých poddruhů označovaných souhrnně jako asijsko-americký klad jako hlavní ornament funguje sytost zbarvení hrudi (*H. r. tyleri* a *H. r. erythrogaster*) nebo velikost bílých skvrn na ventrální straně ocasních per (*H. r. gutturalis*) (DOR ET AL 2009; VORTMAN ET AL 2011; SCORDATO & SAFRAN 2014). Poslední z uvedených poddruhů bývá navíc některými ornitology vzhledem ke své variabilitě ve zbarvení rozlišován na několik dalších samostatných poddruhů, a to: *H. r. gutturalis*, *H. r. saturata*, *H. r. mandschurica* (DELHOYO & ELLIOTT 2014).

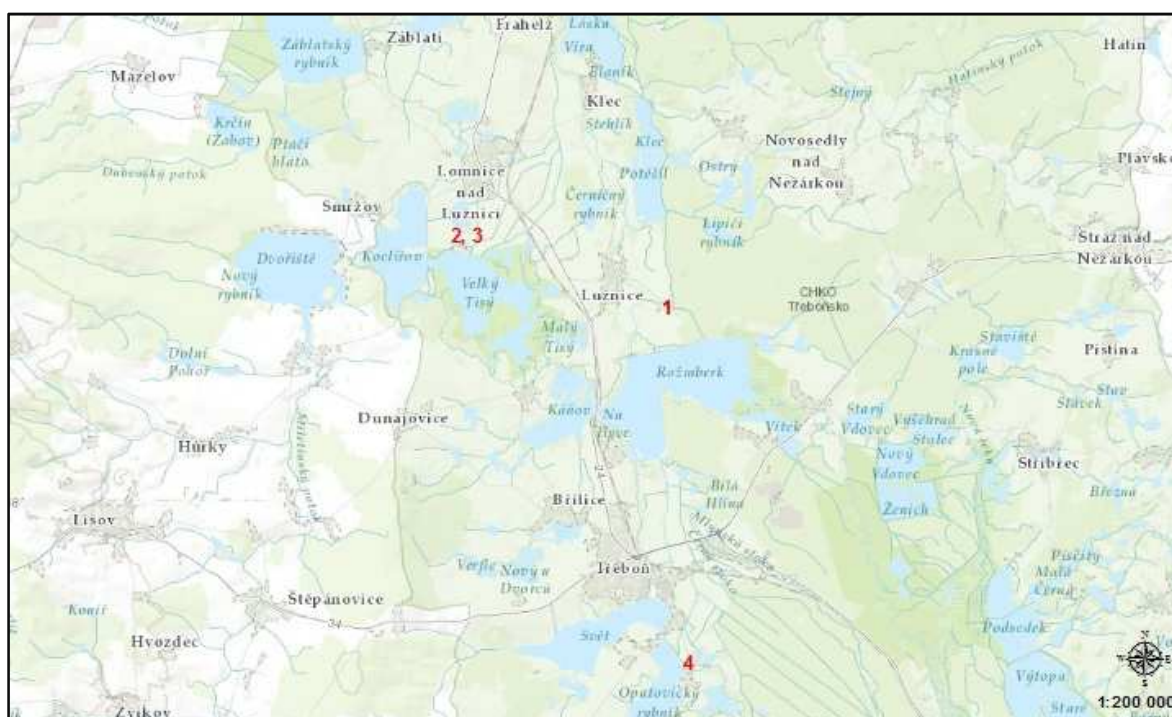
Také při několika studiích zabývajících se přímým působením radiace (zejména γ záření), resp. exogenních zdrojů oxidačního stresu na živé soustavy byla zvolena jako modelový druh vlaštovka obecná (*Hirundo rustica*), konkrétně se jedná o populace žijící v oblastech ovlivněných haváriemi v jaderných elektrárnách Černobyl a také Fukušima (BONISOLI-ALQUATI ET AL 2009 & BONISOLI-ALQUATI ET AL 2014). Mimo tyto studia poukazující na vysoké hladiny RONS a relativně vysoké četnosti výskytu mutací, včetně albinismu a nádorů (MØLLER ET AL 2012), byly v Černobylu prováděny také výzkumy zkoumající fertilitu spermií, kde byla zjištěna mj. u 76 z 566, tzn. u více než 13 % odchycených samců z celkového počtu 24 různých druhů úplná redukce spermatogeneze (MØLLER ET AL 2014). Následující experimentální studie probíhající během hnízdní sezóny na samicích novosvětského poddruhu (*H. r. erythrogaster*) poukazuje, v souvislosti s kondiční ornamentací u samců, na význam sytosti zbarvení hrudi, která přímo koreluje s mírou oxidačního poškození. Jako kontrolní skupina zde byly stanoveny samice s temnějším a sytější zbarvením hrudi signalizující nižší oxidační poškození, zatímco do experimentální skupiny náležely samice, jejichž ve srovnání s kontrolní skupinou světlejší hrud' byla nabarvena, resp. ztmavena. Efekt ztmavení ventrální části těla měl za následek relativně rapidní pokles míry oxidačního poškození a zároveň poukazuje na určitý sociální mechanismus ovlivňující právě míru oxidačního stresu (VITOUSEK ET AL 2013).

Další oblastí výzkumu zabývajících se biologií tohoto druhu je vztah imunitního systému a hladin různých, nejčastěji stresových či pohlavních hormonů a jejich vliv na fenotyp nebo také na úspěšnost v pohlavním výběru. Studium této oblasti se do značné míry věnuje italský evoluční biolog Nicola Saino. V jedné ze svých studií Saino dokládá pozitivní korelaci mezi větším množstvím parazitů u samců se sytější zbarvenými ornamenty a s tím také související vyšší hladiny steroidních hormonů, zejména testosteronu. V případě samotných determinovaných hmyzích parazitů, resp. ektoparazitů se jednalo o dva druhy z čeledi lutoušovití (*Menoponidae*) a ptakotrudku dvoualaločnou (*Ornithomya biloba*) z čeledi klošovití (*Hippoboscidae*). (SAINO ET AL 1994). Dalšími faktory silně ovlivňujícími hladiny hormonů jsou pak také obranné a agresivní chování či přímé reakce imunitního systému na přítomnost patogenu, tzn. reakce na neoptimální či stresující podmínky vedoucí k automatickému zvýšení metabolické aktivity a s tím související produkci RONS (SAINO ET MØLLER 1995).

4 Materiál a metodika

Sběr dat k tomuto výzkumu probíhal v letech 2012 – 2013 a byl prováděn na několika populacích, výše uvedeného modelového druhu – vlaštovky obecné, hnízdících v okolí města Třeboň v jižních Čechách. Celkově se čtyři vybrané lokality nacházely na katastrálním území tří obcí, a to: Lužnice, Lomnice nad Lužnicí a samotné město Třeboň. Všechny zkoumané populace využívaly k hnízdění hospodářsky využívané budovy.

Obr. 4 – Lokalizace hnízdišť vybraných populací



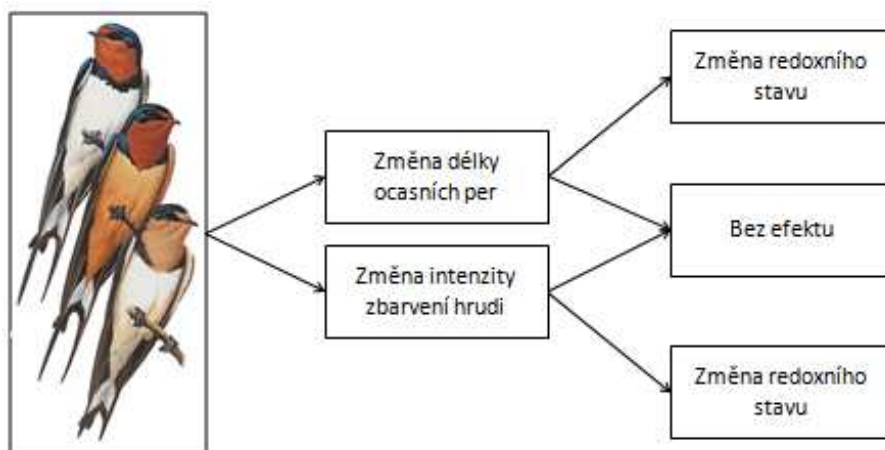
Označení lokalit na mapě: 1 – Hamr, 2 a 3 – Šaloun, 4 – Hřebčín Obora

4.1 Experimentální část

Experiment, jehož součástí byly mj. manipulace s kondičními ornamenty samců vlaštovky obecné, byl stejně jako sběr dat prováděn na vybraných hnízdištích v jižních Čechách. Manipulovanými ornamenty v tomto případě byly rýdovací pera a od r. 2014 také hrud', konkrétně zbarvení hrudi. Rýdovacím perům byla u přibližně dvou třetin odchycených jedinců změněna jejich délka. Jedné polovině v tomto případě manipulovaných jedinců byla pera zkrácena, zatímco druhé polovině naopak prodloužena. Zbývá třetina byla ponechána jako kontrolní skupina. Údaje potřebné pro tento výzkum, testující hypotézu ornamentace jako signálů kvality jedince a její roli v pohlavním výběru, byly získávány z krve, pomocí spektroskopické analýzy sytosti zbarvení různých částí těla a v poslední řadě také z morfologických vlastností. Samotné krevní vzorky byly do odebrání ukládány do kapalného dusíku. Před analýzou, prováděnou probíhající na detašovaném pracovišti Ústavu biologie obratlovců AV ČR v. v. i. ve Studenci, byly vzorky uloženy v hlubokomrazících boxech, při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Korelace výše uvedených parametrů by měly prokázat vzájemnou propojenost nákladnosti investic jedinců do ornamentů, jakožto signálů kvality, a metabolismu. V tomto případě zejména vztah délky rýdovacích per, pheomelaninového zbarvení a hladin enzymů (GPx a SOD). Zde je třeba zmínit také nutnou přítomnost cysteinu pro možnost syntézy dvou z uvedených korelátů, a to pheomelaninu a glutationu, lze zde tedy předpokládat negativní korelaci mezi těmito parametry (GALVAN & SOLANO 2009).

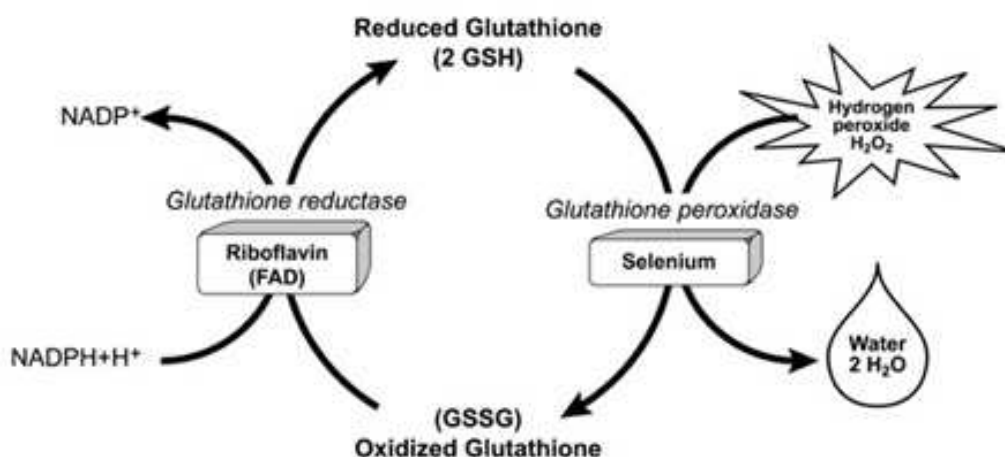
Obr. 5 – Možné důsledky manipulací na organismus



4.1.1 Měření aktivity vybraných enzymů

V případě erytrocytů, oddělených od ostatních krevních elementů centrifugací o délce 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu, byly stanoveny hladiny dvou enzymů, oxidoreduktáz a to, glutathion peroxidázy (GPx) a superoxid dismutázy (SOD). Enzym SOD zodpovídá za inhibování množství superoxidového radikálu ($O_2^{\bullet-}$) a jeho přeměnu na méně reaktivní a toxický peroxid vodíku (H_2O_2). Na následné redukci H_2O_2 se, společně s dalšími molekulami, podílí glutathion. Tripeptid tvořen kyselinou glutamovou, již zmíněným cysteinem a glycinem. Právě tento tripeptid, resp. jeho redukováná forma (GSH) zodpovídá za přítomnosti GPx za již uvedenou přeměnu H_2O_2 na vodu a molekulární kyslík. Oxidovaná forma glutathionu (GSSG) je pak enzymem glutathion reduktázou (GR) zpětně přetvářena na redukovanou formu GSH, která se následně opět zapojuje do eliminace H_2O_2 . Samotný poměr redukovaných a oxidovaných forem glutathionu (*GSH:GSSG ratio*) je obecně brán jako důležitý ukazatel redoxního stavu a také celkového stavu buněk. V cytosolu buněk typických pro všechny skupiny obratlovců se poměr zastoupení redukované a oxidované formě glutathionu pohybuje obvykle kolem hodnot 30-100:1, ale např. v endoplasmatickém retikulu dosahuje tento poměr hodnot až 1:1 či 3:1 (POMPELLA ET AL 2002). Pro stanovení aktivity SOD byly použity protokoly od PESKIN & WINTERBOURN (2000) a v případě měření GPx byla použita metoda od PAGLIA & VALENTINE (1967) a FARAJI ET AL (1987). Před samotným experimentem byly vzorky naředěny v poměru 1:15. Finální koncentrace vzorků před samotným měřením dosahovala těchto hodnot: v případě GPx 1:60 a v případě SOD 1:600.

Obr. 6 – Průběh oxidace a zpětné redukce glutathionu



4.1.2 Statistické vyhodnocení výsledků

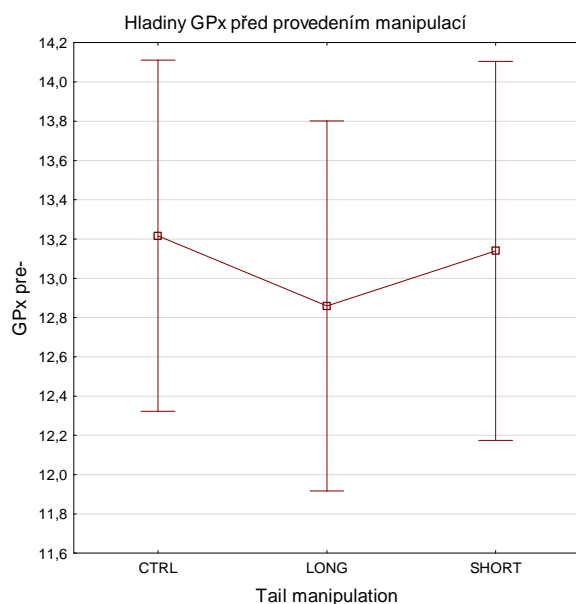
Pro statistickou analýzu získaných údajů byl použit program STATISTICA 12. Jako základní krok statistického vyhodnocování byla neparametrickým testem provedena analýza korelací jednotlivých proměnných, které byly rozděleny do čtyř kategorií, a to na: 1. hladiny vybraných oxidoreduktáz (GPx, SOD), 2. morfometrické údaje, 3. údaje charakterizující zbarvení ventrální části a 4. údaje charakterizující rozsahy bílých skvrn přítomných na ocasních perech. Po provedení analýzy byly vybrány nejvýznamnější korelace mezi jednotlivými proměnnými. Tyto proměnné byly následně za použití obecných lineárních modelů vybrány pro analýzu vzájemných závislostí. Chybové úsečky uvedené v grafech vyznačují 95% intervaly spolehlivosti.

5 Výsledky

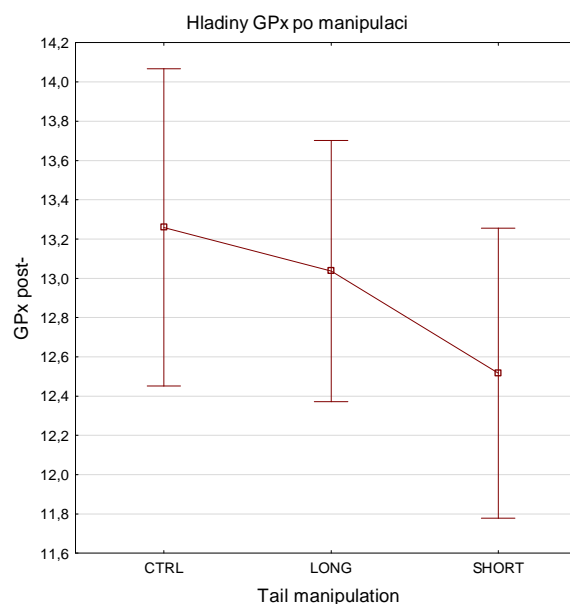
5.1 Vliv manipulací na hladiny vybraných oxidoreduktáz

5.1.1 Vliv manipulací na hladiny glutation peroxidázy

Graf 1.



Graf 2.

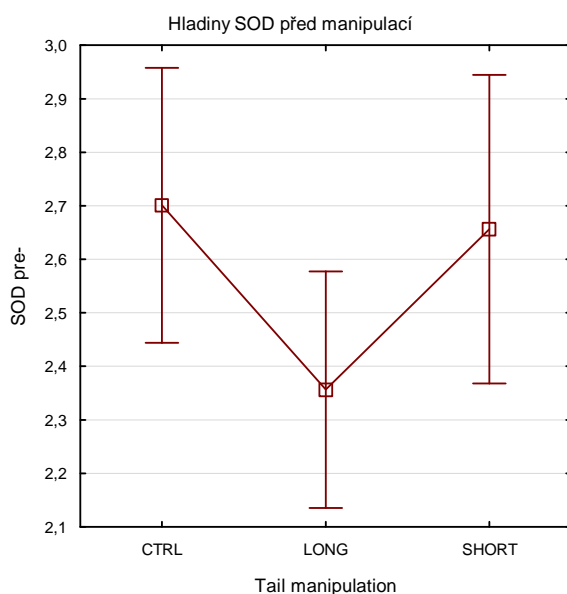


Grafy 1 a 2 ukazují minoritní význam vlivu manipulace s rýdovacími pery na hladiny GPx. Opakovatelnost mezi jednotlivými měřeními vzorků odebraných před a po manipulaci dosahuje 83,77 %. Odběr vzorků byl prováděn v rozpětí 2 – 4 týdnů. Kompletní analýza hladin GPx byla provedena v rozpětí 8 dní. U vzorků měřených před samotným experimentem dosahuje opakovatelnost hodnoty 88,61 %.

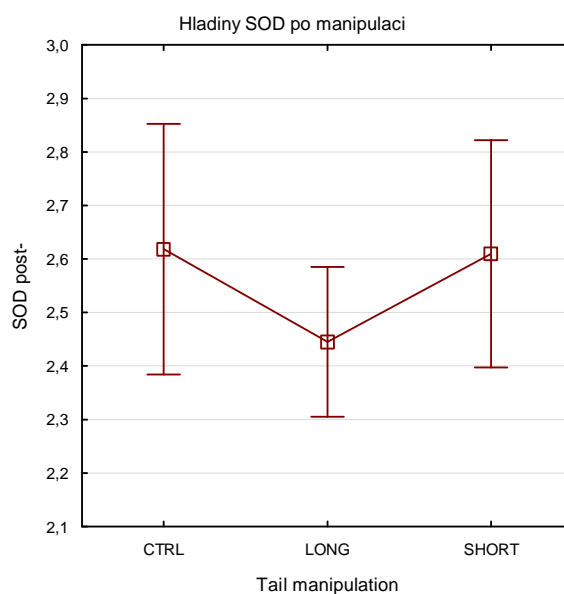
Pozn.: Naměřené hodnoty hladin GPx nejsou přepočteny a uvedeny v jednotkách koncentrace [$\mu\text{mol/g}$].

5.1.2 Vliv manipulací na hladiny superoxid-dismutázy

Graf 3.



Graf 4.

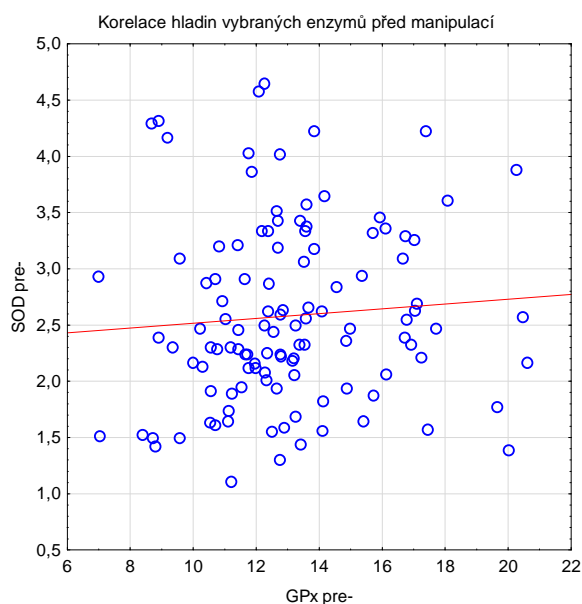


Podobně jako v případě GPx, tak také variabilita hladin SOD měřených před a po manipulaci nevykazuje významné rozdíly (grafy 3 a 4). Opakovatelnost měření prováděných během experimentální fáze dosahuje 77,33 %. Odběr vzorků byl stejně jako v případě GPx prováděn v rozpětí 2 – 4 týdnů a kompletní analýza hladin SOD byla provedena během 2 dní. Opakovatelnost u vzorků měřených před experimentální částí dosahovala hodnoty 84,00 %.

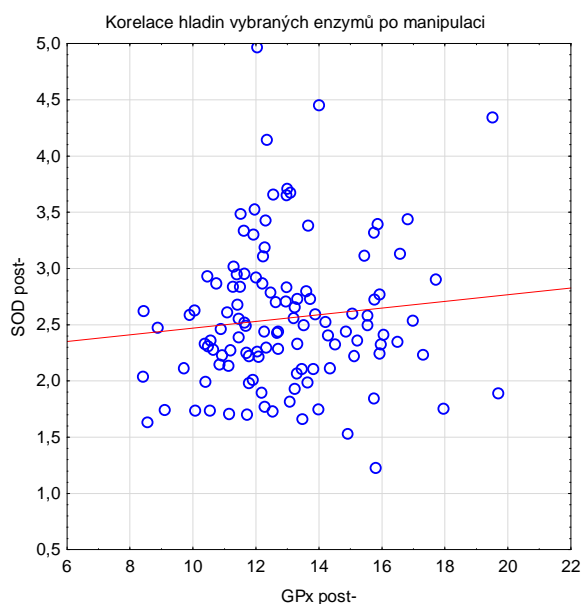
Pozn.: Naměřené hodnoty hladin SOD nejsou přepočteny a uvedeny v jednotkách koncentrace [$\mu\text{mol/g}$].

5.1.3 Vzájemné vztahy hladin měřených oxidoreduktáz

Graf 5.



Graf 6.



Vzájemné vztahy hladin samotných analyzovaných oxidoreduktáz rovněž nevykazují významné korelace, viz grafy 5 a 6. V prvním případě, tzn. v případě hladin enzymů měřených před manipulací, nesignifikanci potvrzují tyto hodnoty: $p = 0,4227$ a $r = 0,0755$. V případě měření hladin enzymů po manipulaci pak dosahovaly tyto ukazatele těchto hodnot: $p = 0,2619$ a $r = 0,1050$. Nevýznamnost vztahů korelovaných hladin oxidoreduktáz však lze vysvětlit odlišnou funkcí a výrazně odlišnou katalytickou schopností SOD a GPx.

Pozn.: Naměřené hodnoty hladiny SOD a GPx nejsou přepočteny a uvedeny v jednotkách koncentrace [$\mu\text{mol/g}$].

5.2 Analýza vztahů mezi antioxidanty a nákladností ornamentů

5.2.1 Analýza vztahů mezi antioxidanty a morfologickými znaky

Váhu vzájemných vztahů mezi, před manipulacemi, měřenými hladinami vybraných oxidoreduktáz a měřených morfometrických parametrů ukazuje následující korelační matice se Spearmanovými korelačními koeficienty. Statisticky významné korelace ($\alpha \leq 0,05$) jsou zvýrazněny.

Tab. 2 – Korelační matice vztahů mezi antioxidanty a morfologickými znaky

	GPx	SOD	Wing	Tarsus	Tail	Bodymass
GPx		0,141	0,051	0,150	0,094	0,036
SOD	0,141		-0,003	0,196	0,056	-0,039
Wing	0,051	-0,003		-0,240	0,302	0,133
Tarsus	0,150	0,196	-0,240		0,049	0,125
Tail	0,094	0,056	0,302	0,049		0,038
Bodymass	0,036	-0,039	0,133	0,125	0,038	

Hodnoty uvedené v tabulce 1 vykazují vzájemnou nezávislost mezi hladinami GPx, SOD a měřenými morfometrickými znaky. Nezávislost samotných oxidoreduktáz ukazují mj. grafy 5 a 6.

5.3 Analýza vztahů mezi antioxidanty a zbarvením

5.3.1 Analýza vztahů mezi antioxidanty a zbarvením – Jas zbarvení

Váhu vzájemných vztahů mezi, před manipulacemi měřeními, hladinami vybraných oxidoreduktáz a jasem zbarvení ukazuje následující korelační matice se Spearmanovými korelačními koeficienty. Statisticky významné koreláty ($\alpha \leq 0,05$) jsou zvýrazněny.

Tab. 3 – Korelační matice vztahů mezi antioxidanty a jasem zbarvení

	GPx	SOD	Belly	Breast	Throat	Ventral
GPx		0,141	0,071	-0,090	-0,043	0,078
SOD	0,141		-0,032	-0,210	0,076	-0,050
Belly	0,071	-0,032		0,216	0,112	0,288
Breast	-0,090	-0,210	0,216		0,092	0,483
Throat	0,136	0,076	0,112	0,092		0,003
Ventral	-0,078	-0,050	0,288	0,483	0,003	

Hodnoty uvedené v tabulce 2 ukazují významnost vzájemných vztahů mezi měřeními hladinami vybraných oxidoreduktáz a jasem zbarvení jednotlivých oblastí ventrální části. Podobně jako u vztahů hladin měřených enzymů a morfologických znaků, tak také v tomto případě nebyla prokázána významná korelace mezi uvedenými parametry. Výjimku zde tvoří vztah mezi hladinami SOD a jednou z oblastí ventrální části. Vzhledem k vykazované hodnotě (-0,210) a nevýznamnou korelací hladin SOD s ostatními regiony, lze však přepokládat minimální vzájemnou závislost těchto korelátů.

5.3.2 Analýza vztahů mezi antioxidanty a zbarvením – Sytost zbarvení

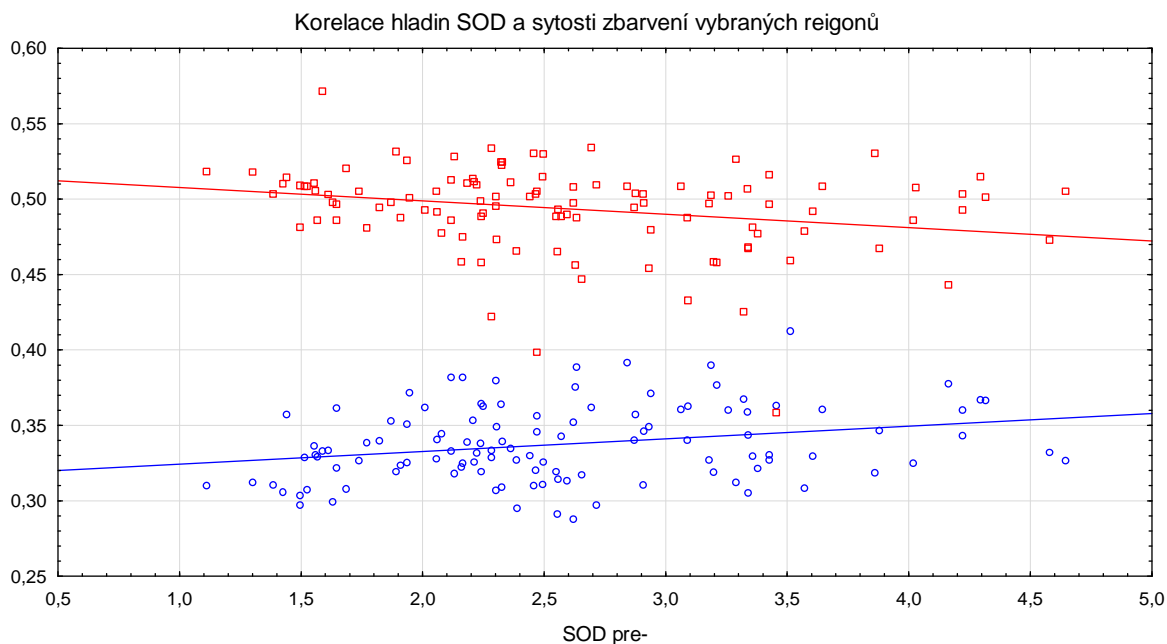
Váhu vzájemných vztahů mezi, před manipulacemi měřeními, hladinami vybraných oxidoreduktáz a sytostí zbarvení ukazuje následující korelační matice se Spearmanovými korelačními koeficienty. Statisticky významné koreláty ($\alpha \leq 0,05$) jsou zvýrazněny.

Tab. 4 – Korelační matice vztahů mezi antioxidanty a sytostí zbarvení

	GPx	SOD	Belly	Breast	Throat	Ventral
GPx		0,141	-0,040	0,076	-0,043	0,041
SOD	0,141		0,008	0,252	-0,272	0,127
Belly	-0,040	0,008		0,426	-0,060	0,307
Breast	0,067	0,252	0,426		-0,124	0,509
Throat	-0,043	-0,272	-0,060	-0,124		-0,093
Ventral	0,041	0,127	0,307	0,509	-0,093	

Hodnoty jednotlivých Spearmanových korelačních koeficientů uvedené v tabulce 3 ukazují, stejně jako v předchozích dvou příkladech, minimální významnost vztahů hladin měřených oxidoreduktáz a sytosti zbarvení. Pouze v případě korelace hladin SOD a sytosti zbarvení dvou regionů ventrální části vykazuje výše uvedená matice významnější korelaci. Podobnost hodnot koeficientů mezi hladinami SOD a sytostí zbarvení hrudi a také břišní části však vykazuje možnost antagonistického vztahu mezi uvedenými sousedními regiony, viz graf 7.

Graf 7 – Korelace hladin SOD a sytostí zbarvení vybraných regionů



Protichůdnost vztahů sytosti zbarvení vybraných regionů (modře znázorněné hrudní a červeně znázorněné břišní části) v korelaci s kvantitou SOD, patrnou v grafu 7, lze vysvětlit jako možnost investic energie do dílčích – nositelem vybraných částí jednotlivých ornamentů. V případě korelace hladin SOD a sytostí zbarvení hrudní části dosahoval Pearsonův koeficient a hladina významnosti těchto hodnot: 0,2665 a 0,0042. V případě druhé korelace hladin SOD a sytosti zbarvení břišní části pak tyto ukazatele dosahovaly hodnot -0,2478 a 0,0084. Hodnoty na ose y vyjadřují míru reflektovaného záření.

Pozn.: Naměřené hodnoty hladin SOD nejsou přepočteny a uvedeny v jednotkách koncentrace [$\mu\text{mol/g}$].

5.4 Analýza vzájemných vztahů mezi ornamenty

5.4.1 Analýza vztahů mezi zbarvením a morfologickými znaky

Nezávislost vztahů mezi jednotlivými typy ornamentů, tzn. mezi délkou rýdovacích per, jasem a sytostí zbarvení a ocasními skvrnami) ukazují následující korelační matice se Spearmanovými korelačními koeficienty (tabulky 4 a 5). Statisticky významné koreláty ($\alpha \leq 0,05$) jsou zvýrazněny.

Tab. 5. – Korelace vztahů jednotlivých ornamentů a jasů zbarvení

	Tail	Spots	Belly	Breast	Throat	Ventral
Tail		0,154465	-0,10617	-0,098699	-0,114153	-0,057134
Spots	0,154465		-0,106182	0,073872	0,001456	0,035852
Belly	-0,105617	-0,106182		0,216172	0,112711	0,288004
Breast	-0,098699	0,073872	0,216172		0,092881	0,483462
Throat	-0,114153	0,001456	0,112711	0,092881		0,003677
Ventral	-0,057134	0,035852	0,288004	0,483462	0,003677	

Tab. 6. – Korelace vztahů jednotlivých ornamentů a sytosti zbarvení

	Tail	Spots	Belly	Breast	Throat	Ventral
Tail		0,154465	0,232294	0,135987	0,014992	-0,057134
Spots	0,154465		0,108100	-0,043159	-0,036753	0,009027
Belly	0,232294	0,108100		-0,331608	0,030629	0,307265
Breast	0,135987	-0,043159	-0,331608		-0,124142	0,509614
Throat	0,014992	-0,036753	0,030629	-0,124142		0,001456
Ventral	-0,057134	0,009027	0,307265	0,509614	0,001456	

6 Diskuze

Výše uvedené výsledky ukazují v poměrně vysoké míře vzájemnou nezávislost korelovaných proměnných. Tento fakt dokládají nejen nízké hodnoty korelačních koeficientů mezi jednotlivými kategoriemi analyzovaných proměnných, ale také poměrně vysoký rozptyl vznikající právě při korelaci dat náležících do odlišných skupin. Kategoriemi do kterých lze analyzované údaje rozčlenit jsou: 1. hladiny vybraných oxidoreduktáz (GPx, SOD), 2. morfometrické údaje, 3. údaje charakterizující zbarvení ventrální části a 4. údaje charakterizující rozsahy bílých skvrn přítomných na ocasních perech. Vzájemnost nezávislost jednotlivých kategorií prokazují následující tabulky (5 a 6) znázorňující nejvyšší hodnoty Spearmanova a Pearsonova korelačního koeficientu v rámci všech vymezených kategorií dat. Statisticky významné koreláty ($\alpha \leq 0,05$; $f \leq 0,05$) jsou zvýrazněny.

Tab. 7 – Nejvyšší naměřené Spearmanovy korelace mezi jednotlivými kategoriemi dat

	AOS	Morph.	Ventral	Spots
AOS		0,19677	-0,272417	0,197918
Morph.	0,19677		-0,178559	0,154465
Ventral	-0,272417	-0,178559		0,108100
Spots	0,197818	0,154465	0,108100	

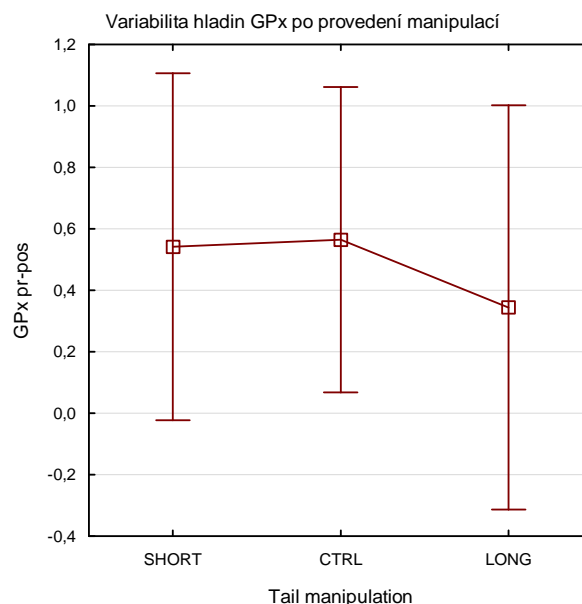
Tab. 8 – Nejvyšší naměřené Pearsonovy korelace mezi jednotlivými kategoriemi dat

	AOS	Morph.	Ventral	Spots
AOS		-0,0134	-0,2478	-0,1426
Morph.	-0,0134		-0,1623	0,1992
Ventral	-0,2478	-0,1623		0,0231
Spots	-0,1426	0,1992	0,0231	

Dalším důkazem podporujícím vzájemnou nezávislost jednotlivých proměnných je nejednotný vliv manipulací na hladiny měřených oxidoreduktáz. U žádného z typů manipulací s rýdovacími pery, a ani u kontrolní skupiny, nedošlo vlivem manipulace k jednoznačnému zvýšení či snížení hladin měřených antioxidantů. Lze tedy přepokládat, že se v případě systému antioxidační obrany jedná o poměrně stabilní ukazatel kvality jedince. De facto zanedbatelný vliv manipulací na hladiny antioxidantů ukazují grafy 8 a 9.

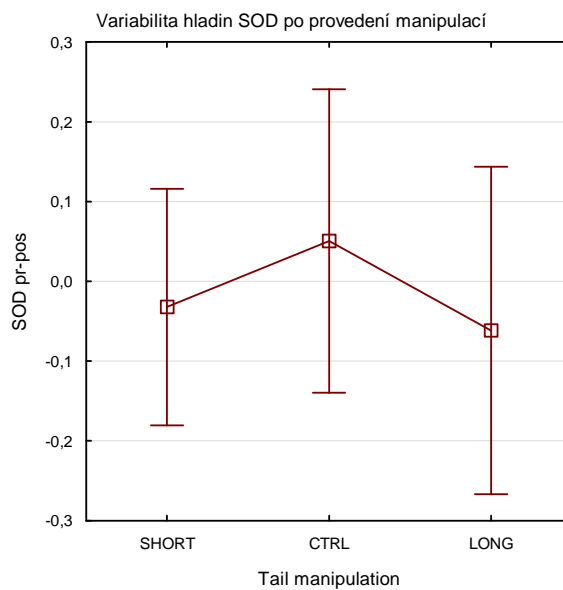
Je zde ale třeba také uvést možnost minimálního kolísání hladin SOD a GPx na základě doby odběru vzorků. Právě načasování sběru dat v hnízdním období, tzn. v období, které lze společně s migračním obdobím chápat jako nejvíce stresující pro organismus a také nejvíce zatěžující metabolismus, může zodpovídat za pouze nepatrné rozdíly v hladinách SOD a GPx před a po manipulaci. V takovémto případě pak lze očekávat, bez ohledu na typ manipulací, větší rozdíly v hladinách měřených antioxidantů mezi jednotlivými pohlavími (RAJA -AHO ET AL 2012; SELMAN ET AL 2012; SPEAKMAN & GARRATT 2013). Hladiny měřených enzymů nejsou v grafech 8 a 9 přepočteny a uvedeny v jednotkách koncentrace [$\mu\text{mol/g}$].

Graf 8 – Variabilita hladin GPx po provedení manipulací



V případě GPx ukazují výsledky nejednoznačný vliv manipulací s ornamenty na antioxidační systém. Přibližně u 40 % případů, tzn. u poměrně významné části, došlo po provedení manipulací s délkou rýdovacích per ke snížení hladin uvedeného enzymu.

Graf 9 – Variabilita hladin SOD po provedení manipulací





Podobně jako u předchozího enzymu, tak také v případě SOD není patrný jednotný vliv manipulací. U rovné poloviny případů došlo po provedení manipulací ke snížení hladin superoxid-dismutázy namísto předpokládaného zvýšení.

I přes neprokázanou závislost vztahů mezi nákladností ornamentů a hladinami oxidoreduktáz měřených během hnízdního období lze mezi těmito proměnnými předpokládat určité korelace. V prvním případě lze očekávat větší variabilitu hladin antioxidantů a také např. stresových hormonů, jak již bylo uvedeno, během hnízdního a mimohnízdního období (METCALFE & ALONSO-ALVAREZ 2010). V případě druhého z uvedených období lze zároveň předpokládat nižší investice energie jedinců do individuálních kondičních ornamentů, tzn. celkové snížení nákladnosti a kvality jednotlivých znaků a s tím související pokles hladin antioxidantů.

V dalším případě lze předpokládat odlišnou nákladnost mezi jednotlivými kondičními ornamenty. Tento fakt podporuje také možnost vzniku jednotlivých poddruhů vlaštovky obecné s průběhem podobným peripatrické či alopatické speciaci (SAFRAN ET AL 2016). V případě vzniku poddruhů probíhajícího podobně jako peripatrické speciace přestává být pro část populace žijící na periférii areálu výhodné investovat do ornamentů, jež plní roli dominantního ukazatele kvality jedinců v ostatních částech areálu či přímo v jeho centru. Tento fakt však není platný pouze mezi jednotlivými poddruhy, ale také vykazuje určitý latitudinální gradient v rámci samotných poddruhů *H. r. gutturalis* (HASEGAWA&ARAI 2013) či také *H. r. rustica*.(MØLLER 1995).

Další možností vysvětlující do určité míry minimální vliv manipulací na hladiny antioxidantů je tzv. „*bird paradox*“. Toto souhrnné označení, jehož autorem je italský ekofyziolog David Costantini, poukazuje na rozdíly patrné na fyziologické úrovni mezi savci a ptáky. Nemalá část z uváděných rozdílů úzce souvisí s metabolismem, jakožto hlavním zdrojem volných radikálů. Patrně nejvýznamnějším rozdílem mezi uvedenými skupinami je pak, i přes u ptáků vyšší metabolickou aktivitu, celkově nižší produkce ROS. Dalším neméně významným rozdílem je poměrové zastoupení nenasycených a nasycených mastných kyselin v buněčných membránách. Právě tento poměr určuje, v jak velké míře mohou být buňky, resp. buněčné membrány postihovány oxidačním stresem. Na úrovni jednotlivých řádů je pak patrný významný rozdíl v rychlosti senescence, kterou do určité míry rovněž ovlivňuje metabolismus a oxidační stres, a také v celkové délce života u druhů s podobnými tělesnými rozměry (COSTANTINI 2008; MONTGOMERY 2011).

Obr. 7 – „*The bird paradox*“ (převzato z COSTANTINI 2008)

<i>The “bird” paradox</i>		
	Mammals	Birds
● Ageing rate	Faster	Slower
● Rate metabolic rate	Lower	Higher
● Lifetime energy expenditure	Lower	Higher
● Body temperature	Lower	Higher
● Blood glucose level	Lower	Higher
● Ratio between oxygen radical production and oxygen consumption	Higher	Lower
● Oxidative damage	Higher	Lower
● Cell membrane unsaturation	Higher	Lower
● Life history for a given body size	Faster	Slower

Závěr

Vzájemnou nezávislost korelovaných parametrů, tzn. kondičních ornamentů, jejich vlivu na metabolismus a s tím související produkcí antioxidantů lze odůvodnit několika pohledy: 1. četností výskytu sledovaných parametrů mezi eukaryotickými organismy, 2. odlišnou dobou vzniku jednotlivých mechanismů a 3. jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, chybně zvoleným obdobím sběru dat. Zatímco kondiční ornamenty, jakožto sekundární pohlavní znaky, jsou přítomny pouze u skupin s více či méně rozvinutým pohlavním dimorfismem, antioxidační mechanismy jsou přítomny u všech skupin eukaryotických organismů. Mimo tento základní fakt podporuje nezávislost korelovaných také odlišná doba geneze korelátů. Zatímco vznik prvního z uvedených mechanismů zodpovědných za eliminaci volných radikálů bývá přímo spojován s dobou vzniku eukaryot, tzn. s dobou před cca 1,6 – 2,2 miliardami let (KNOLL ET AL 2006; ALBANI ET AL 2010), k vzniku pohlavního dimorfismu a také samotného pohlavního rozmnožování došlo mezi živočichy patrně až v době kambrijské exploze. Rovněž na základě četnosti výskytu daných parametrů mezi eukaryoty, konkrétně mezi jednotlivými skupinami živočichů, lze vysvětlit vzájemnou nezávislost hodnocených proměnných. Na rozdíl od u všech eukaryot přítomných antioxidačních systémů byla přítomnost pheomelaninových, tj. cystein využívajících kondičních ornamentů, doposud zjištěna pouze u několika skupin živočichů.

Posledním faktorem, jimž lze vysvětlit nekorelovaní hladin měřených antioxidantů s nákladností kondiční ornamentace, je možnost kolísání produkce volných radikálů a s tím související produkcí antioxidantů během roku. Samotnou variabilitu hladin volných radikálů i antioxidantů v tomto případě ovlivňují biotické, ale také environmentální faktory nebo celková biologie samotného druhu či v případě této práce poddruhu. Lze předpokládat odlišnosti v hladinách měřených látek mezi jedinci stálých a migrujících druhů. V případě první z uvedených skupin lze očekávat nejvyšší produkci ROS nejen v době hnízdění, ale také během migrace. V případě druhé skupiny, zahrnující stálé druhy, lze předpokládat poměrně rovnoměrnou produkci volných radikálů téměř po celý rok, s výjimkou hnízdního období.

Seznam použité literatury

1. ALBANI, AE., BENGTSON, S., CANFIELD, DE., BEKKER, A., MACCHIARELLI, R., MAZURIER, A., HAMMARLUND, EU., BOULVAIS, P., DUPUY, JJ., FONTAINE, C., FÜRSICH, FT., GAUTHIER-LAFAYE, FO., JANVIER, P., JAVAUX, E., OSSA, FO., PIERSO-WICKMANN, AC., RIBOULLEAU, A., SARDINI, P., VACHARD, D., WHITEHOUSE, M. & MEUNIER, A. (2010): Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2,1 Gyr ago. *Nature* 466 (7302), 100-104. (2010)
2. ALONSO-ALVAREZ, C., BERTRAND, S., FAIVRE, B., CHASTEL, O., SORCI, G., (2007): Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proceedings of the Royal Society* 274, 819-8250 (2007).
3. ANDERSSON, M. & SIMMONS, LW. (2006): Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution* 21(6), 296-302. (2006)
4. BALABAN, RS., NEMOTO, S. & FINKEL, T. (2005): Mitochondria, oxidants, and ageing. *Cell* 120, 483-495. (2005)
5. BALENGER, SL. & ZUK, M. (2014): Testing the Hamilton–Zuk hypothesis: Past, Present and Future. *Integrative and Comparative Biology*. 54(4), 601-613. (2014)
6. BENNETT, ATD. & CUTHILL, IC. (1994): Ultraviolet vision in birds – What is its function. *Vision Res.* 34(11), 1471-1478. (1994)
7. BENZIE, IFF. (2000): Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 39, 53-61. (2000)
8. BEREITER-HAHN, J., MATOLSY, AG. & SYLIVA RICHARDS, K. (1986): *Biology of the integument 2 – Vertebrates*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 855 pp. ISBN 978-3-662-00991-8
9. BONISOLI-ALQUATI, A., MOUSSEAU, T. A., MØLLER, A. P., CAPRIOLI, M. & SAINO, N. (2009): Increased oxidative stress in barn swallows from the Chernobyl region. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 155, 205-210. (2010)
10. BONISOLI-ALQUATI, A., KOYAMA, K., TEDESCHI, DJ., KITAMURA, W., SUZUKI, H., OSTERMILLER, S., ARAI, E., MØLLER, AP. & MOUSSEAU, TA. (2014): Abundance and genetic damage of barn swallows from Fukushima. *Scientific Reports* 5: Article number 9432. (2015)
11. BULLOCK, S. & CLIFF, D. (1997): The role of ‘hidden preferences’ in the artificial co-evolution of symmetrical signals. *Proc. R. Soc. Lond. B* 264, 505–511. (1997)

12. CHURCH, SC., MERRISON, ASL. & CHAMBERLAINE, TMM. (2001): Avian ultraviolet vision and frequency dependent seed preferences. *J Evol Biol.* 204, 2491-2498. (2001)
13. COLAVITTI, R. & FINKEL, T. (2005): Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. *IUBMB Life* 57(4-5): 277-281. (2005)
14. COOKE, MS., EVANS, MD., DZIDAROGLU, M. & LUNEC, J. (2003): Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* 17, 1192-1214. (2003)
15. COSTANTINI, D. (2008): Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology Letters* 11, 1238-1251. (2008)
16. COTTON, S., FOWLER, K. & POMIANKOWSKI, A. (2003): Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis?. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271, 771–783. (2004)
17. CRAM, DL., BLOUNT, JD. & YOUNG, AJ. (2014): Oxidative status and social dominance in a wild cooperative breeder. *Functional Ecology* 29, 229–238. (2015)
18. DAVIES, KJ. (1995): Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *BiochemSocSymp.* 1995; 61: 1-31.
19. DELHOYO J. & ELLIOTT A. (2014) Barn Swallow (*Hirundo rustica*). In: *Handbook of the Birds of the World: Alive*. Lynx Editions, Spain.
20. DOR, R., SAFRAN, RJ., SHELDON, FH., WINKLER, DW. & LOVETTE, IJ. (2009): Phylogeny of the genus *Hirundo* and the Barn Swallow subspecies complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 409-418. (2010)
21. ENQUIST, M. & ARAK, A. (1994): Symmetry, beauty and evolution. *Nature* 372(6502), 169-172. (1994)
22. FARAJI, B., KANG, HK. & VALENTINE, JL. (1987): Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. *Clinical Chemistry* 33(4), 539-543. (1987)
23. FINKEL, T. & HOLBROOK, NJ. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247. (2000)
24. FLORKIN, M., SCHEER, BT. & BRUSH, AH. (1978): *Chemical Zoology*, Vol. 10, Aves. Academic Press, Inc. New York. 435 pp.
25. FULLER, RC., HOULE, D. & TRAVIS, J. (2005): Sensory bias as an explanation for the evolution of mate preferences. *The American Naturalist* 166(4), 437-446. (2005)

26. GALVAN, I., & SOLANO, F. (2009). The evolution of eu-and pheomelanic traits may respond to an economy of pigments related to environmental oxidative stress. *Pigment cell & melanoma research*, 22(3), 339-342
27. GELDANI, RM. & DAVIN, MA. (2013): Sexual selection – Evolutionary perspectives, mating strategies and long-term effects on genetic variation. Nova Science Publishers. New York. 116 pp. ISBN: 9781628088069
28. GRIFFITH, SC., OWENS, IPF. & THUMAN, KA. (2002): Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology* 11, 2195-2212. (2002)
29. GRUNST, AS., ROTENBERRY, JT. & GRUNST, ML. (2014): Age-dependent relationships between multiple sexual pigments and condition in males and females. *Behavioral Ecology* 35, 1-12. (2014)
30. HALL, M., LINDHOLM, AK. & BROOKS, R. (2004): Direct selection on male attractiveness and female preference fails to produce a response. *Evolutionary Biology*. 4, 1-10. (2004)
31. HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, JMC. (2015): Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. Oxford. 905 pp. ISBN: 9780198717478
32. HAMILTON, WD. & ZUK, M. (1982): Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites?. *Science* 218, 384-387. (1982)
33. HARMAN, D. (1956): Aging: A theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300. (1956)
34. HASEGAWA, M. & ARAI, E. (2012): Divergent tail and throat ornamentation in the barn swallow across the Japanese islands. *J Ethol* 31, 79-83. (2013)
35. HÅSTAD, O., VICTORSSON, J. & ÖDEEN, A. (2004): Differences in color vision make passerines less conspicuous in the eyes of their predators. *PNAS* 102(18), 6391-6394. (2005)
36. HELFENSTEIN, F. et al. (2009): Sperm of colourful males are better protected against oxidative stress. *Ecology Letters* 13, 212-222. (2010)
37. Hill, GE. (1994): Seasonal variation in circulating carotenoid pigments in the house finch. *The Auk* 112(4), 1057-1061. (1995)
38. HILL, GE. & JOHNSON, JD. (2013): The mitonuclear compatibility hypothesis of sexual selection. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 280, 1-7. (2013)
39. HILL, GE. & MCGRAW, KJ. (2006): Bird coloration, Vol. 1: mechanisms and measurements. Harvard University Press. Cambridge. 640 pp. ISBN: 9780674018938

40. HOQUET, T. (2015): Current perspectives on sexual selection – What’s left after Darwin. Springer Science. Dordrecht. 307 pp. ISBN: 9789401795845
41. HUDON, J., STORNI, A., PINI, E., ANCIÀES, M. & STRADI, R. (2012): The Auk 129 (3), 491-499. (2012)
42. ISAKSSON, C. & ANDERSSON, S. (2007): Oxidative stress does not influence carotenoid mobilization and plumage pigmentation. Proceedings of the Royal Society B 275, 309-314. (2008)
43. ITO, S. (2003): A chemist’s view on melanogenesis. Pigment Cell Res 16: 230-236. (2003)
44. KEMPENAERS, B., EVERDING, S., BISHOP, CH., BOAG, P. & ROBERTSON, RJ. (2000): Extra-pair paternity and the reproductive role of male floaters in the tree swallow (*Tachycineta bicolor*). BehavEcolSociobiol 49: 251-259. (2001)
45. KNOLL, AH., JAVAUX, EJ, HEWITT, D. & COHEN, P. (2006): Eukaryotic organisms in Proterozoic oceans. Philosophical Transactions of the Royal Society B 361 (1470), 1023-1038. (2006)
46. KOLIADA, AK., KRASNENKOV, DS., VAISERMAN, AM. (2015): Telomericaging: mitoticclockor stress indicator. Front Genet. 2015; 6: 1-4.
47. KRISHNASWAMY, NR. & NEELAKANTAN, SCH. (2012): Fascinating Organic Molecule from Nature 3., Colours in Flight – Pigmetns from Bird Feathers and butterfly Wings. Resonance 18(1), 12-21. (2013)
48. LACK, D. (1968): Ecological adaptations for breeding in birds. Chapman and Hall. London. (1968)
49. LAFOUNTAIN, AM., PRUM, RO. & FRANK, HA. (2015): Diversity, fysiology, adn evolution of avian plumage carotenoids and the role of karotenoid-protein interactions in plumage color appearance. Archives of biochemistry and biophysics 572, 201-212. (2015)
50. MARATH, MJL., GREEN, DJ. &KOMDEUR, J. (2002): Sex allocation in sexually monomorphic fairy martin. Journal of Avian biology. 33: 260-268. (2002)
51. MARTÍNEZ, A., RODRÍGUEZ-GIRONÉS, M. A. &BARBORA, A. (2009): Can bird carotenoids play an antioxidant role oxidizing other substances?.Ardeola 56(2), 287-294. (2009)
52. MCGRAW, KJ. & NOGARE, MC. (2004): Distribution of unique red feather pigments in parrots. Biol. Lett. 1, 38-43. (2005)

53. MCGRAW, KJ., TOOMEY, MB., NOLAN, PM., MOREHOUSE, NI., MASSARO, M. & JOUVENTIN, P. (2007): A description of unique fluorescent yellow pigments in penguin feather. *Pigment Cell Res.* 20, 301-304. (2007)
54. MEAD, LS. & ARNOLD, SJ. (2004): Quantitative genetic models of sexual selection. *Trends Ecol Evol.* 19(5), 264-271. (2004)
55. METCALFE, N. B. & ALONSO-ALVAREZ, C. (2010): The ecology of antioxidants & oxidative stress in animals – Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology* 24, 984-996. (2010)
56. MØLLER, AP. (1990): Parasites and sexual selection: Current status of Hamilton & Zuk hypothesis. *J Evol Biol.* 3, 319-328. (1990)
57. MØLLER, AP. (1992): Sexual selection in the monogamous barn swallow (*Hirundo rustica*). II. Mechanism of sexual selection. *J Evol Biol* 5(4), 603-624. (1992)
58. MØLLER, AP. & POMIANKOWSKI, A. (1993): Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Genetica* 89: 267-279. (1993)
59. MØLLER, AP. (1994): Sexual selection in the monogamous barn swallow (*Hirundo rustica*). IV. Patterns of fluctuating asymmetry and selection against asymmetry. *Evolution* 48(3), 658-670. (1994)
60. MØLLER, AP. (1995): Sexual selection in the barn swallow (*Hirundo rustica*). V. Geographic variation in ornament size. *J. Evol. Biol.* 8: 3-19. (1995)
61. MØLLER, AP. & TEGELSTRÖM, H. (1997): Extra-pair paternity and tail ornamentation in the barn swallow *Hirundo rustica*. *Behav Ecol Sociobiol* 41: 353-360. (1997)
62. MØLLER, AP., BARBOSA, A, CUERVO, JJ., DE LOPE, F., MERINO, S. & SAINO, N. (1997): Sexual selection and tail streamers in the barn swallow. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265: 409-414. (1998)
63. MØLLER, AP. & ALATALO, RV. (1998): Good genes and sexual selection. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 266, 85-91. (1999)
64. MØLLER, AP., BONISOLI-ALQUATI, A. & MOUSSEAU, TA. (2012): High frequency of albinism and tumours in free-living birds around Chernobyl. *Mutation Research* 757, 52-59. (2013)
65. MØLLER, AP., BONISOLI-ALQUATI, A. & MOUSSEAU, TA. & RUDOLFSEN, G. (2014): Aspermy, Sperm quality and radiation in Chernobyl birds. *PLoS ONE* 9(6), 1-8. (2014)

66. MONAGHAN, P., METCALFE, N. B. & TORRES, R. (2008): Oxidative stress as a mediator of the life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* 12, 75-79. (2009)
67. MONCADA, S., PALMER, RMJ. & HIGGS, EA. (1989): Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemical Pharmacology* 38, 1709-1715. (1989)
68. MONTGOMERY, MK. (2011): The log life of birds: an examination of the oxidative stress theory of aging. Dissertation thesis, University of Wollongong. (2011)
69. MONTUSCHI, P., BARNES, PJ. & ROBERTS, LJ. (2004): Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB Journal* 18, 1791-1800. (2004)
70. NATHAN, C. & CUNNINGHAM-BUSSEL, A. (2013): Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol.* 13(5), 349-361. (2013)
71. NEGRO, JJ., MARGALIDA, A., HIRALDO, F. & HEREDIA, R. (1999): The function of the cosmetic coloration of bearded vultures when art imitates life. *Animal behavior* 58, 14-17. (1999)
72. OSORIO, D. & HAM, AD. (2002): Spectral reflectance and directional properties of structural coloration in bird plumage. *JEB* 205, 2017-2027. (2002)
73. PAGLIA, DE. & VALENTINE, WN. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158-169. (1967)
74. PESKIN, AV. & WINTERBOURN, CHC. (2000): A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta* 239, 157-166. (2000)
75. PITERKOVÁ, J., TOMÁNKOVÁ, K., LUHOVÁ, L., PETŘIVALSKÝ, M. & PEČ, P. (2005): Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem. listy* 99(7), 455-466. (2005)
76. POINTER, MA., PRAGER, M., ANDERSSON, S. & MUNDY, NI. (2011): A novel method for screening a vertebrate transcriptome for genes involved in carotenoid binding and metabolism. *Molecular Ecology Resources* 12(1), 149-159. (2012)
77. POMPELLA, A., BÁNHEGYI, G. & WELLMAN-ROSSEAU, M. (2002): Thiol metabolism and redox regulation of cellular functions. IOS Press. Amsterdam. 350 pp. ISBN: 1586032828

78. PRUM, RO., TORES, R., WILLIAMSON, S. & DYCK, J. (1999): Two-dimensional fourier analysis of the spongy medullary keratin of structurally colored feather barbs. *Proc. R. Soc. B* 266, 13-22. (1999)
79. PTÁČKOVÁ, O. (2016): Vliv hormonálního vyladění na míru exprese ornamentů v pohlavním výběru ptáků. Bakalářská práce, Masarykova univerzita. (2016)
80. RAJA-AHO, S., KANERVA, M., EEVA, T., LEHIKONEN, E., SUORSA, P., GAO, K., VOSLOO, D. & NIKINMAA, M. (2012): Seasonal Variation in the Regulation of Redox State and Some Biotransformation Enzyme Activities in the Barn Swallow (*Hirundo rustica* L.). *Physiological and Biochemical Zoology* 85(2), 148-158. (2012)
81. RAJCHARD, J. (2009): Ultraviolet (UV) light perception by birds: a review. *Veterinarni Medicina* 54(8), 351-359. (2009)
82. RILEY, HT., BRYANT, DM., CARTER, RE. & PARKIN, DT. (1995): Extra-pair fertilizations and paternity defence in house martins, *Delichon urbica*. *Animal Behaviour* 49, 495-509. (1995)
83. ROBERTS, ML., BUCHANA, KL., HASSELQUIST, D. & EVANS, MR. (2007): Effects of testosterone and corticosterone on immunocompetence in the zebra finch. *Hormones and Behavior* 51, 126-134. (2007)
84. ROBINSON, JM. (2008): Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol.* 130: 281-297. (2008)
85. SAFRAN, RJ. & MCGRAW, KJ. (2004): Plumage coloration, not length or symmetry of tail-streamers, is a sexually selected trait in North American barn swallows. *Behavioral Ecology* 15(3), 455-461. (2004)
86. SAFRAN, RJ., VORTMAN, Y., JENKIS, BR., HUBBARD, JK., WILKINS, MR., BRADLEY, RJ. & LOTEM, A. (2016): The maintenance of phenotypic divergence through sexual selection: An experimental study in barn swallows *Hirundo rustica*. *Evolution*. *Online version of record published before inclusion in an issue.*
87. SAINO, N., MØLLER, AP. & BOLZERN, AM. (1994): Testosterone effects on the immune system and parasite infestations in the barn swallow (*Hirundo rustica*): an experimental test of the immunocompetence hypothesis. *Behav Ecol* 6, 397-404. (1995)
88. SAINO, N. & MØLLER, AP. (1995): Testosterone correlates of mate guarding, singing and aggressive behaviour in male barn swallows *Hirundo rustica*. *Anim Behav* 49:465-472.(1995)

89. SAINO, N., ROMANO, M., RUBOLINI, D., AMBROSINI, R., CAPRIOLI, M., MILZANI, A., COSTANZO, A., COLOMBO, G., CANOVA, L. & WAKAMATSU, K. (2013): Viability is associated with melanin-based coloration in the barn swallow (*Hirundo rustica*). PLoS ONE 8(4). Art. Numb. e60426. (2013)
90. SCHRADER, M. & FAHIMI, HD. (2006): Peroxisomes and oxidative stress. Biochimica et Biophysica Acta 1763: 1755-1766. (2006)
91. SCORDATO, ESC. & SAFRAN RJ., (2014): Geographic variation in sexual selection and implications for speciation in the Barn Swallow. Avian Research 1: 1-13. (2014)
92. SELMAN, C., BLOUNT, JD., NUSSEY, DH. & SPEAKMAN, JR. (2012): Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now?. Trends in Ecology and Evolution. 27(10), 570-577. (2012)
93. SHAY, JW. & WRIGHT, WE. (2000): Hayflick, his limit, and cellular ageing. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2000; 1: 72-76.
94. SPEAKMAN, JR. & GARRATT, M. (2013): Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. Bioessays 36, 93-106. (2013)
95. STADTMAN, E. R. (2004): Role of Oxidant Species in Aging. Current Medicinal Chemistry 11, 1105-1112. (2004)
96. STODDARD, MC. & PRUM, RO. (2011): How colorful are birds? Evolution of the avian plumage color gamut. Behavioral Ecology 22(5): 1042-1052. (2011)
97. THOMAS, DB., MCGOVERIN, CM., MCGRAW, KJ., JAMES, HF. & MADDEN, O. (2012): Vibrational spectroscopic analyses of unique yellow feather pigments (spheniscins) in penguins. J R Soc Interface 10, 1-8. (2013)
98. THOMAS, DB., MCGRAW, KJ., BUTLER, MW., CARRANO, MT., MADDEN, O. & JAMES, MF. (2014): Ancient origins and multiple appearances of caretonid-pigmented feathers in birds. Proc. R. Soc. B 281, 1-9. (2014)
99. VITOUSEK, M. N., STEWART, R. A. & SAFRAN, R. J. (2013): Female plumage colour influences seasonal oxidative damage and testosterone profiles in a songbird. Biological Letters 9, 1-4. (2013)
100. VLECK, CM., HAUSSMANN, MF. & VLECK, D. (2007): Avian senescence: underlying mechanisms, J Ornithol 148, 611-624. (2007)
101. VORTMAN, Y., LOTEM, A., DOR, R., LOVETTE, IJ. & SAFRAN, RJ. (2011): The sexual signals of the East-Mediterranean barn swallow: a different swallow tale. Behav Ecol 22: 1344-1352. (2011)

102. WALSH, N. ET AL. (2011): Candidate genes for carotenoid coloration in vertebrates and their expression profiles in the carotenoid-containing plumage and bill of a wild bird. *Proceedings of the Royal Society B* 279, 58-66. (2012)
103. ZAHAVI, A. (1974): Mate selection—A Selection for a handicap. *J. theor. biol.* 53, 205-214. (1975)
104. ZEIGLER, HP. & BISCHOF, HJ. (1993): *Vision, brain, and behavior in birds*. MIT Press. Cambridge. 439 pp. ISBN: 9780262240369

Seznam použitých zkratek

RONS – reaktivní formy kyslíku a dusíku

ROS – reaktivní formy kyslíku

RNS – reaktivní formy dusíku

OXPPOS – oxidativní fosforylace

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

GSH – redukovaná forma glutathionu

GSSG – oxidovaná forma glutathionu

GPx – glutathion peroxidáza

SOD – superoxid–dismutáza

GR – glutathion reduktáza

Seznam grafických příloh

Obr. 1 – Biosyntéza melaninových pigment

Obr. 2 – Výskyt jednotlivých typů zbarvení mezi ptáky

Obr. 3 – Hnízdní distribuce poddruhů *H. rustica*

Obr. 4 – Lokalizace hnízdišť vybraných populací

Obr. 5 – Možné důsledky manipulací na organismus

Obr. 6 – Průběh oxidace a zpětné redukce glutationu

Obr. 7 – „*The bird paradox*“

Tab. 1 – Hlavní zdroje produkce RONS

Tab. 2 – Korelační matice vztahů mezi antioxidanty a morfologickými znaky

Tab. 3 – Korelační matice vztahů mezi antioxidanty a jasným zbarvením

Tab. 4 – Korelační matice vztahů mezi antioxidanty a sytostí zbarvení

Tab. 5 – Korelační matice vztahů jednotlivých ornamentů a jasného zbarvení

Tab. 6 – Korelační matice vztahů jednotlivých ornamentů a sytostí zbarvení

Tab. 7 – Nejvyšší naměřené Spearmanovy korelace mezi jednotlivými kategoriemi dat

Tab. 8 – Nejvyšší naměřené Pearsonovy korelace mezi jednotlivými kategoriemi dat

Graf 1 – Hladiny GPx před manipulací

Graf 2 – Hladiny GPx po manipulaci

Graf 3 – Hladiny SOD před manipulací

Graf 4 – Hladiny SOD po manipulaci

Graf 5 – Korelace hladin vybraných enzymů před manipulací

Graf 6 – Korelace hladin vybraných enzymů po manipulaci

Graf 7 – Korelace hladin SOD a sytosti zbarvená vybraných regionů

Graf 8 – Variabilita hladin GPx po provedení manipulací

Graf 9 – Variabilita hladin SOD po provedení manipulací