

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE
ZAMĚŘENÍ EKOLOGIE A ETOLOGIE

**FENOTYPOVÁ PLASTICITA REPRODUKČNÍ
ALOKACE SAMIC MADAGASKARSKÉHO
GEKONA *PAROEDURA PICTA*: LABORATORNÍ
EXPERIMENT S MANIPULACÍ PŘÍJMU POTRAVY**

Diplomová práce

Lukáš Kubička

Školitel: Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Praha 2006

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

Lukáš Kubička

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style, that reads "Lukáš Kubička".

V Praze, dne 4. 5. 2006

Především bych chtěl poděkovat svému školiteli Lukáši Kratochvílovi za zasvěcení do tajů vod gekoních „*life-history*“strategií a že mě v nich nenechal utopit. Bez celého Gecko-týmu by bylo v chovech smutno a mnohdy by chyběla i nápomocná ruka pro všechno. Všem ostatním – blízkým i vzdáleným patří poděkování za jakkoliv vyjadřovanou podporu. Děkuji i zúčastněným gekonům *Paroedura picta*, nespolupracujícím samičkám nic nezazlívám – uznávám, že toho (jídla) na ně bylo někdy opravdu moc.

Poděkování patří i grantům GAAV č. A6111410 a MŠMT č. 0021620828.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. ALOKACE DO REPRODUKCE V RÁMCI „ <i>life-history theory</i> “	7
2.1 Snůška šupinatých plazů	9
2.1.1 Lack, Williams a variabilní snůška šupinatých plazů	9
2.1.2 Lack, Williams a invariantní snůška šupinatých plazů	11
2.1.2.1 Evoluční příčiny vzniku invariantní snůšky	13
2.1.2.2 Manipulace s příjmem potravy	14
2.1.2.3 <i>Paroedura picta</i> , gekon s invariantní snůškou	16
3. METODIKA	19
3.1 Pokusné samice	19
3.2 Vybavení terárií	23
3.3 Páření	25
3.4 Krmení	25
3.5 Snůšky a vejce	27
3.6 Mláďata	29
3.7 Determinace pohlaví mláďat	30
4. VÝSLEDKY	33
4.1 Samice	33
4.2 Snůšky a vejce	42
4.3 Mláďata	54
5 DISKUZE	62
5.1 Řešení „ <i>trade-off</i> “ mezi alokací do reprodukce vs. do somatických tkání	62

5.2 Řešení „ <i>trade-off</i> “ mezi množstvím a kvalitou potomků v závislosti na krmné dávce	64
5.2.1 Snůšky a vejce	64
5.2.1.1 Délka inkubace	66
5.2.1.2 Líhnivost vajec	66
5.2.2 Mláďata	67
5.2.2.1 Velikost a deformace	67
5.2.2.2 Poměr pohlaví a dimorfismus	68
6. ZÁVĚR	72
7. POUŽITÁ LITERATURA	73
8. PŘÍLOHY	81
8.1 První článek přílohy	81
8.2 Druhý článek přílohy	97
8.3 Třetí článek přílohy	113

1. ÚVOD

Většina šupinatých plazů klade snůšky s velkým a hlavně variabilním počtem vajíček – to se děje vnitrodruhově i mezi druhy dané evoluční linie. Počet vajec ve snůšce je pak dán kompromisem mezi jejich množstvím a kvalitou (tzv. Lackův princip – Lack 1954 ex Sinervo 1999) a kompromisem mezi investicí do současné reprodukce a do té příští (Williamsův princip – Williams 1966).

Existuje však několik nezávislých skupin plazů, které mají snůšku invariantní (Shine & Greer 1991). Počet vajec v rámci snůšky je u nich nízký a neměnný – tím je plně kontrolován „*trade-off*“ mezi počtem a velikostí vajíček v rámci jedné snůšky. Samice v dobré kondici pak mohou zvýšit počet potomků pouze zvýšením frekvence snůšek (Vitt 1986). Neaplikovatelnost Lackova principu dělá z ještěřů s invariantní snůškou ideální modelové organismy pro studium Williamsova principu (u druhu s variabilní snůškou totiž existují složité interakce mezi oběma principy).

Cílem diplomové práce je objasnit některé otázky týkající se investice do reprodukce u gekona *Paroedura picta*, ještěra s invariantní snůškou, který je navíc pohlavně dimorfní. Pomocí laboratorního experimentu jsem se pokusil zjistit reakci samic tohoto druhu na manipulaci množstvím dostupné energie (= potravy) a odpovědět na základní otázky týkající se alokace do reprodukce. Reagují ještěři s invariantní velikostí snůšky na množství potravních zdrojů jen změnou frekvence snůšek nebo i změnou velikosti vajíček? Jak se mění velikost tukových zásob a investice do růstu vs. investice do reprodukce mezi samicemi s různou hladinou potravních zdrojů? Liší se investice do reprodukce v závislosti na vnitrodruhových změnách ve velikosti těla? Liší se kvalita potomků (líhivost; velikost; množství deformací; doba inkubace; ale i poměr pohlaví, jak by se u sexuálně dimorfních tvorů dalo předpokládat) v závislosti na množství potravy?

Jako součást diplomové práce jsou přiloženy tři rukopisy, na jejichž vzniku jsem se podílel jako spoluautor. Všechny tři se z různých pohledů zabývají fenoménem invariantní snůšky ještěřů. První dva články vznikly v souvislosti s diplomovou prací. Třetí je pak výstupem mé seminární práce. Tyto články již byly podstoupeny recenznímu řízení.

2. ALOKACE DO REPRODUKCE V RÁMCI „*life-history theory*“

Podle evoluční teorie (a zejména jejího odvětví zvaného „*life-history theory*“) by se měl každý jedinec chovat tak, aby maximalizoval své „*fitness*“ – zpravidla to znamená, že by měl maximalizovat počet svých přeživších potomků (Hirshfield & Tinkle 1975, Stearns 1992). Reprodukční úspěch jedince však ovlivňuje spousta faktorů - vlivy prostředí, genetické vybavení, fyziologická či morfologická omezení. Maximální možné množství potomků, které je jedinec schopný za svůj život vyprodukovat, je pak výsledkem jak různých omezení („*constraints*“), tak optimalizací všech životních pochodů působením přírodního výběru v rámci těchto omezení. Optimalizaci životních pochodů za daných podmínek musí selekce často řešit kompromisem („*trade-off*“) mezi více faktory.

V rámci energie investované do jednotlivé snůšky či v rámci omezeného břišního objemu musí selekce řešit kompromis mezi počtem a velikostí mlád'at, tj. velkým množstvím malých vajíček vs. malým počtem vajíček velkých. Kompromisem mezi kvalitou a počtem produkovaných potomků v rámci snůšky se zabývá tzv. Lackův princip (Lack 1954 ex Sinervo 1999). Jeho princip je jednoduchý. Selekcce upřednostňující plodnost zvýhodňuje samici, která ve snůšce produkuje mnoho malých mlád'at. Příliš malá vajíčka z velmi početné snůšky se však vůbec nemusí vylíhnout, malá mlád'ata pak mohou být znevýhodněna v postembryonálním životě. Selekcce upřednostňující přežívání potomstva tak naopak zvýhodňuje samici, která produkuje méně velkých potomků. To může vést ke zvětšování velikosti jednotlivého vajíčka až do limitu daného u ještěřů např. mechanickým omezením velikostí pánevního otvoru (Sinervo & Licht 1991, Olsson & Shine 1997, Sinervo 1999). Kompromis mezi těmito dvěma extrémy (příliš malé vs. příliš velké vajíčko) bude mít stabilizující vliv na velikost snůšky (Smith & Fretwell 1974, Kaplan & Salthe 1979, Congdon & Gibbons 1987, Sinervo 1999).

Přírodní výběr však nepracuje jen s okamžitým, ale s celoživotním reprodukčním úspěchem jedince. U iteroparních zvířat, jakými většina plazů je, musí přírodní výběr řešit i kompromis mezi investicí do současné reprodukční události a investicí do budoucna, tzv. Williamsův princip (Williams 1966). Investicí do budoucna se rozumí především investice do tukových zásob či do růstu těla. Za určitých podmínek tedy bude zvýhodněna samice, která snížením nákladů do současné reprodukce zlepší svou kondici, čímž si usnadní produkci příští snůšky. Zdroje energie dostupné pro reprodukci mají zásadní vliv na

velikost reprodukční investice do jedné snůšky. Pokud je množství dostupné energie omezujícím faktorem, samice buď využije zdroje pro svůj růst nebo pro rozmnožování - jakákoli investice do těla samice totiž snižuje investici do reprodukce a naopak (Olsson & Shine 1997). Růst se vyplatí pouze tehdy, když větší rozměry zvyšují fitness rodičů (Shine 1988, Gregory & Skebo 1998, Sinervo 1999, Jordan & Snell 2002). To by mělo platit zejména u druhů, kde větší rodiče (samice) jsou schopni mít více mlád'at či vajíček během jedné reprodukční události. Při vysoké míře mortality adultů bude zvýhodněno rychlejší dospívání samice při malé velikosti těla, i když je spojeno s malým počtem vajíček ve snůšce (Nussbaum 1981, Hendry et al. 2001). Načasování reprodukce a míra okamžité reprodukční investice však nemusí být určeny jen kompromisem mezi investicí do reprodukce a investicí do zásob či růstu, ale i sezónností klimatu. Patrně v závislosti na klimatických podmínkách a momentální dostupnosti zdrojů potravy se u ještěřů vyvinuly dvě reprodukční strategie. Přechod mezi nimi je neostrý, spíš se jedná o spektrum s extrémy na obou koncích. První skupinou jsou tzv. „*capital breeders*“, ti shromažďují mimo dobu rozmnožování zásoby, které později využijí při reprodukci. Sem patří většina druhů šupinatých plazů z temperátních a tropických sezónních oblastí (Shanbhag 2003). Zástupci druhé skupiny, „*income breeders*“, žijí ve stabilním prostředí, netvoří si skoro žádné zásoby a směřují energii získanou z potravy během vitelogeneze přímo do potomstva (Shanbhag 2003).

Z logických důvodů se Williamsův princip studuje mnohem obtížněji než princip Lackův – většina ještěřů má např. pouze jednu či dvě snůšky ročně. Situaci navíc komplikují často i velmi složité interakce mezi dělením investic mezi současnou vs. budoucí reprodukci a mezi dělením investic v rámci jedné snůšky (např. Caley et al. 2001, Aubret et al. 2003, Doody et al. 2003).

2.1 Snůška šupinatých plazů

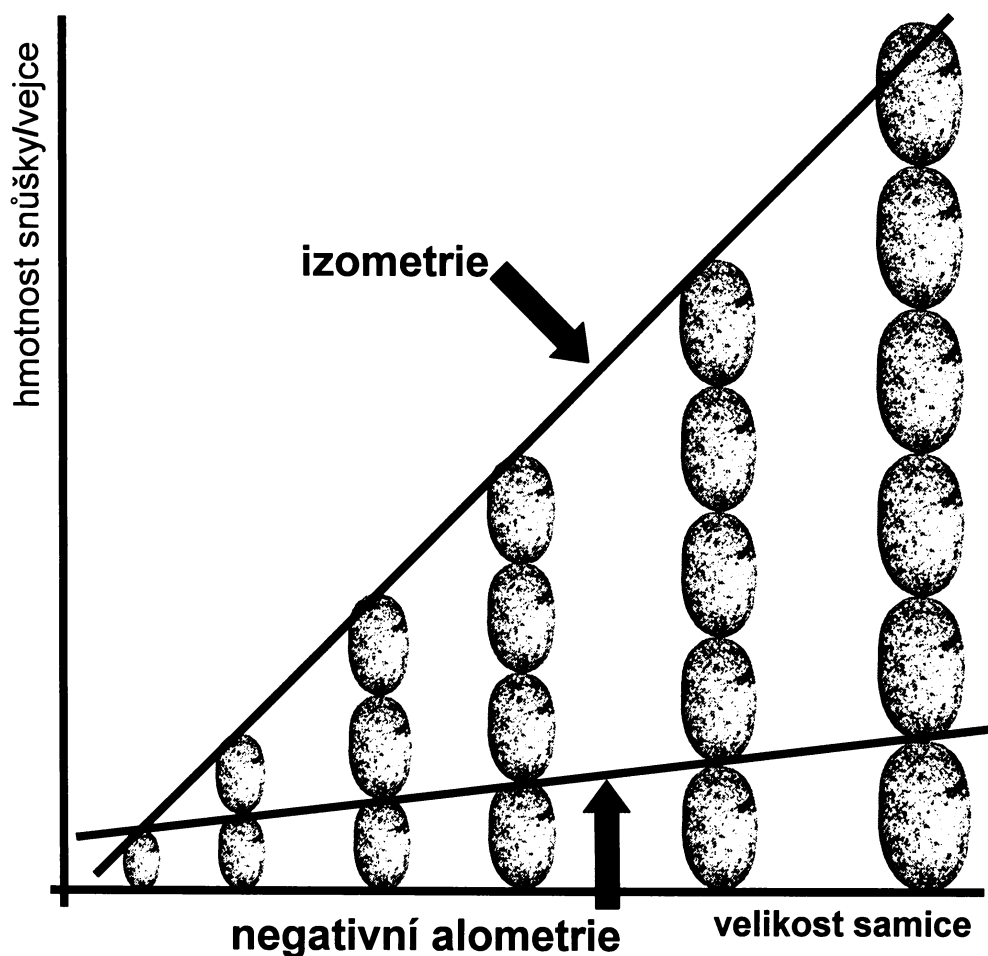
Tvar těla související s celkovým objemem snůšky byl přírodním výběrem formován v závislosti na prostředí jednotlivých druhů tak, aby maximalizoval reprodukční úspěch a minimalizoval mortalitu dospělců. Ekologická nebo morfologická omezení určují maximální a minimální velikost jednotlivé snůšky. Celková hmotnost snůšky bude záviset např. na prostředí, které druh obývá, na způsobu vyhledávání potravy, či na únikové strategii před predátory (Vitt & Congdon 1978, Shine 1992). Záleží však i na tom, jakou reprodukční taktiku „zvolil“ předek dané skupiny – reprodukční strategie jsou často poměrně fylogeneticky konzervativní (Andrews & Rand 1974, Shine & Greer 1991).

2.1.1 Lack, Williams a variabilní snůška šupinatých plazů

Většina šupinatých plazů produkuje velký a hlavně proměnlivý (vnitrodruhově i mezi druhy dané evoluční linie) počet vajíček v rámci jedné snůšky. Obecně platí, že malé druhy ještěřů dospívají brzy, dožívají se krátkého věku, mají málo vajíček v jedné snůšce, interval mezi snůškami je zpravidla krátký; vajíčka i mláďata jsou vzhledem k tělu samice relativně velká. Velké druhy dospívají naopak později, dožívají se vyššího věku a produkují omezený počet snůšek s mnoha relativně malými mláďaty (Tinkle et al. 1970). Teorie „*life-history*“ říká, že investice zdrojů do reprodukce by měla maximalizovat celoživotní reprodukční úspěch, nikoli jen dílčí úspěchy v některém období života samice. Velká samice, která má velký počet vajíček v jedné snůšce, nemusí nutně vyprodukovat za celý svůj život víc mláďat, než kolik zanechá menší samice, která se rozmnožuje opakovaně v krátkých intervalech a má početně mnohem menší snůšku. Velká samice totiž musí nejdříve investovat energii do růstu, a tím se ve svém rozmnožování oproti malé samici zpozdí, nehledě na rizika spojená s delší dobou růstu (Shine 1988).

Typická mezidruhová alometrie hmotnosti vajíčka a celé snůšky u linií ještěřů s variabilní snůškou je znázorněna na obr. 1 (Kratochvíl & Kubička - 3. článek přílohy). Z tohoto vztahu vyplývá, že hmotnost snůšky při mezidruhovém srovnání většinou narůstá izometricky, zatímco pro hmotnost jednotlivého vejce platí negativně alometrický vztah. To znamená, že samice velkých i malých druhů investují do své snůšky relativně stejně. Samice malého druhu však alokují relativně více do jednotlivých vajíček. Malá samice se

tak patrně brání vzniku příliš malých, neživotoschopných mláďat (Sinervo 1999). Počet vajíček ve snůšce malé samice pak bude menší (u ještěřů obecně: Ballinger et al. 1972, Shine & Charnov 1992; Lacertidae: Bauwens & Díaz-Uriarte 1997; *Sceloporus*: Dunham & Miles 1985, Tinkle & Ballinger 1972; Varanidae: Thompson & Pianka 2001). Velikost těla matky koreluje s počtem vajíček či mláďat ve snůšce i vnitrodruhově, velikost mláďat však již s velikostí matky zpravidla nekoreluje (např. Angilletta et al. 2001, Reaney & Whiting 2002).

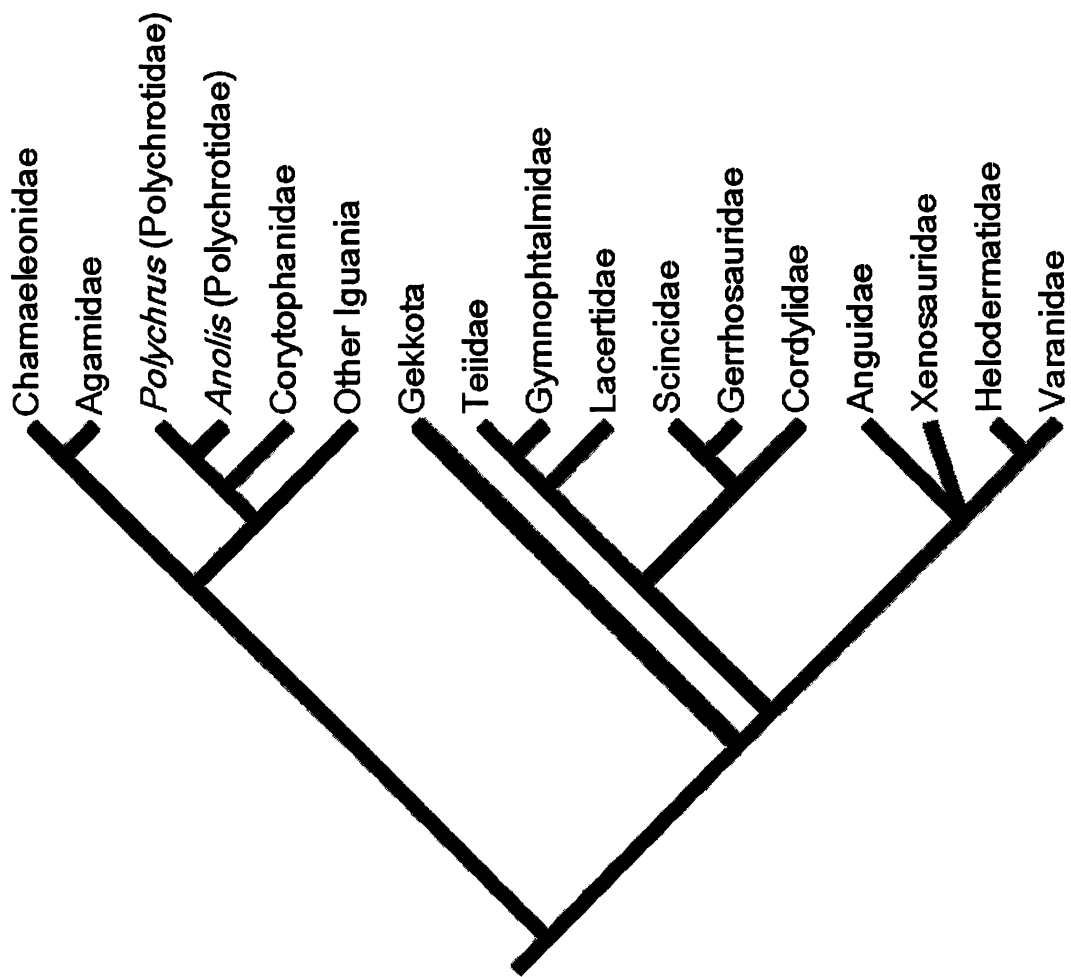


Obr. 1 Alometrická závislost hmotnosti vejce a celé snůšky pro ještěry s variabilní snůškou při mezidruhovém srovnání.

2.1.2 Lack, Williams a invariantní snůška šupinatých plazů

Většina ještěřů klade snůšky s variabilním počtem vajíček (či mlád'at), snůšky se opakují v poměrně dlouhých intervalech. Existuje však několik nezávisle vzniklých plazích linií, u kterých se vyvinula zcela odlišná reprodukční strategie - snůška s invariantním, obvykle velmi nízkým počtem vajíček (Shine & Greer 1991). Samice takovýchto druhů jednotlivé snůšky (na rozdíl od svých předků s variabilní snůškou) klade opakovaně v krátkých intervalech v průběhu sezóny. Protože u druhů s invariantní velikostí snůšky je počet zároveň se vyvíjejících vajíček v jednom ovariu roven jedné, Lackův princip se u těchto linií neuplatňuje. V plné míře se zde však uplatňuje Williamsův princip. Samice ještěřů s invariantní snůškou činí rozhodnutí, zda investovat zdroje do současné snůšky či zda bude investovat do růstu nebo zásob a použije ušetřenou energii při tvorbě příští snůšky, opakovaně a to velmi často. S rostoucí velikostí těla samice se počet vajíček ve snůšce nemění. Samice může v závislosti na vnějších podmínkách a svém fyziologickém stavu pouze ovlivňovat délku intervalu mezi jednotlivými snůškami, případně velikost vajíček (Andrews & Rand 1974, Kratochvíl & Frynta 2006a).

Podle práce Shina a Greera (1991) vznikla invariantní snůška nezávisle u 23 skupin šupinatých plazů (zaměřili se pouze na vejcorodé druhy). Tam, kde vznikala paralelně (např. Scincidae - 18 nezávislých vzniků), je někdy obtížné rozhodnout, který druh má ještě variabilní a který už invariantní snůšku. U dalších skupin (např. infrařád Gekkota a rod *Anolis*) je naopak distribuce tohoto znaku silně konzervativní (Shine & Greer 1991). Jmenovitě se tato snůška vyskytuje u všech zástupců infrařádu Gekkota, čeledi Dibamidae a rodu *Anolis* (čeleď Polychrotidae). Dále se invariantní snůška vyskytuje u některých zástupců čeledí Agamidae, Gymnophthalmidae a Scincidae. Invariantní snůška je prokazatelně odvozený stav. Ancestrální pro všechny Squamata je snůška variabilní (obr. 2) - dokládá to mimo jiné i její přítomnost u hatérií, skupiny sesterské k šupinatým plazům (Cooper & Vitt 2002).



Obr. 2 Zjednodušený kladogram skupiny Squamata (šupinatí plazi) dle Cooper & Vitt (2002) (upraveno). Invariantní snůška vznikla nezávisle minimálně u dvou skupin: rod *Anolis* a infrařád Gekkota (černé větve). Variabilní snůška (šedé větve) je ancestrální. Čeledi Dibamidae a Xantusiidae nezařazeny kvůli jejich spornému postavení v současném pohledu na fylogenezi.

2.1.2.1 Evoluční příčiny vzniku invariantní snůšky

Evoluční a ekologické příčiny vzniku invariantní snůšky dosud nejsou uspokojivě a jednoznačně objasněny. Tomu také odpovídá počet navržených hypotéz.

Jedna z hlavních hypotéz se týká prostředí, které ještěři s invariantní snůškou obývají. Lze předpokládat, že objemné snůšky s velkým množstvím vajíček kladené s malou frekvencí během daného reprodukčního období jsou vhodné pro oblasti se sezónním klimatem. Naopak malé snůšky kladené s větší frekvencí jsou výhodné v asezónním prostředí (Tinkle et al. 1970, Andrews & Rand 1974, Vitt 1986, James & Shine 1988) Z toho vyplývá, že invariantní snůška by mohla vzniknout jako odpověď na stálé, příznivé klima. Tento model však nevysvětluje celou problematiku. I když je pro druhy s variabilní snůškou výhodnější sezónní klima a pro druhy druhé skupiny klima asezónní, spousta tropických ještěřů má snůšku variabilní a někteří ještěři s invariantní snůškou žijí v silně sezónním prostředí (např. Inger & Greenberg 1966, Anderson 1999, Rock et al. 2002).

Relativně dobře podpořená hypotéza příčiny vzniku invariantní snůšky se týká malé velikosti těla dospělé samice (Shine & Greer 1991) a dá se odvodit z obr. 1. Podle této hypotézy vznikla u velmi malých druhů s variabilní snůškou v důsledku nutnosti tvorby minimálně velkého vajíčka či mláďete. Větší druhy s variabilní snůškou investují zdroje dostupné pro reprodukci do většího počtu relativně menších vajíček, zatímco malé druhy by měly produkovat menší počet relativně větších vajíček v rámci jedné snůšky, v extrémním případě jen jedno nebo dvě vajíčka. Malá samice se tak brání tvorbě příliš malých, neživotaschopných vajec (obr. 1) (Doughty 1996, Sinervo 1999, Colli et al. 2003).

Invariantní snůška se však nevyskytuje pouze u malých druhů. Existují dvě skupiny ekologických hypotéz vzniku invariantní snůšky u ještěřů (Kratochvíl & Kubička - 3. článek přílohy). Podle první skupiny hypotéz (dobře odpovídající situaci u anolisů) vznikla invariantní snůška působením selekce na redukci zátěže hmotnosti gravidní samice v lokomočně náročném prostředí (např. při šplhání po stromech). Lehká a mrštná gravidní samice je tak úspěšnější v obstarávání potravy a snáze uniká predátorům (Andrews & Rand 1974, Shine et al. 1998). Arborikolní druhy by pak měly mít oproti svým předkům redukovanou snůšku, v extrémním případě až na jedině vejce velikostně odpovídající jedinému vejci ze snůšky předka s variabilní snůškou (což anolisové mají). Druhá skupina hypotéz odpovídá situaci u gekonů s mnohem většími vajíčky v porovnání s ancestrálním

stavem. Hybnou silou selekce při tomto vzniku invariantní snůšky mohl být např. predační tlak (Ashton 2005) či širší spektrum kořisti u větších mlád'at (James & Shine 1988, Ashton 2005) zvýhodňující mlád'ata s větší velikostí. Alternativně může být větší investice do jednotlivých vajíček odpovědí na inkubaci v chráněném prostředí (Smith & Fretwell 1974, Shine 1989). Druhy, které tuto větší investici vykazují, by pak podle Lackova principu měly produkovat menší počet odchovaných mlád'at. I když ekologické hypotézy druhé skupiny hovoří o zvětšování jednotlivých vajec, nelze zajít za danou mez a zvětšovat libovolně objem celé snůšky, ten je totiž dán dostupným prostorem v břišní dutině (Shine 1992) – maximální hmotnost celé snůšky tak i pro gekony roste izometricky s velikostí samice.

2.1.2.2 Manipulace s příjmem potravy

Invariantní snůška vznikla jako velmi komplexní odpověď na množství nejrůznějších omezení a selekčních tlaků určujících a ovlivňujících velikost snůšky i jednotlivých vajec. Tím, že se zde uplatňuje pouze Williamsův princip, však činí z těchto plazů ideální modelové organismy pro studium investice do reprodukce (Lackův princip, jakožto i jeho interakce s principem Williamsovým, je zcela kontrolován).

Cílem diplomové práce je objasnit některé otázky týkající se investice do reprodukce u gekona *Paroedura picta*, ještěra s invariantní snůškou. Pomocí laboratorního experimentu se pokusím zjistit reakci samic tohoto druhu na manipulaci množstvím dostupné energie (= potravy) a odpovědět na základní otázky týkající se alokace do reprodukce.

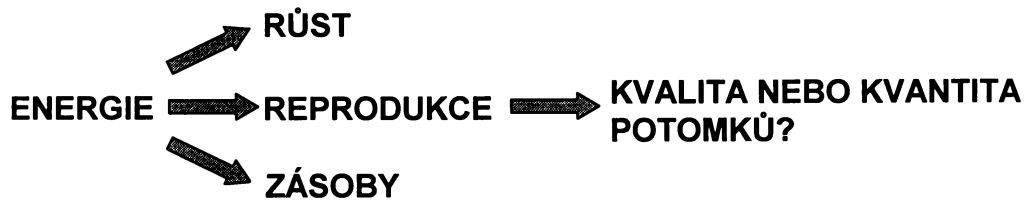
Liší se alokace do reprodukce a do vlastního těla? Williams (1966) hovoří o kompromisu mezi alokací do reprodukce současné a do té budoucí (ovlivněné investicí do vlastního těla). Samice by měla v rámci teorie „*life-history*“ současně optimalizovat obě tyto alokace. Dostupné zdroje pak mohou být děleny mezi reprodukci a tělo samice proporčně stejně (např. při nedostatku potravy samice omezí v rámci optimalizace alokaci do růstu, tukových zásob a rozmnožování stejným dílem) – oboje je totiž pro samici stejně významné. Alokace však může být dělena nerovnoměrně – samice v závislosti na aktuálních podmínkách preferuje alokaci, která bude výhodnější pro maximalizaci její fitness.

V rámci alokace do vlastního těla lze rozlišit investici do růstu a tukových zásob. Obojí může v rámci Williamsovy teorie zvýhodnit příští reprodukci (např. Tinkle et al. 1970, Sexton et al. 1971, Read, 1999).

V rámci alokace do reprodukce lze zase rozlišit kompromis mezi kvalitou a kvantitou potomků (Smith & Fretwell 1974). Podle některých autorů je velikost vajíček (a tím pádem i mlád'at) u gekonů optimalizovaná – samice s různým množstvím potravy by pak vždy měly tvořit vejce stejné velikosti a měly by se lišit pouze v počtu vajec (Vitt 1986, Doughty 1997). Také v případě, že velikost vajec je dána nějakým omezením (např. šířka pánevního otvoru – Sinervo & Licht 1991, dostupný prostor v břišní dutině - Shine a Greer 1991; Kratochvíl & Kubička subm. - 3. článek přílohy), by samice s větším přísunem potravy u druhů s invariantní velikostí snůšky měla snížit interval mezi jednotlivými snůškami a klást tak častěji (Doughty 1997).

Jestliže velikost vajíčka je měřítkem jeho kvality, aspoň některé koreláty fitness mláděte (zde zaznamenávána velikost mláděte, líhnivost vajec a množství zjevných deformací u čerstvě vylíhnutých mlád'at) by s ní měly korelovat. Pokud se liší velikost vajíček mezi samicemi s rozdílným příjmem potravy, měl bych také nalézt rozdíly v těchto korelátech fitness mláděte. Celkové schéma testovaných hypotéz týkajících se alokace je znázorněno na obr. 3.

Dalšími zaznamenanými parametry jsou pohlavní dimorfismus čerstvě vylíhnutých mlád'at a s tím potenciálně související sekundární poměr pohlaví (tj. poměr pohlaví při vylíhnutí). Dospělá zvířata tohoto druhu jsou výrazně pohlavně dimorfní (samci jsou větší a mají větší hlavu než samice). Trivers-Willardova hypotéza (1973) říká, že pokud je produkce mláděte určitého pohlaví v daném okamžiku výhodnější, samice by toto pohlaví měla upřednostňovat - např. samice v dobré kondici, která klade kvalitní vejce, by měla poměr pohlaví potomků vychýlit ve prospěch synů, má-li syn s lepší kondicí v dospělosti větší šanci obstát v konkurenci např. při obhajobě teritoria. Pokud jsou ovšem mlád'ata obou pohlaví stejná, tzn. jejich produkce je pro samici stejně nákladná, poměr pohlaví mlád'at jednotlivých samic by se neměl lišit v závislosti na zdrojích potravy.



Obr. 3 Obecné schéma dělení investic v rámci reprodukce a vlastního těla.

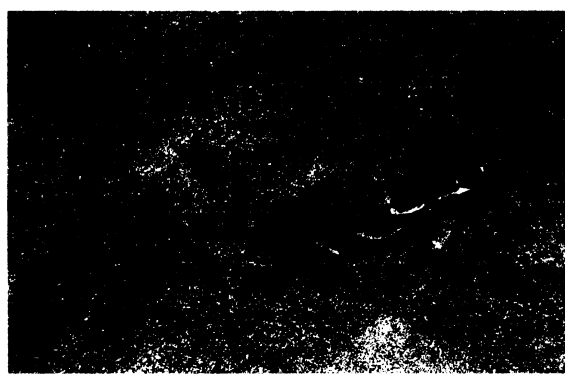
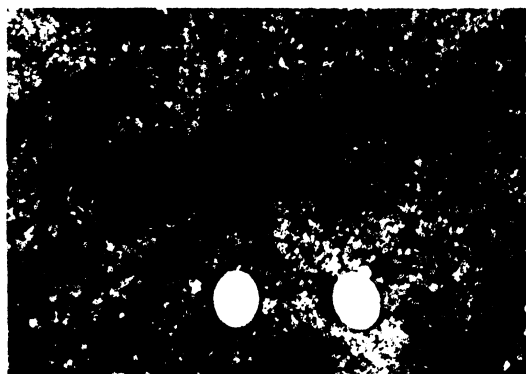
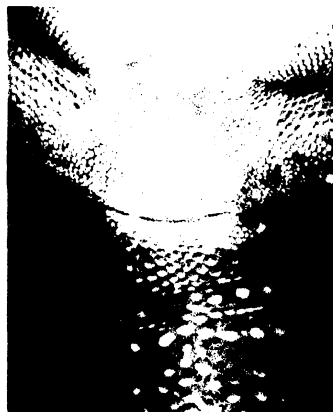
2.1.2.3 *Paroedura picta*, gekon s invariantní snůškou

Chov a odchov většiny druhů s invariantní snůškou je celkem dobře metodicky propracovaný a řada z nich jsou atraktivními a vděčnými terarijnými objekty. Jedním z chovatelsky dobře zvládnutých druhů je i modelový organismus experimentu, *Paroedura picta* (Peters, 1854) z čeledi Gekkonidae, infrařádu Gekkota. Všichni Gekkota mají maximálně dvě vejce v jedné snůšce (každé z jednoho ovaria). U některých skupin (např. rod *Sphaerodactylus*) se snůška redukovala na jediné vajíčko. I u skupin s primárně dvojvejčnou snůškou kladou samice v určitém procentu případů také pouze jedno vejce, což může být důsledkem spontánní atrofie jednoho z folikulů (Jones et al. 1975a, Jones et al. 1976). Pro čeleď Gekkonidae jsou charakteristická vajíčka s pevnou vápenatou skořápkou, vajíčka jsou relativně menší (kratší) než u ostatních gekonů (Kratochvíl & Frynta 2006b). Detailní fylogeneze skupiny je bohužel jen málo prozkoumaná (na rozdíl od zástupců sesterské čeledi Eublepharidae, viz Starostová et al. 2005).

Paroedura je monofyletický endemický rod Madagaskarskaru a Komorských ostrovů (Dixon & Kroll 1974, Kluge 1983). Jedná se o malé až střední gekony. Přísavné subdigitální lamely jsou redukovány pouze na dvě okrouhlé přísavky, umístěné v páru na konci prstu v těsné blízkosti dráčku. Samci mají nápadný subkloakální vak, ve kterém je párový pářící orgán hemipenis (to je dostatečný rozpoznávací znak tohoto pohlaví v dospělosti) (Dixon & Kroll 1974). Rod zahrnuje druhy šplhavé až arborikolní, ale i terestrické formy (Zaaf & Van Damme 2001). Samice mají snůšku o dvou vejcích (v některých případech však kladou pouze jedno vajíčko – viz charakteristika čeledi Gekkonidae) (Henkel et al. 2000). Zajímavé je i velikostní rozpětí rodu - zatímco samice nejmenšího druhu *Paroedura androyensis* dosahuje hmotnosti okolo 1.7 gramu, samice

největšího druhu *Paroedura picta* dosahuje průměrné hmotnosti 12 gramů (v extrémních případech i více než 20 gramů) (Henkel et al. 2000, vlastní pozorování).

Druh *Paroedura picta* se řadí mezi velké, terestricky žijící zástupce rodu. Obývá suché lesy, savany či trnité buše jižního a centrálního Madagaskaru (Dixon & Kroll 1974, Henkel et al. 2000). Jako většina gekonů jsou noční (Röll 2000). Průměrná délka těla činí okolo 90 mm (cca 140 mm včetně ocasu), většinou však dorůstají menších rozměrů (Röll 2000, Henkel et al. 2000). Samci dorůstají větších rozměrů než samice, jsou navíc celkově robustnější a mají větší hlavu. Zbarvení dospělých zvířat a pohlavní rozdíly jsou patrné na obr. 4. V přírodě se rozmnožují od září do května, za příznivých podmínek se mohou množit v průběhu celého roku. Samice jsou schopny skladovat spermie pro oplodnění několika snůšek. Interval mezi jednotlivými snůškami je tři až čtyři týdny (Henkel et al. 2000). Vajíčka jsou vzhledem k tělu samice relativně velká (obr. 4). Podle Blumberga et al. (2002) má tento druh geneticky určené pohlaví. Embrya ve vajíčku tolerují teploty od 22°C po 32°C. V závislosti na teplotě se však mění doba inkubace – cca 130 dnů při 23°C, okolo 80 dnů při 26°C a asi 50 dnů při teplotě 30°C. Mláďata mají typické juvenilní zbarvení (obr. 4), jejich hmotnost nepřesahuje jeden gram (Blumberg et al. 2002). Juvenilní jedinci za optimálních podmínek (dostatek potravy, minimum stresu ze strany dalších zvířat) pohlavně dospívají již v šesti měsících, v době dospívání ještě nedosahují maximální velikosti (Henkel et al. 2000, vlastní pozorování).



Obr. 4 Gekon *Paroedura picta* - a) samec

b) nápadný hemipenální vak samce

c) samice

d) redukovaný hemipenální vak samice

e) velikost vajec při srovnání se samicí

f) mládě s typickým juvenilním zbarvením

3. METODIKA

Do experimentu s manipulací příjmu potravy bylo vybráno 16 dospělých samic a 8 nepříbuzných samců druhu *Paroedura picta* (Peters 1855). Projekt byl řádně schválen etickou komisí (č. 19489/2005/30/300). Data byla analyzována v programu Statistica (StatSoft 2001).

Vlastnímu experimentu nejprve předcházela předběžný pokus, kde byly odzkoušeny základní postupy a sledovány všechny možné parametry (např. reakce samic na různé množství potravy, vybavení terárií, načasování páření apod.). Pomohl také odhalit některé nepřesnosti ve sběru dat, které by mohly negativně ovlivnit výsledek experimentu. Z tohoto pokusu se podařilo odchovat cca 150 individuálně značených mlád'at – přibližně 70 samic a 80 samců.

3.1 Pokusné samice

Z celkového množství 70 samic odchovaných v pilotním pokusu bylo vybráno 16 tak, aby měly přibližně stejnou hmotnost, stejnou délku těla a dosahovaly takového podobného věku, kdy jejich růst ještě není ukončen - tzn. dospělé, ne však plně vzrostlé. Samice byly vždy drženy individuálně, nebyly tedy ovlivněny sociálními vztahy ve skupině. Od narození dostávaly přibližně stejné množství potravy.

16 vybraných samic bylo náhodně rozděleno do 8 dvojic (pomocí losování). V další kroku byla jedna samice ze dvojice náhodně určena jako „sytá“ – její denní příděl potravy měl odpovídat přibližnému množství 0,5 g cvrčků, denní příjem potravy druhé samice („hladová“) měl být o 1/3 nižší – tzn. 0,333 g cvrčků. Podávání takového množství potravy samicím bylo vyzkoušeno již v předběžném pokusu. Obě tyto krmné dávky jsou pro zdárné rozmnožování zvířat dostatečné. Třetinový rozdíl v příjmu potravy navíc ovlivní rozhodování samic o alokaci zdrojů.

Pokusné samice rozdělené do skupin (dále pro stručnost označovány jako „hladové“ a „syté“) byly před prvním kmením změřeny digitální šuplerou s přesností 0,01 mm (délka těla, délka hlavy) a zváženy na digitálních vahách s přesností 0,001 g. Délka těla odpovídá vzdálenosti od špičky tlamky po kloaku, délka hlavy představuje rozměr od špičky tlamky

po ušní otvor zvířete. Toto měření jsem opakoval každých 14 dní po celou dobu pokusu pro kontrolu případného růstu a změny hmotnosti.

Po prvním měření jsem provedl srovnání hmotnosti, délky těla, délky hlavy a věkového rozložení „syté“ a „hladové“ skupiny pomocí neparametrického Mann-Whitney U testu. Průměrná hmotnost „hladové“ samice byla 12,468 g (střední chyba průměru - SE = 0,328), pro „syté“ to bylo 11,822 g (SE = 0,328), rozdíl v hmotnosti obou skupin je statisticky neprůkazný (U = 21; P = 0,28). Průkazný rozdíl byl ale nalezen v délce těla (U = 12; P = 0,038) – „hladové“ byly o cca 1,5 mm větší a dosahovaly 75,65 mm (SE = 0,51), menší „syté“ měřily v průměru 74,11 mm (SE = 0,51). Délka hlavy obou skupin se už nelišila (U = 30; P = 0,88) - průměrná délka hlavy pro „hladové“ byla 22,12 mm (SE = 0,16), pro „syté“ 22,13 mm (SE = 0,16). Skupiny se nelišily ani věkově (U = 31; P = 0,96) - věkový průměr byl pro oba soubory stejný – 329,5 dne (stejně jako SE = 3,7).

Zjištěný rozdíl ve velikosti těla mezi skupinami považuji za biologicky nevýznamný (cca 1,5 mm). Samice byly vybírány tak, aby se co nejméně lišily ve všech sledovaných parametrech (hmotnost, délka těla, délka hlavy, věk). Pro získání ve všech ohledech přibližně stejných zvířat je třeba velkého počtu individuí, ze kterých lze vybrat. V tomto případě jsem volil z celkového množství cca 70 samic. Výběr 16 jedinců je pak kompromisem mezi jednotlivými požadavky. Hodnoty pro jednotlivé samice jsou zaznamenány v tab. 1, boxploty pro jednotlivé analýzy jsou znázorněny na obr. 5.

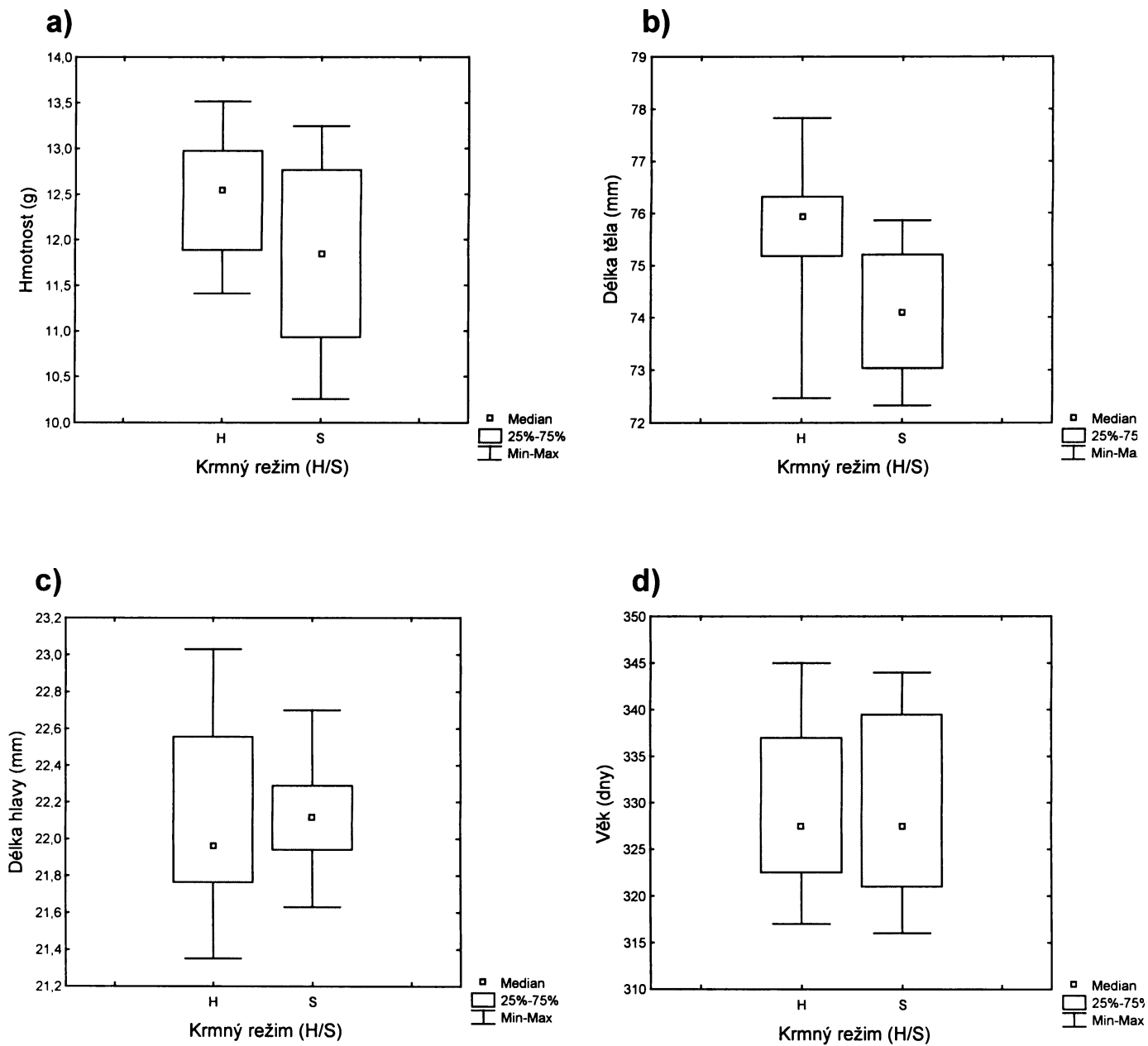
Stejně srovnání bylo provedeno i na konci pokusu (kromě věkového rozložení). Do této analýzy nebyla zahrnuta samice Q2, neboť za celou dobu pokusu (210 dní) nesnesla jediné vejce. Její údaje jsou tímto zkreslené a narušily by výsledky. Z průběžných zjištěných hodnot pro jednotlivé samice byl nejprve vytvořen graf závislosti hmotnosti na dni měření a krmném režimu samic (hladové/syté). Stejně vysvětlující proměnné byly použity i v dalších obdobách tohoto grafu. Samice Q2 byla kvůli své výjimečnosti vždy znázorněna samostatně, označená jako „Q2“. Následně došlo k modifikaci grafu na graf závislosti změny hmotnosti, vyjadřující přírůstek hmotnosti samice během experimentu (rozdíl hmotnosti zjištěné při jednotlivých měřeních a hmotnosti zjištěné při prvním měření). Třetí graf byl vytvořen pro závislost hmotnosti samice kontrolovanou na délku těla – jedná se o poměr třetí odmocniny hmotnosti samice ku délce těla (hmotnost totiž roste se třetí mocninou délky těla, musela být proto upravena tak, aby byly obě hodnoty kompatibilní), poměr pak představuje relativní tloušťku (množství tukových zásob) samice

po odfiltrování délky těla. Poslední obměna grafu se týkala délky těla samice jako závislé proměnné.

Z grafického vyjádření pro délku těla bylo patrné, že tento parametr u obou skupin samic (i u Q2) neroste lineárně v závislosti na dni měření, ale spíš odráží trend růstové křivky. Pro její vynesení byla použita následující rovnice (Schoener & Schoener 1978, Powell & Russell 1985):

$$y = (a^3 / (1 + b \cdot 10^{-r \cdot x}))^{1/3}$$

kde „y“ představuje zjištěnou délku těla samice, „a“ je asymptotická délka těla, „b“ je koeficient vztahující se k počáteční velikosti v den začátku experimentu, „r“ představuje rychlost růstu a „x“ znamená den měření. Tyto hodnoty byly spočítány pro každou samici zvlášť (včetně Q2) a porovnány mezi samicemi s různými krmnými režimy (po vyloučení samice Q2) Mann - Whitney U testem. Následně byla pomocí neparametrické korelace porovnána asymptotická délka těla samic (a) s rychlostí růstu (r).



Obr 5: Srovnání obou skupin samic (H = skupina hladových, S = skupina sytých) na začátku experimentu v hmotnosti a), délce těla b), délce hlavy c) a jejich věku d).

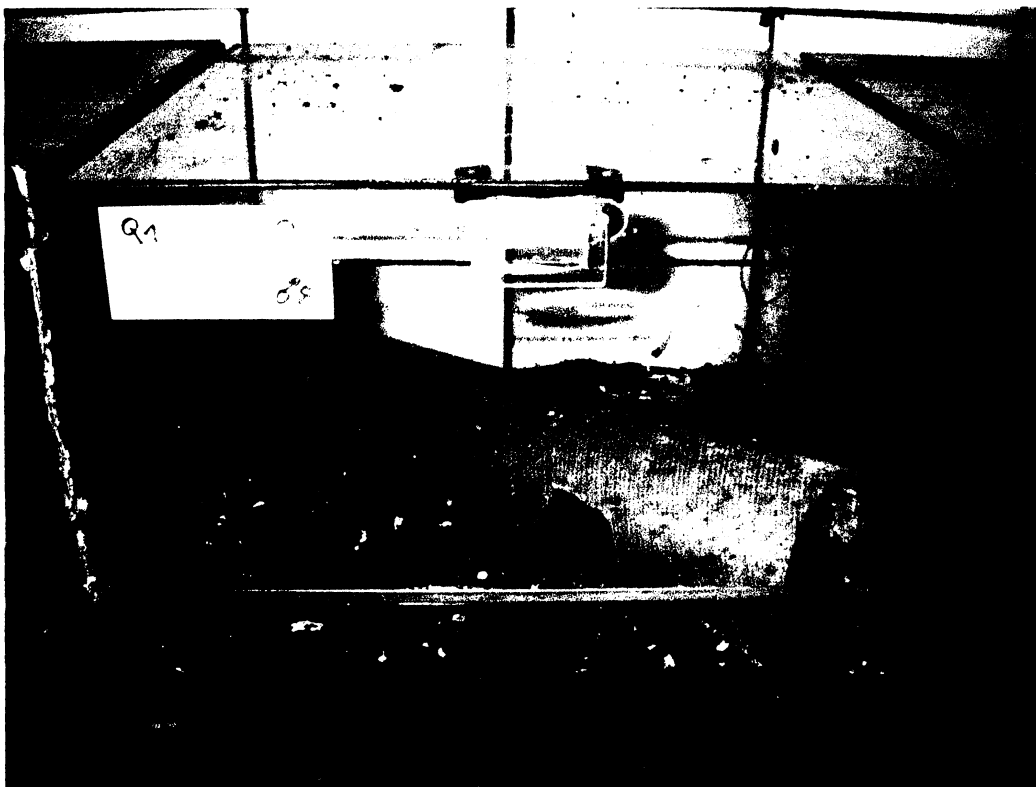
Tab. 1 Hodnoty pro 16 samic zjištěné před začátkem pokusu.

Samice	Krmný režim (H/S)	Hmotnost (g)	Délka těla (mm)	Délka hlavy (mm)	Věk (dny)
J1	H	12,442	74,60	22,81	331
K2	H	12,655	76,25	22,04	324
L1	H	12,129	75,75	21,88	321
M2	H	11,413	76,10	22,30	317
N1	H	13,514	77,83	23,03	345
O1	H	11,645	72,47	21,78	343
P1	H	12,816	75,80	21,75	331
Q2	H	13,133	76,40	21,35	324
J2	S	13,139	73,57	22,02	320
K1	S	10,579	73,93	21,86	344
L2	S	12,389	75,86	22,02	322
M1	S	11,652	74,24	22,22	316
N2	S	12,032	72,33	22,70	344
O2	S	11,285	75,61	22,33	335
P2	S	10,257	72,51	21,63	331
Q1	S	13,246	74,80	22,25	324

3.2 Vybavení terárií

Pro pokus byla použita skleněná terária vždy stejného typu o rozměrech 30x30x20 cm (což splňuje normu EU pro chov takto velkých plazů). Terária byla od sebe oddělena neprůhlednou papírovou přepážkou, aby nedocházelo ani k vizuálnímu kontaktu mezi samicemi. Samice do nich byly umístěny přibližně měsíc před začátkem pokusu, aby se v novém prostředí dokonale habituovaly. Zástupci čeledi Gekkonidae, kam patří i *Paroedura picta*, kladou vejce s vápenatou skořápkou, ta jsou tolerantní k relativně suchému inkubačnímu prostředí. Samice pak nejsou při výběru místa pro snůšku nijak výrazně limitovány (na rozdíl od zástupců příbuzné čeledi Eublepharidae, kde samice klade kožovitá vejce pouze do plastových krabic s vlhkým substrátem, není-li další optimálně vlhké místo pro snůšku k dispozici - Kratochvíl & Frynta 2002). Druh *Paroedura picta* zahrabává svá vejce přímo do substrátu a řídí se při tom hlavně jeho teplotou. Z tohoto důvodu dosahovala vrstva substrátu mocnosti minimálně 4 cm, protože

při nižší vrstvě často samice lepily při kladení vejce ke sklu (zjištěno v předběžném pokusu). Takováto vejce jsou pak pro pokus nepoužitelná. Substrát tvořila směs písku a suché kokosové drtě v poměru 1:2, čímž byla zajištěna optimální sytkost. Na spodek všech terárií jsem podél zadní stěny umístil topný kabel pro dosažení patřičného teplotního gradientu v rozsahu 26°C (teplota v místnosti) až 50°C (teplota přímo u kabelu). Všechny pokusné samice se tak mohly vyhřívat dle libosti a nalézt zde i optimální místo pro snůšku. Pro větší komfort jsem do terárií umístil úhlopříčně poloviny papírových trubek, které samicím sloužily jako úkryty pokrývající celou škálu gradientu (viz obr. 6). Další důležitá součást vybavení terárií byla miska na vodu a na sépiovou kost. Při každém krmení dostávala zvířata vodu s rozpuštěným kalcem a jednou za 14 dní i s přidavkem vitamínů A, D3 a E pro udržení dobré kondice pokusných jedinců. Gekoni *Paroedura picta* jsou také velmi náročni na přísun vápníku (zejména mláďata a gravidní samice), samicím byl proto podáván ad libitum ve formě drcené sépiové kosti.



Obr. 6 Celkové vybavení pokusného terária.

3.3 Páření

Každé dvojici samic byl náhodně přiřazen jeden samec, jehož základní údaje byly rovněž známy. Samci byli drženi samostatně za stejných podmínek, dosahovali přibližně stejné velikosti (vždy větší než samice), nelišili se v délce těla, věkově ani hmotnostně. Pro první páření byla náhodně z každé dvojce vybrána jedna samice. Druhý den pářil samec druhou samici dané dvojce, za týden opět první a za další týden zase druhou atd. Každá samice tak byla pářena průběžně každých 14 dní, přičemž samec se pářil jednou za týden po celou dobu pokusu (vždy byl ponechán přes noc u samice) - to je podle mého soudu pro samce dostatečně dlouhá doba k obnově zásoby spermií, aby páření bylo úspěšné. Samice jsou schopny si v těle udržet spermie minimálně po dobu 6 měsíců, postupně však dochází k tvorbě nekvalitních, málo životaschopných vajíček (vlastní pozorování z předběžného pokusu). Častým pářením jsem chtěl zajistit stejnou kvalitu spermií u všech samic.

3.4 Krmení

Všechny pokusné samice byly nakrmeny po prvním páření, což je i datum začátku pokusu. Samice jsem nejprve krmil každý třetí den – hladové dostávaly přibližně 1 g cvrčků, dávka pro syté byla 1,5 g. Po 18 týdnech bylo krmení prováděno dvakrát týdně – první den změněného krmného harmonogramu byla podána krmná dávka postačující na tři dny (přibližně 1 g pro hladové a 1,5 g pro syté), čtvrtý den dostaly samice krmnou dávku na čtyři dny (přibližně 1,332 g pro hladové a 2 g pro syté), tento cyklus se pak opakoval až do konce pokusu. Při každém krmení byl zaznamenáván počet a hmotnost cvrčků (s přesností 0,001 g) určených pro danou samici. Všichni krmní cvrčci pocházeli od jednoho dodavatele, jednalo se o bezkřídlé nymfy, které jsem přikrmoval směsí ovoce, zeleniny a krmiva pro akvarijní rybičky. Před vlastním podáním jsem navážené cvrčky navíc obalil ve vitamínové směsi Roboran, pro lepší pokrytí potřeby vitamínů, minerálů a živin při náročné tvorbě vajec. V naprosté většině případů byli cvrčci zkonsumováni ihned po podání. Denní i celková krmná dávka pro jednotlivé samice se téměř nelišila od stanovených hodnot – tzn. 0,333 g cvrčků/den pro hladovou skupinu a 0,5 g cvrčků/den pro skupinu sytou (shrnuje v tab 2).

Tab. 2: Množství potravy přijaté jednotlivými samicemi během pokusu.

Samice	Krmný režim (H/S)	Očekávaná celková hmotnost potravy (g)	Celková hmotnost přijaté potravy (g)	Očekávaný příjem potravy/den (g)	Příjem potravy/den (g)	Celkový počet přijatých cvrčků
J1	H	69,930	70,687	0,333	0,337	191
K2	H	69,930	70,223	0,333	0,334	189
L1	H	69,930	71,455	0,333	0,340	185
M2	H	69,930	70,442	0,333	0,335	195
N1	H	69,930	70,673	0,333	0,337	192
O1	H	69,930	70,524	0,333	0,336	190
P1	H	69,930	70,483	0,333	0,336	194
Q2	H	69,930	70,463	0,333	0,336	200
J2	S	105,000	105,630	0,500	0,503	244
K1	S	105,000	105,427	0,500	0,502	256
L2	S	105,000	105,522	0,500	0,502	256
M1	S	105,000	105,441	0,500	0,502	247
N2	S	105,000	105,303	0,500	0,501	264
O2	S	105,000	105,592	0,500	0,503	266
P2	S	105,000	105,579	0,500	0,503	261
Q1	S	105,000	105,532	0,500	0,503	260

3.5 Snůšky a vejce

Prvních 18 týdnů pokusu jsem denně prohledával terária, abych zjistil přesné datum snůšky. Pak již kontrola přítomnosti snůšky probíhala dvakrát týdně, vždy před krmením. Hmotnost jednotlivých vajec byla zaznamenávána s přesností 0,001 g. Se stejnou přesností jsem vážil i samice po vykladení celé snůšky. Samice většinou snesly obě vejce v jeden den, ale občas je kladly i s odstupem několika dní. Pokud jsem našel druhé vejce do 4 dnů po snesení předešlého, označil jsem obě jako jednu snůšku. Pokud to bylo později, jednalo se už o 2 různé snůšky. Každé nalezené vejce dostalo svůj specifický kód: jako první symbol jsem použil označení samice, jako druhý číslo snůšky a jako třetí číslo vajíčka – to odpovídá pořadí jejich nalezení. Pro příklad uvádím označení druhého vejce 14. snůšky samice L2: L2 14 2 (kód byl spolu s datem napsán i na skořápku vajíčka měkkou tužkou).

Kearny a Shine (2004, 2005) porovnávali reprodukční parametry partenogenetických a bisexuálních populací australského gekona *Heteronotia bionei* v laboratorních podmínkách. Tyto práce jsem použil částečně jako vzor pro sumarizaci reprodukčních výstupů sytých a hladových samic. Pro všechny rozmnožující se samice byly zjištěny následující parametry: „celková doba kladení vajec“ – jde o časový úsek mezi první a poslední snůškou; „den snůšky v experimentu“ - kolikátý den od začátku pokusu byla snůška snesena; „průměrný interval mezi snůškami“ – jedná se o podíl časového úseku mezi první a poslední snůškou ku celkovému počtu snůšek mínus jedna: je totiž nemožné zjistit, kdy samice začala tvořit první snůšku, proto se interval týká jen snůšky druhé a následných; „celkový počet snůšek“, z toho počet „jednovaječných“ a „dvojvaječných snůšek“; „reprodukční úsilí“, což je celková hmotnost vajíček vyprodukovaných za celou dobu experimentu; „celkový počet vajíček“ za celou dobu experimentu; „průměrná délka tvorby jednoho vajíčka“ – jde o podíl časového úseku mezi první a poslední snůškou ku počtu vajíček za celou dobu experimentu. V dalším kroku bylo pomocí Mann-Whitney U testu testováno, zda se skupina hladových a sytých samic liší v těchto parametrech (kromě parametru „den snůšky v experimentu“).

Závislost hmotnosti vajíčka na identitě samice a jejím krmeném režimu testoval model hierarchické ANOVy. Jako spojitá závislá proměnná byla zvolena hmotnost vajíčka, kategoriálním náhodným faktorem byla identita samice a fixním faktorem byl krmený režim (hladová/sytá). Následně byl vytvořen graf závislosti hmotnosti vajíčka na identitě samice kontrolované na den snůšky v experimentu, respektive kontrolované na hmotnost samice po vykladení snůšky.

Ve třech případech nebyla zaznamenána hmotnost vejce v dané snůšce, to se stalo v důsledku jeho rozbití před zvážením. Pokud rozbité vejce bylo z dvojvejčné snůšky, byla chybějící hodnota nahrazena hodnotou druhého vejce. Pokud se jednalo o jednovaječnou snůšku, byla použita hodnota ze snůšky následující. Obecně je lepší nahradit chybějící hodnotu průměrem než ji vyloučit (Sokal & Rohlf 1995).

Po získání potřebných údajů byla z důvodu nedostatku prostoru označená vajíčka inkubována v plastových krabičkách se suchým pískem po cca 20 kusech. Asi 14 dní před koncem inkubace pak byla jednotlivá vajíčka umístěna do filmových krabiček se suchým pískem, krabičky byly pomocí gumičky překryty gázou tak, aby docházelo k cirkulaci vzduchu a zároveň aby vylíhlé mládě neuteklo. Celá inkubace probíhala v inkubátoru nastaveném na 30°C, vlhkost dosahovala přibližně 70%. Druh *Paroedura picta* má geneticky určené pohlaví, proto by zvolená teplota neměla mít vliv na poměr pohlaví, inkubace při této teplotě navíc trvá podstatně kratší dobu např. než při 26°C (viz charakteristika druhu) (Blumberg et al. 2002).

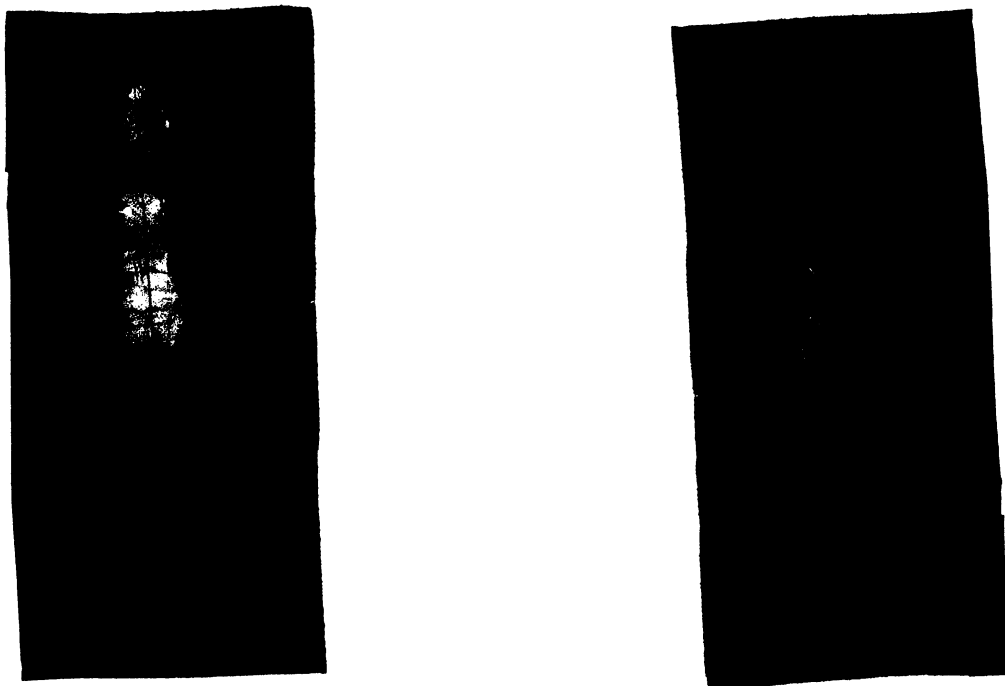
Pro analýzu délky inkubace byly použity přesné hodnoty zjištěné během prvních 18 týdnů (v následujícím období již nebyla prováděna denní kontrola přítomnosti snesených vajec). V modelu hierarchické ANOVy byla testována hypotéza, zda délka inkubace závisí na identitě samice (náhodná kategoriální proměnná) a její krmné skupině (hladová/sytá) (fixní kategoriální proměnná). Následným modelem lineární regrese jsem pak testoval závislost délky inkubace na hmotnosti vajíčka.

Po celou dobu pokusu byla zaznamenávána vajíčka rozbitá vinou mé špatné manipulace a vajíčka, která se nevyvíjela z jakýchkoli jiných důvodů (např. poškození samicí, smrt embrya). Z analýzy mortality vajíček byla vyloučena vejce rozbitá špatnou manipulací. Pro jednotlivé samice pak byla zjištěna „líhivost vajec“ – jedná se procentuální vyjádření podílu vylíhlých mlád'at ku celkovému počtu všech vajíček dané samice. Stejný výpočet byl proveden i pro obě krmné skupiny samic a pro všechny samice dohromady. Následný model GLZ s binomickým rozdělením a logit spojovací („link“) funkcí pak testoval, zda úspěšné vylíhnutí záleží na hmotnosti vajíčka, dni snůšky v experimentu či hmotnosti samice po vykladení (spojité vysvětlující proměnné). Jako kategoriální faktor byla zvolena identita samice.

3.6 Mlád'ata

Během prvních 18 týdnů experimentu jsem denně kontroloval přítomnost vylíhnutých mlád'at v inkubátoru. Později byla kontrola prováděna každý všední den. Čerstvě vylíhlá mlád'ata byla zvážena (stejně jako vaječná skořápka) s přesností 0,001 g. Modelem lineární regrese pak byla testována závislost hmotnosti mláděte na hmotnosti vajíčka. Dále byly zaznamenány a sumarizovány vývojové odchylky a abnormality do tří kategorií: nezatažený vaječný žloutek (po vylíhnutí osychá a upadá, správně má být před vylíhnutím vtažen do břišní dutiny), lehké deformace (např. pokrivený ocas), těžké deformace (deformace hlavy, páteře apod.).

Všechna mlád'ata byla v den vylíhnutí usmrcena (ze začátku éterem, později zchlazením). Následně byla mrtvá mlád'ata naskenována z ventrální i dorzální strany. Sken ventrální strany těla pak byl použit pro změření základních parametrů v programu ImageTool (UTHSCSA 2002). Zjišťována byla délka těla (od špičky tlamky po kloaku), délka ocasu (od kloaky po špičku ocasu) a šířka hlavy v nejširším místě (obr. 7).



Obr. 7 Sken mláděte z a) ventrální strany (se znázorněnými měřenými rozměry) a b) dorzální strany. Milimetrový papír sloužil ke kalibraci hodnot.

3.7 Determinace pohlaví mlád'at

Pohlavní orgány mlád'at byly určeny za pomoci srovnávací pitvy dospělých zvířat. Dospělý samec má vzhledem k tělu relativně velká varlata elipsovitého tvaru o rozměrech přibližně 9 x 6 mm. Orgány stejné struktury, tvaru i relativní velikosti (cca 1,3 x 0,7 mm) jsem našel i u některých mlád'at, která jsem díky tomu určil jako samce a orgány jako varlata (obr. 8). Pitvaná dospělá samice měla již zvětšené folikuly, i když ještě nikdy předtím nebyla spářena. Na největším folikulu v každém ovariu jsem našel plochou oválnou strukturu o rozměrech asi 1,5 x 1 mm. Podobnou tkáň stejné struktury i tvaru jsem našel u mlád'at druhé skupiny (bez patrných varlat) v místech, kde určení samci měli varlata, orgány byly mnohem menší – cca 0,2 x 0,1 mm. Tito jedinci byli určeni jako samice a orgány jako ovaria. Žádné struktury jiného typu jsem v tomto místě nepozoroval. Gonády vykazují v rámci jednoho pohlaví patrnou variabilitu, vždy však byl větší rozdíl mezi pohlavími. Determinaci pohlaví jsem prováděl pomocí binokulární lupy s 16 - násobným zvětšením.



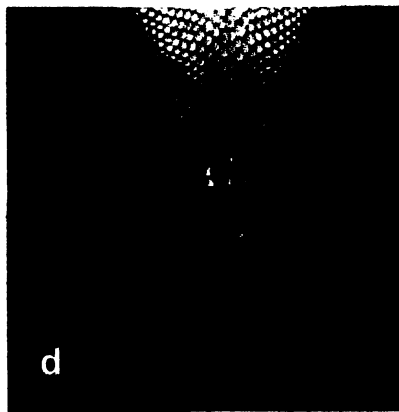
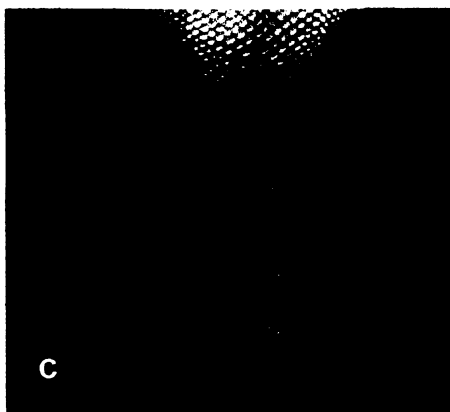
Obr. 8 Srovnání gonád a) dospělého samce a b) pitvaného mláděte samčího pohlaví. Varlata jsou v černém kruhu.

Tato metoda určování pohlaví je vysoce spolehlivá. Neurčeno zůstalo pouze 6 jedinců ze začátku pokusu, kteří byli pitváni ještě před srovnávací pitvou dospělých zvířat (gonády byly omylem odstřiženy, tato mláďata se nepodařilo zpětně dourčit). Poměr pohlaví mláďat byl určen pro každou samici zvlášť, stejně tak i pro obě krmné skupiny samic a pro všechna mláďata dohromady. V jednotlivých případech byl poměr pohlaví testován pomocí χ -kvadrátu, zda není vychýlen ve prospěch jednoho pohlaví. Následně jsem použil model GLZ logistické regrese pro potomky každé samice zvlášť (binomické rozdělení, logit „link“ funkce), abych otestoval celkový model závislosti pohlaví mláděte na hmotnosti vajíčka, hmotnosti samice po vykladení snůšky a na dni snůšky v experimentu. Pro tuto analýzu 15 nezávislých souborů bylo třeba souhrnné hladiny významnosti α - upravil jsem ji pomocí Bonferoniho korekce na $0,05/15$, tj. na $0,0033$.

Pro testování závislosti hmotnosti mláděte na délce jeho těla při kategoriální náhodné proměnné identita samice a fixní kategoriální proměnné pohlaví mláděte byla použita procedura GLIM mix. Při tvorbě modelu byla jako kovariáta pro oba parametry (hmotnost a délka těla mláděte) použita hmotnost vajíčka. V návaznosti na předchozí model byla pomocí multivariátní regrese testována závislost délky těla mláděte na jeho šířce hlavy a délce ocasu opět při náhodné proměnné identita samice a fixní proměnné pohlaví – tzn. zda závisí relativní tvar potomka na identitě matky, případně na jeho pohlaví.

Pohlaví dospělých gekonů *Paroedura picta* je velmi snadno určitelné díky výraznému pohlavnímu dimorfismu ve velikosti párového pářícího orgánu – hemipenisu, který je uložen těsně za kloakou (obr. 9). Při pitvě dospělých zvířat je po odtržení pokožky patrná nápadnost samčího a samičího hemipenisu („hemiklitorisu“). Samčí hemipenis je válcovitý, dobře prokrvený a přibližně dvakrát větší než samičí, který je také více splasklý. Čerstvě narozená mláďata takovýto výrazný vnější pohlavní znak nemají. V několika pracích (Robert & Thompson 2001, Olsson & Shine 2001, Wapstra et al. 2004) určovali autoři pohlaví mláďat u ještěřů metodou vytlačování hemipenisů - mládě s vytlačeným (= větším) hemipenise pak bylo určeno jako samec. Mně se však nepodařilo nikdy žádnému mrtvému mláděti *Paroedura picta* hemipenis vymáčkout a ani při pitvě jsem nenalezl žádný výrazný rozdíl v tomto orgánu mezi pohlavími. Abych otestoval, zda u tohoto druhu existuje pohlavní dimorfismus ve velikosti hemipenisu u čerstvě vylíhlých mláďat, změřil jsem délku hemipenisů u 290 mláďat. Měření bylo prováděno opět pomocí binokulární lupy s vyleptaným měřítkem při 16 - násobném zvětšení. Zaznamenával jsem vždy největší zjištěný rozměr jednoho z obou orgánů. Pro analýzu naměřených hodnot jsem nejprve

zjistil průměrnou délku hemipenisu u obou pohlaví. Následně byla pomocí GLIM mix modelu testována závislost délky hemipenisu na délce těla mláděte při kategoriálních proměnných identita samice (náhodný faktor) a pohlaví mláděte (fixní faktor).



Obr. 9 Rozdíly v proporcích hemipenálního vaku a) samce, b) samice, c) mláděte samčího pohlaví a d) mláděte samičího pohlaví.

4. VÝSLEDKY

Výsledky jednotlivých analýz jsou uváděny v pořadí, ve kterém jsou prezentovány v metodice.

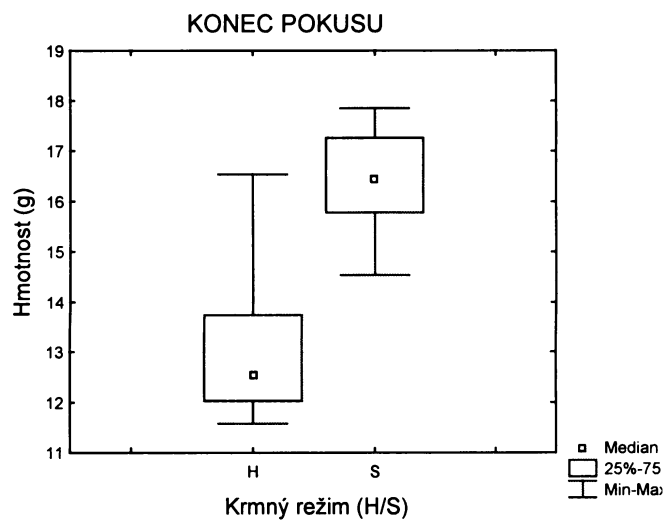
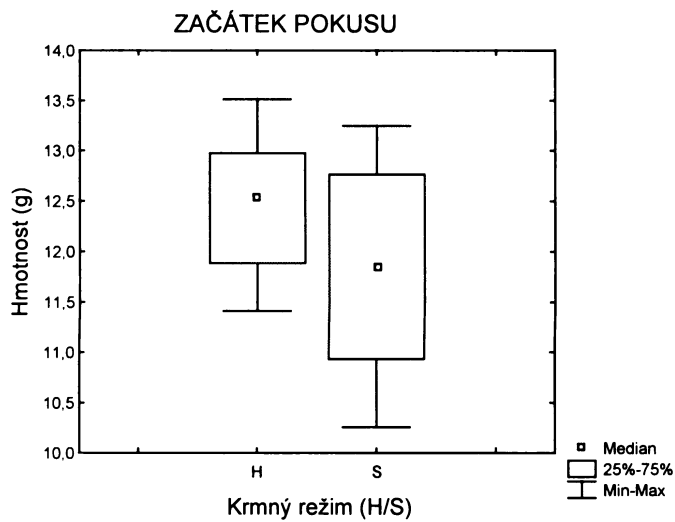
4.1 Samice

Na konci experimentu bylo provedeno srovnání tělesných rozměrů samic obou krmných skupin. Z této analýzy byla vyloučena samice Q2 (podrobněji v metodice). Syté a hladové samice se výrazně lišily v hmotnosti ($U = 4$; $P = 0,004$); hladové byly v průměru o téměř 3,5 gramu lehčí – 13,065 g ($SE = 0,521$), syté vážily v průměru 16,417 g ($SE = 0,488$). Obě skupiny se už ale nelišily v délce těla ($U = 23,5$; $P = 0,61$); průměr pro hladové byl 79,46 mm ($SE = 0,87$), pro syté 79,9 mm ($SE = 0,82$). Nebyl nalezen ani průkazný rozdíl v délce hlavy ($U = 15$; $P = 0,15$): pro hladové 23,49 mm ($SE = 0,17$), pro syté 23,86 mm ($SE = 0,16$). Naměřené hodnoty pro jednotlivé samice jsou uvedeny v tab. 3. Obr. 10 porovnává zjištěné údaje na začátku a na konci experimentu.

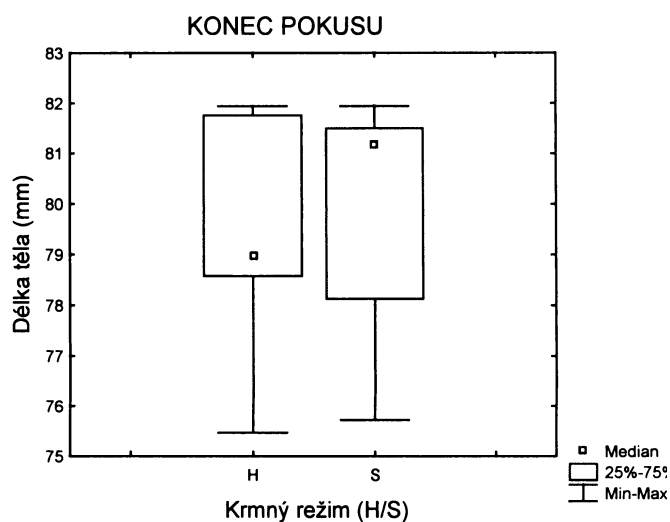
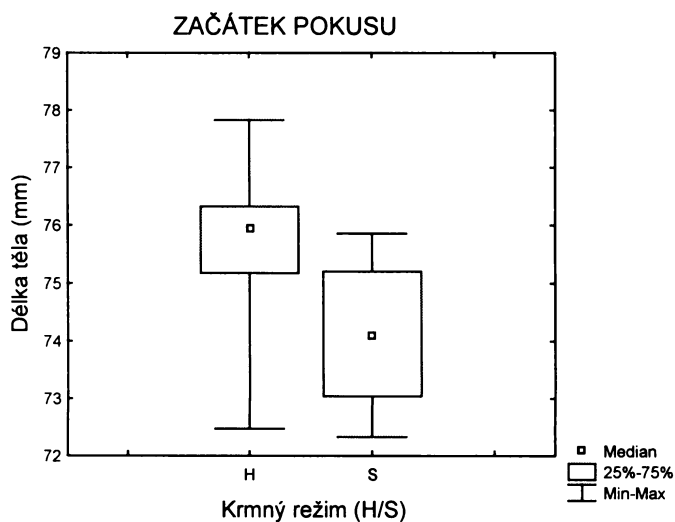
Tab. 3 Hodnoty zjištěné pro jednotlivé samice na konci experimentu. Samice Q2 (během experimentu se nemnožila) je zvýrazněna tučně.

Samice	Krmný režim (H/S)	Hmotnost (g)	Délka těla (mm)	Délka hlavy (mm)
J1	H	12,525	78,58	23,87
K2	H	12,035	81,94	23,62
L1	H	11,581	80,72	23,52
M2	H	12,552	78,78	23,26
N1	H	16,538	81,76	24,35
O1	H	13,745	75,47	22,76
P1	H	12,480	79,00	23,07
Q2	H	21,258	87,65	23,88
J2	S	16,609	81,94	24,00
K1	S	17,535	79,31	23,35
L2	S	15,685	81,61	23,60
M1	S	14,540	81,26	24,26
N2	S	15,874	75,72	23,89
O2	S	16,266	81,05	24,37
P2	S	17,851	76,95	23,48
Q1	S	16,978	81,38	23,96

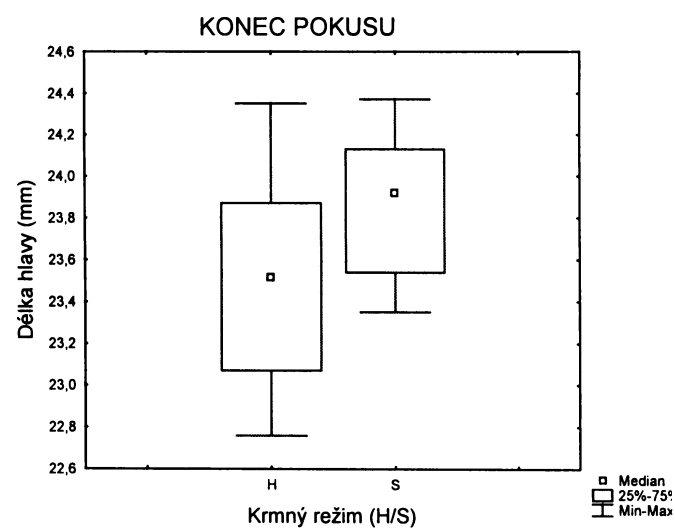
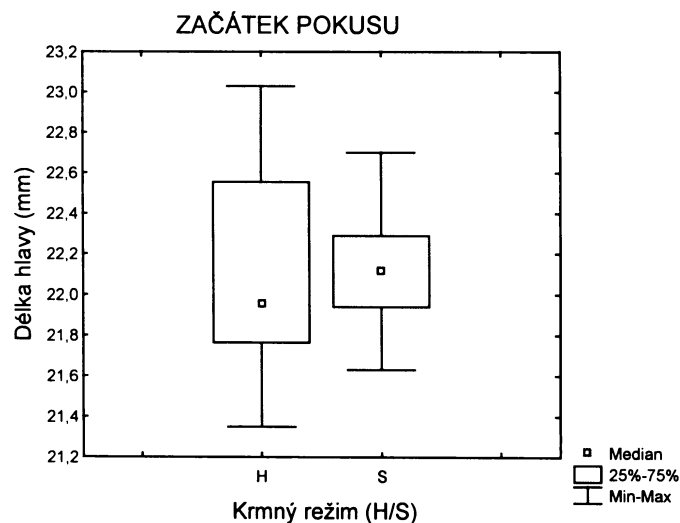
a)



b)



c)

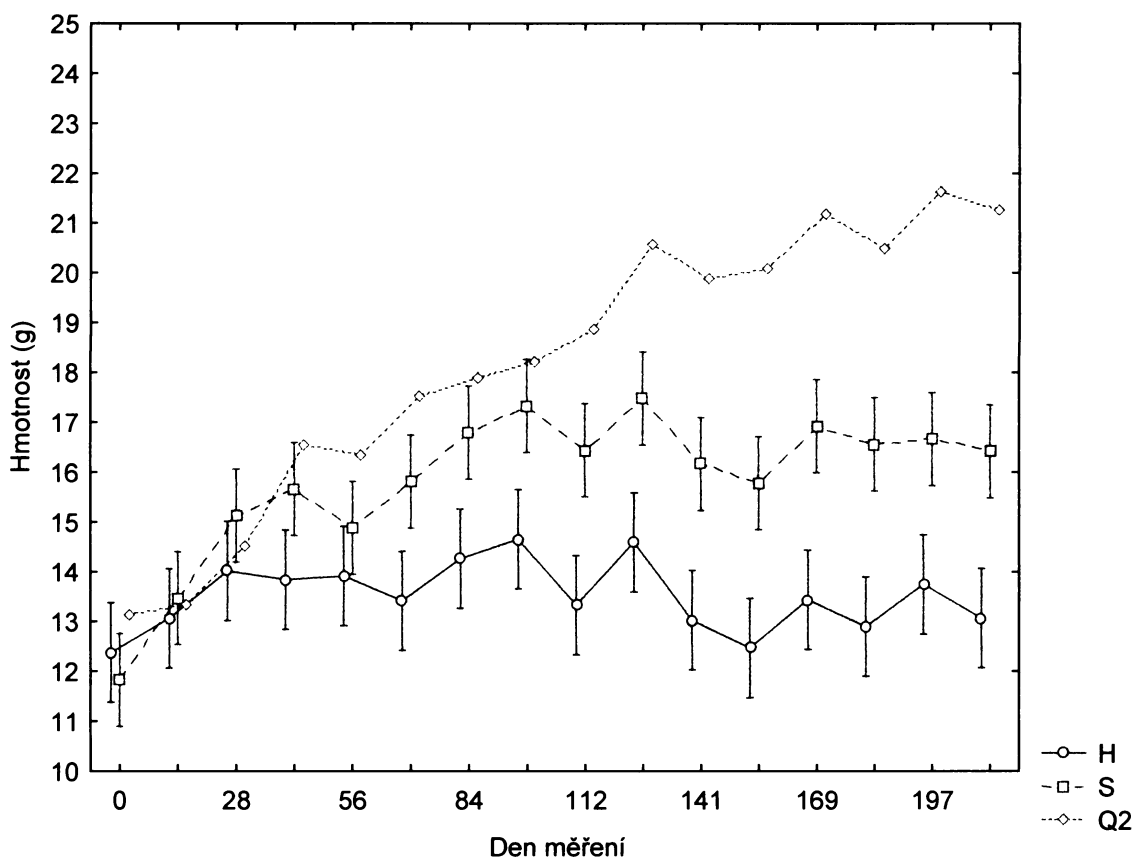


Obr. 10: Porovnání a) hmotnosti, b) délky těla a c) délky hlavy na začátku a konci pokusu.

Grafy závislosti jednotlivých sledovaných parametrů (hmotnost, délka těla a pod.) na dni měření v experimentu (obr. 11 až 14) názorně ukazují, do jaké míry byly jednotlivé samice ovlivněny svým krmným režimem. Pro obě skupiny je v daném bodě znázorněn jednak průměr (zvýrazněný střed) a jednak rozptyl zjištěných hodnot. Q2 představuje hodnoty pouze pro samici Q2.

Graf pro hmotnost (obr. 11):

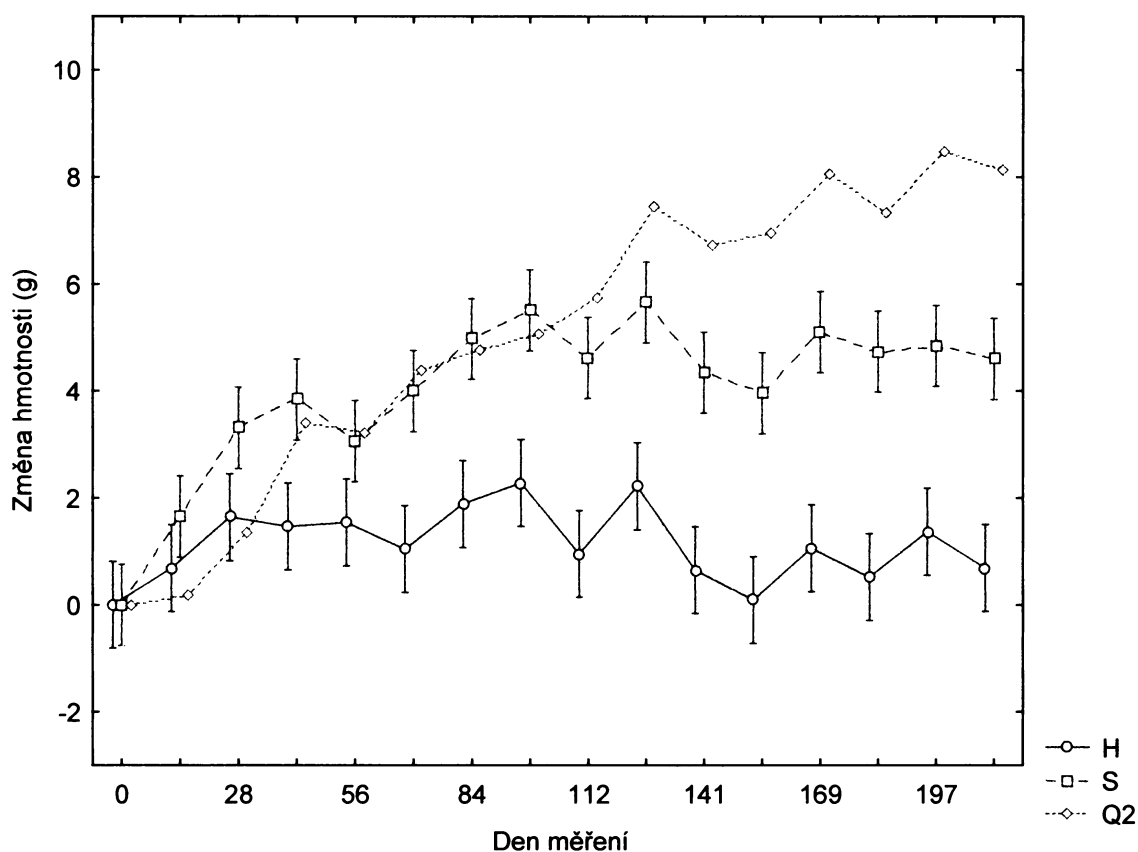
Během prvních 50 dnů nejsou mezi oběma skupinami samic patrné výrazné hmotnostní rozdíly, v následujícím časovém úseku se rozdíl mezi hladovými a sytými víceméně neustále prohlubuje. Q2 se od hladových samic (do této skupiny svým krmným režimem patřila) oddělila po 30 dnech a následně víceméně opisovala trend sytých, který definitivně opustila kolem 100. dne pokusu a dále pořád výrazně přibírala na váze.



Obr. 11 Graf závislosti hmotnosti na dni měření. H je symbol pro hladové samice, S pro syté a Q2 představuje hodnoty pouze pro samici Q2.

Graf pro změnu hmotnosti v průběhu experimentu vzhledem k hmotnosti na počátku pokusu (obr. 12):

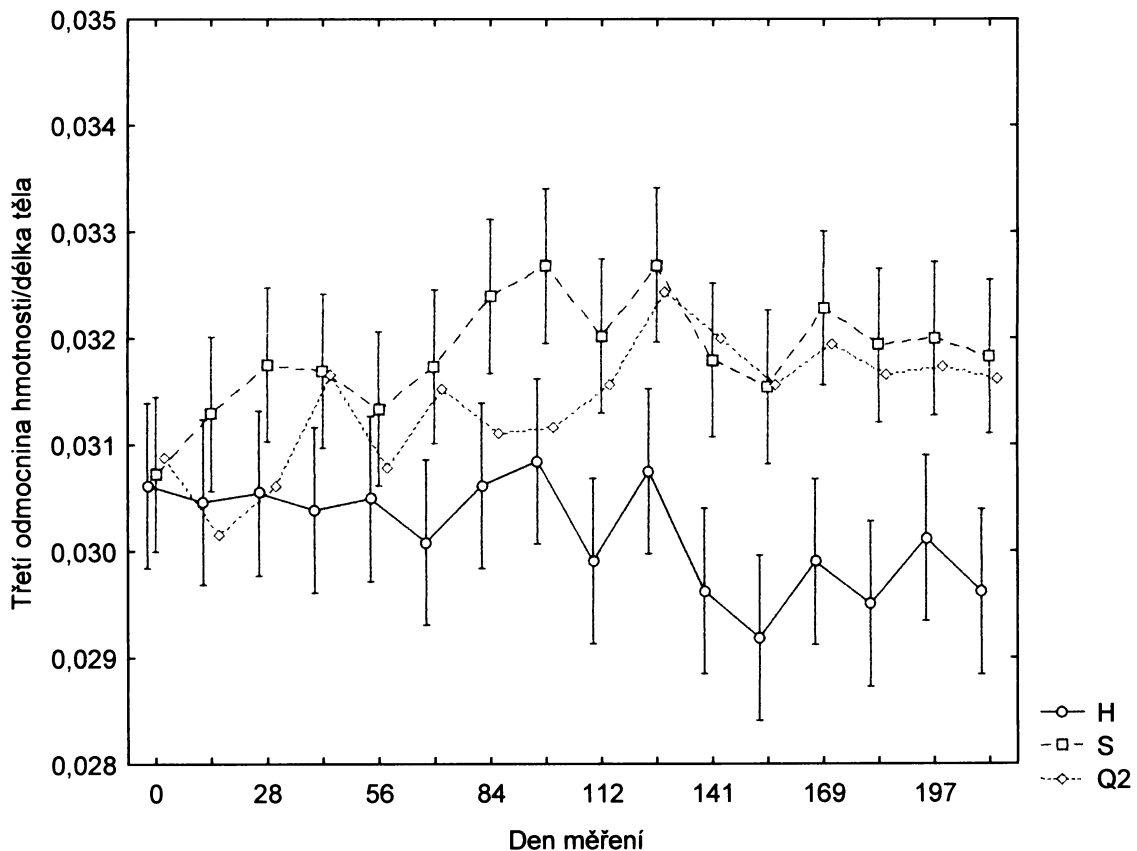
Zde jsou ještě patrnější rozdíly ve změně hmotnosti. Hladové samice byly na konci přibližně jen o 0,5 g těžší než na začátku. Syté naopak přibraly kolem 4,5 g. Rozdíl mezi oběma skupinami byl pak téměř 3,5 g. Hladové samice zaostávaly v přírůstku za sytými již po necelých 30 dnech - svou hmotnost již více nezvyšovaly, ke konci ji spíše snížily. Nerozmnožující se samice Q2 prvních 28 dní přibírala jako hladové samice, následně pak po dalších 70 dní přesně kopírovala přírůstek sytých samic. Ty už pak ale v tomto trendu nepokračovaly a svou hmotnost si udržely na stejné úrovni po zbytek pokusu, zatímco Q2 přibírala neustále.



Obr. 12. Graf závislosti změny hmotnosti na dni měření. H je symbol pro hladové samice, S pro syté a Q2 představuje hodnoty pouze pro samici Q2.

Graf pro hmotnost kontrovanou na délku těla (obr. 13):

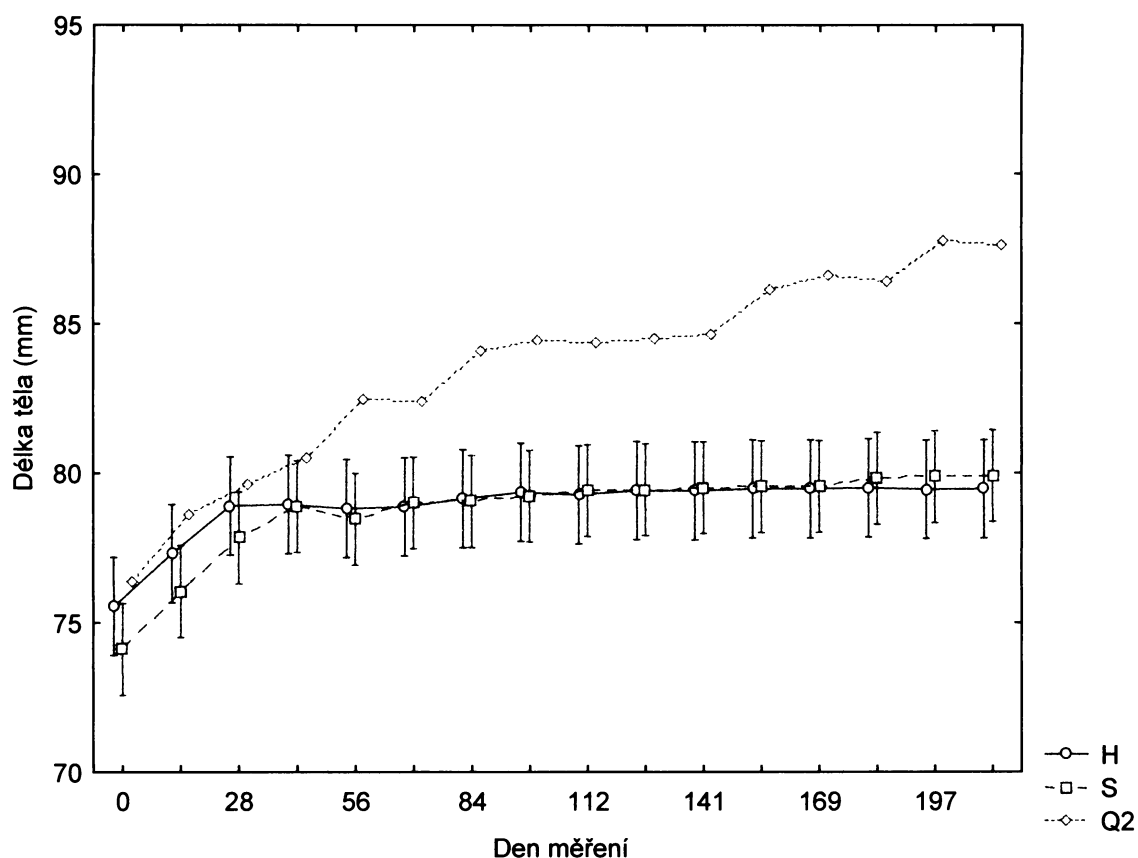
Poměr třetí odmocniny hmotnosti samice ku délce těla představuje relativní množství tukových zásob samice po odfiltrování délky těla (detailněji v metodice). Hladové samice měly prvních cca 130 dní pokusu relativně stejné množství tukových zásob, pak nastal mírný propad a následná stabilizace na nižší hodnotě. Syté samice na rozdíl od hladových ze začátku postupně tukové zásoby zvyšovaly. Asi po 100 dnech přestaly přibírat a okolo 140. dne nastal mírný propad, následně došlo ke stabilizaci na nižší hodnotě (podobně jako u hladových samic). Q2 nejprve mezi oběma skupinami oscilovala směrem k sytým, od 110. dne byl stav jejích tukových zásob téměř totožný se sytými samicemi (shodné i v kolísání zásob).



Obr 13. Graf závislosti třetí odmocniny hmotnosti/délky těla na dni měření. H je symbol pro hladové samice, S pro syté a Q2 představuje hodnoty pouze pro samici Q2.

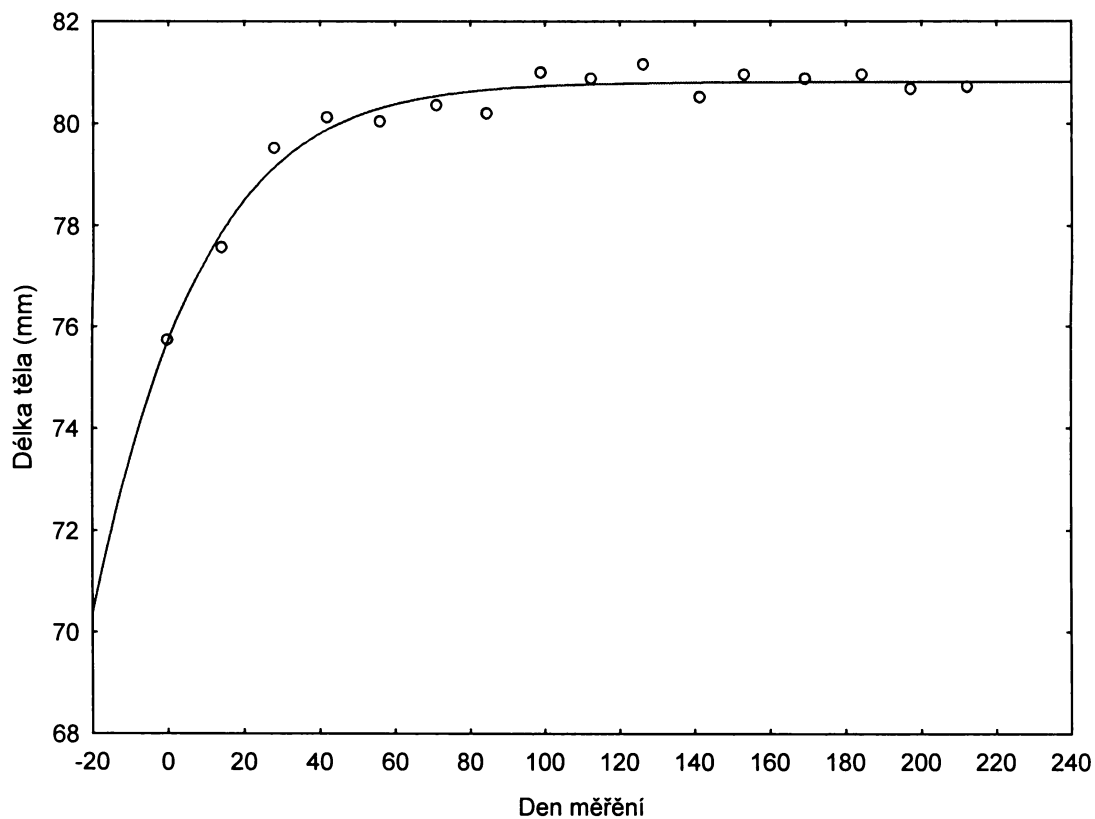
Graf pro délku těla (obr. 14):

Přes počáteční rozdíly v průměrné délce těla obou skupin (hladové byly o 1,5 mm delší) dosahovaly nakonec všechny samice stejných rozměrů. Růst však evidentně nebyl lineární - všechny samice (včetně Q2) rostly podle růstové křivky. Prvních 28 dní probíhal růst všech samic stejným tempem. Hladové pak víceméně přestaly růst. Syté rostly ještě do dalšího měření (tj. 42. den pokusu), jejich růst pak se pak zastavil na stejné velikosti jako u hladových samic. Q2, která do této doby (42. den) rostla stejně jako ostatní samice, se oddělila a pokračovala v růstu vlastním tempem (stejně jako její hmotnost).



Obr. 14 Graf závislosti délky těla na dni měření. H je symbol pro hladové samice, S pro syté a Q2 představuje hodnoty pouze pro samici Q2.

Proložením růstové křivky pro každou samici byla odhadnuta hodnota pro asymptotickou délku těla (a), koeficient b vztahující se k počáteční velikosti v den začátku experimentu a rychlost růstu (r). Růstové křivky vysvětlily relativně vysoké procento celkové variability jednotlivých souborů dat (R^2) (tab. 4). Příklad proložené růstové křivky pro jednu samici je znázorněn na obr. 15.



Obr. 15 Proložení růstové křivky pro samici K2.

Tab. 4 Zjištěné hodnoty pro a, b, r, R². Samice Q2 je zvýrazněna.

samice	Krmný režim (H/S)	a	a-SE	b	b-SE	r	r-SE	R ² (%)
J1	H	78,59	0,10	0,18	0,02	0,059	0,010	93
K2	H	81,64	0,14	0,22	0,02	0,063	0,012	92
L1	H	80,82	0,09	0,22	0,01	0,043	0,005	97
M2	H	78,60	0,15	0,09	0,01	0,025	0,008	81
N1	H	81,58	0,10	0,15	0,01	0,026	0,003	96
O1	H	75,55	0,07	0,13	0,01	0,092	0,018	92
P1	H	79,07	0,09	0,14	0,01	0,086	0,019	90
Q2	H	88,56	0,82	0,53	0,04	0,012	0,002	97
J2	S	81,33	0,15	0,35	0,03	0,053	0,007	96
K1	S	79,01	0,10	0,22	0,01	0,045	0,005	96
L2	S	81,72	0,19	0,25	0,02	0,031	0,005	93
M1	S	81,09	0,13	0,29	0,02	0,035	0,004	97
N2	S	75,50	0,10	0,14	0,01	0,035	0,006	93
O2	S	81,22	0,19	0,24	0,01	0,019	0,002	97
P2	S	76,15	0,18	0,16	0,02	0,038	0,011	82
Q1	S	81,08	0,12	0,28	0,02	0,072	0,011	95

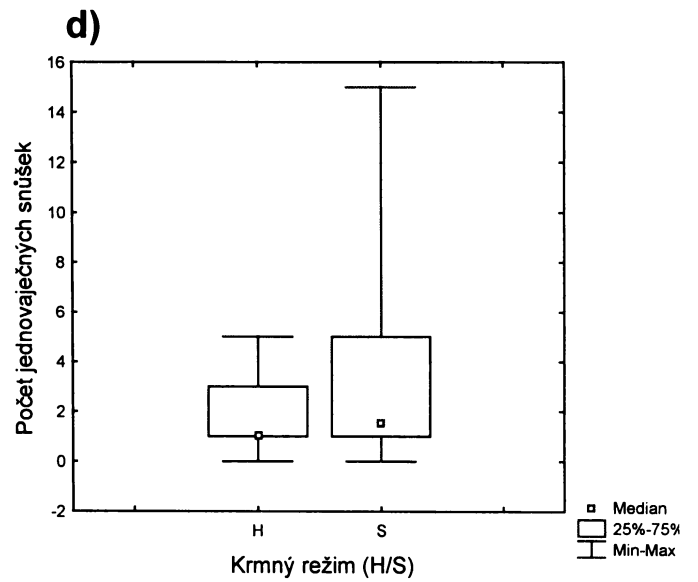
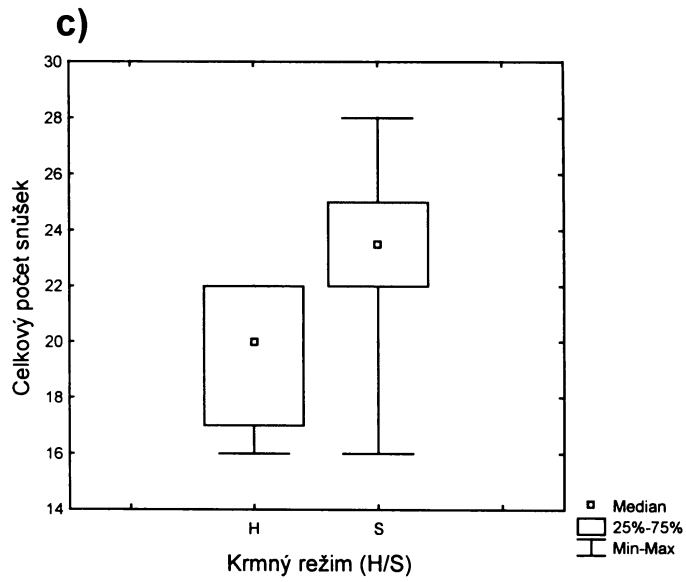
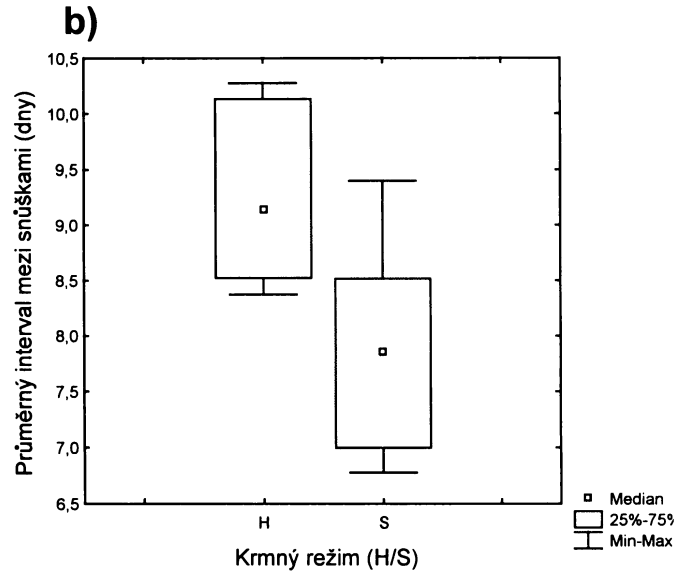
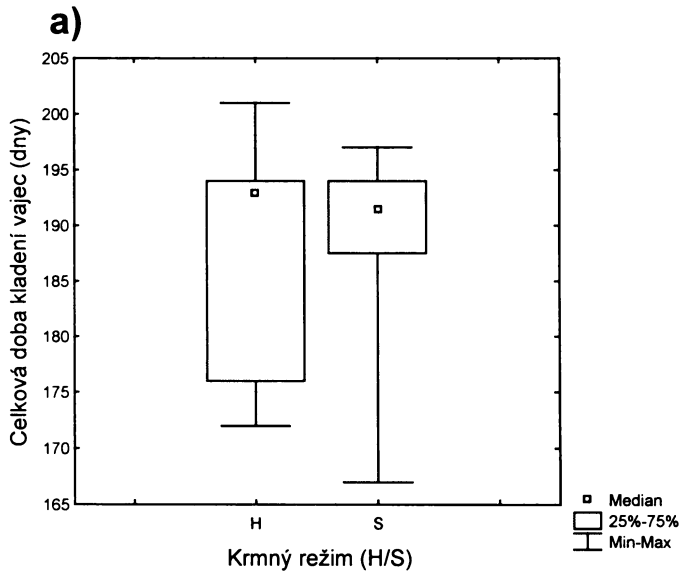
Samice obou skupin se nelišily v rychlosti růstu ($U = 19$; $P = 0,34$) ani v asymptotické délce těla ($U = 25$; $P = 0,78$). Lišily se však v koeficientu (b), který se vztahuje k délce těla na začátku měření ($U = 7$; $P = 0,014$), což je v souladu s jejich drobnými rozdíly ve velikosti na začátku experimentu. Následný test neparametrické korelace asymptotické délka těla s rychlosti růstu dopadl neprůkazně po vyloučení samice Q2 (Spearmanův korelační koeficient = -0,243; $P = 0,38$), i po jejím ponechání v datovém souboru (Spearmanův korelační koeficient = -0,377; $P = 0,15$). Rychlost růstu tedy pravděpodobně nemá vliv na asymptotickou délku těla samice. Samice se vzájemně neliší v těchto parametrech.

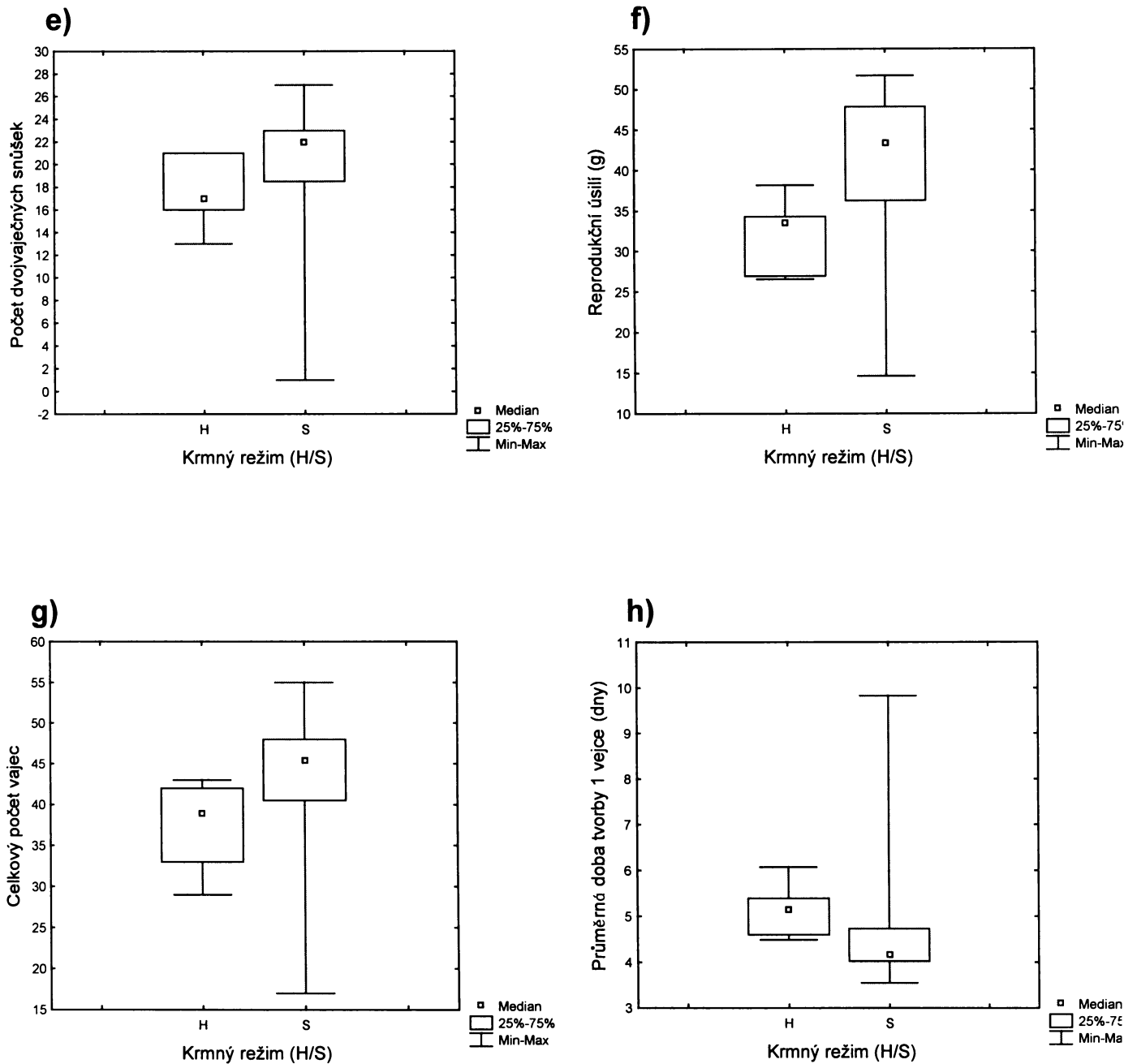
4.2 Snůšky a vejce

Po sumarizaci a kategorizaci reprodukčních výstupů sytých a hladových samic (tab. 5) byla provedena analýza pomocí neparametrického Mann-Whitney U - testu. Skupiny samic se vzájemně nelišily v celkové době kladení vajec ($U = 28$; $P = 1,0$); hladové kladly v průměru 188,0 dnů ($SE = 3,8$), syté 188,8 dnů ($SE = 3,5$). Lišily se však v průměrném intervalu mezi jednotlivými snůškami ($U = 7$; $P = 0,014$); u hladových to bylo 9,2 dne ($SE = 0,3$), u sytých 7,9 dne ($SE = 0,3$). Průkazný rozdíl byl nalezen i v celkovém počtu snůšek ($U = 9$; $P = 0,029$); průměrný počet snůšek pro hladové byl 19,6 ($SE = 1,2$), pro syté 23,1 ($SE = 1,1$). V počtu jednovaječných snůšek se skupiny nelišily ($U = 24$; $P = 0,69$); průměrně měly hladové samice 1,9 jednovaječných snůšek ($SE = 1,5$), u sytých to bylo 3,8 ($SE = 1,4$). V počtu dvojevaječných snůšek se také průkazně nelišily ($U = 13,5$; $P = 0,094$); hladové kladly v průměru 17,7 dvojevaječných snůšek ($SE = 2,3$), syté jich snesly průměrně 19,4 ($SE = 2,2$). Obě skupiny se lišily v reprodukčním úsilí ($U = 9$; $P = 0,029$); průměrná celková hmotnost vyprodukovaných vajec byla pro hladové 31,808 g ($SE = 3,419$), pro syté 40,147 g ($SE = 3,198$). Marginálně se lišily v celkovém počtu snesených vajec ($U = 11,5$; $P = 0,054$); hladové snesly v průměru 37,3 vajec ($SE = 3,4$), syté snesly 42,5 vajec ($SE = 3,2$). Marginálně se lišila i průměrná doba tvorby 1 vajíčka ($U = 11,5$; $P = 0,054$); průměrná doba potřebná k tvorbě jednoho vajíčka byla pro hladové 5,1 dní ($SE = 0,6$), pro syté pak 4,9 dní ($SE = 0,5$). Boxploty pro výsledné analýzy jsou znázorněny na obr. 16.

Tab. 5 Zjištěné hodnoty pro jednotlivé samice v pořadí, jak byly analyzovány.

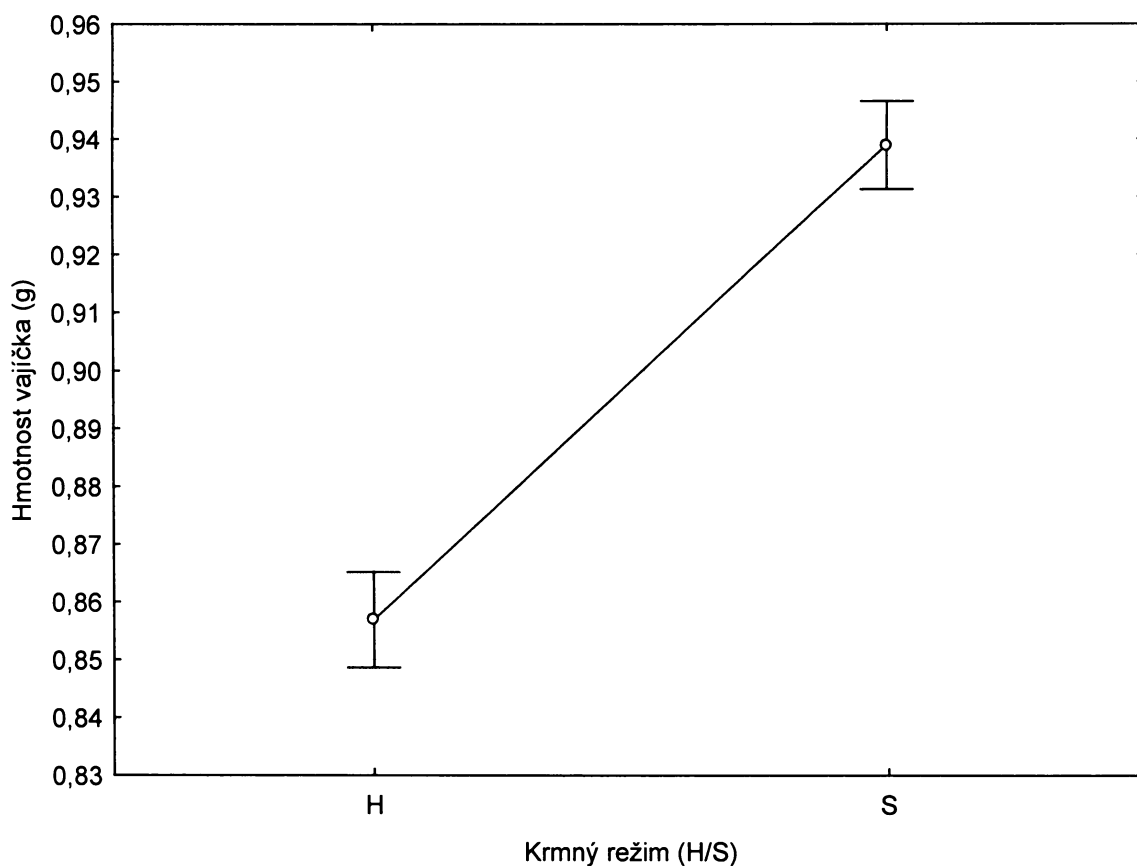
Samice	Krmný režim (H/S)	Celková doba kladení vajec (dny)	Průměrný interval mezi snůškami	Celkový počet snůšek	Počet jednovaječných snůšek	Počet dvojevaječných snůšek	Reprodukční úsilí (g)	Celkový počet vajec	Průměrná doba tvorby jednoho vajíčka (dny)
J1	H	187	9,2	20	1	19	33,436	39	4,8
K2	H	193	8,5	22	1	21	38,180	43	4,5
L1	H	201	9,1	22	5	17	34,294	39	5,2
M2	H	193	9,0	21	0	21	33,910	42	4,6
N1	H	176	10,1	16	3	13	26,535	29	6,1
O1	H	194	10,3	19	2	17	29,387	36	5,4
P1	H	172	8,4	17	1	16	26,911	33	5,2
J2	S	190	7,0	25	3	22	43,280	47	4,0
K1	S	167	9,4	16	15	1	14,659	17	9,8
L2	S	195	6,8	28	1	27	51,679	55	3,5
M1	S	197	7,7	25	1	24	48,152	49	4,0
N2	S	193	8,1	23	1	22	43,340	45	4,3
O2	S	193	8,9	21	0	21	36,870	42	4,6
P2	S	190	8,0	23	7	16	35,662	39	4,9
Q1	S	185	7,0	24	2	22	47,532	46	4,0



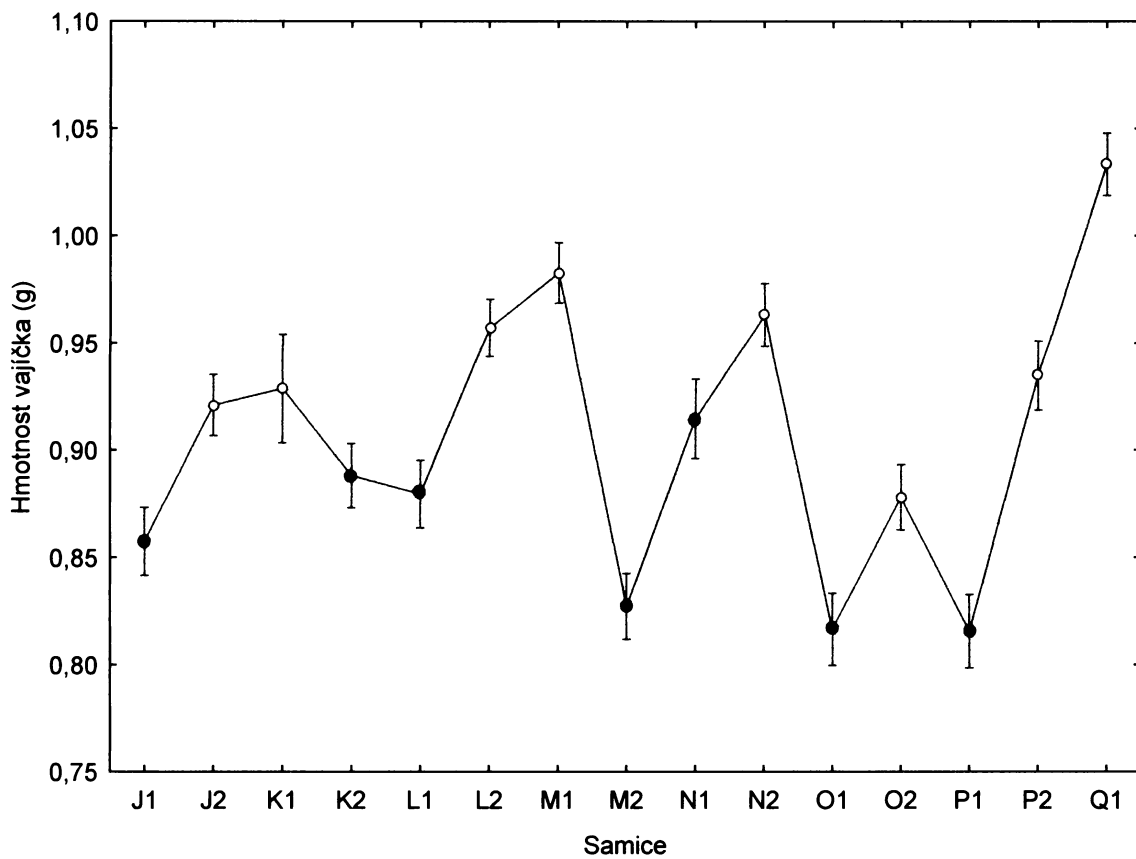


Obr 16: Srovnání obou skupin samic (H = skupina hladových, S = skupina sytých) pro a) celkovou dobu kladení vajec, b) průměrný interval mezi snůškami, c) celkový počet snůšek, d) počet jednovaječných snůšek, e) počet dvojvaječných snůšek, f) reprodukční úsilí, g) celkový počet vajec a h) pro průměrnou dobu tvorby jednoho vejce.

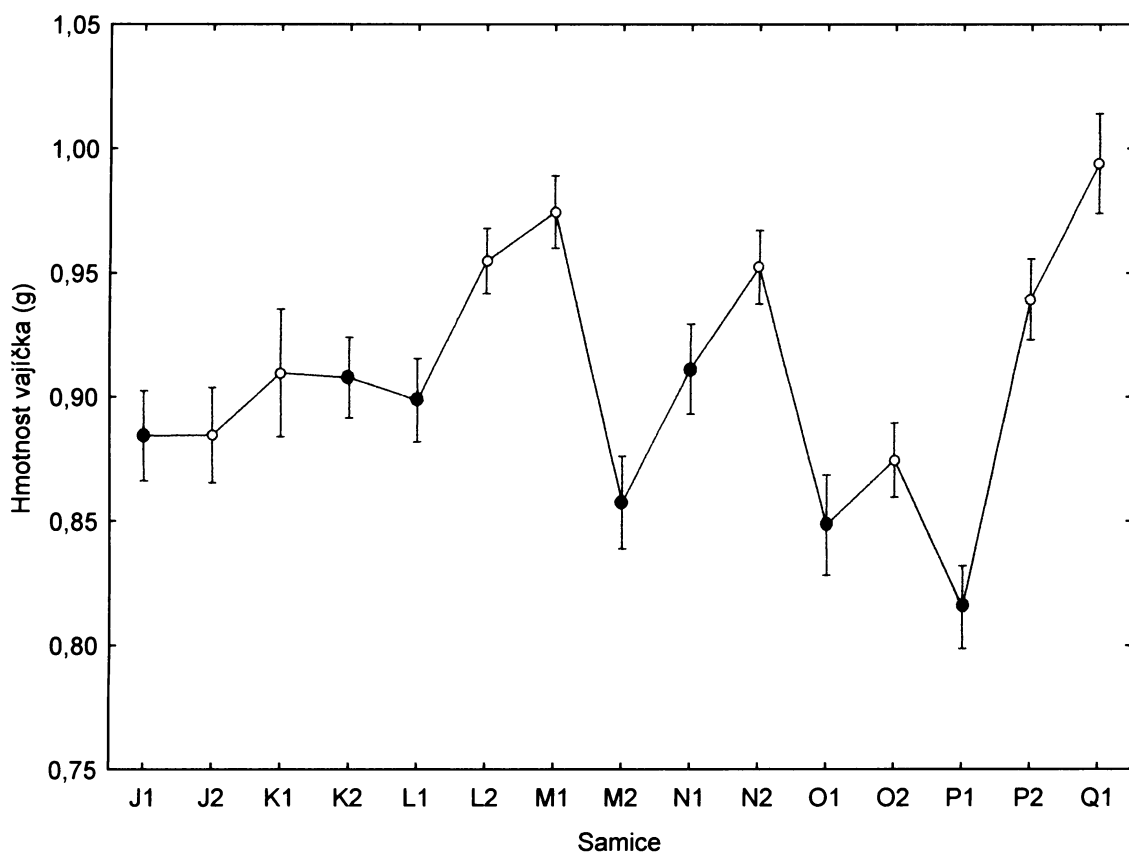
Závislost hmotnosti vajíčka na identitě samice a jejím krmném režimu testoval model hierarchické ANOVy. Hmotnost vajíčka závisela jak na identitě samice ($F = 19,2$; $P \ll 0,001$), tak na její krmné skupině (H/S) ($F = 205,7$; $P \ll 0,001$). Rozdíly v hmotnosti vajíčka jsou mezi sytou a hladovou skupinou znázorněny na obr. 17. Grafy závislosti hmotnosti vajíčka na identitě samice kontrolované na a) den snůšky v experimentu, respektive kontrolované na b) hmotnost samice po vykladení snůšky byly provedeny v GLM (obr. 18a, b).



Obr. 17. Graf závislosti hmotnosti vajíčka na krmném režimu samice.

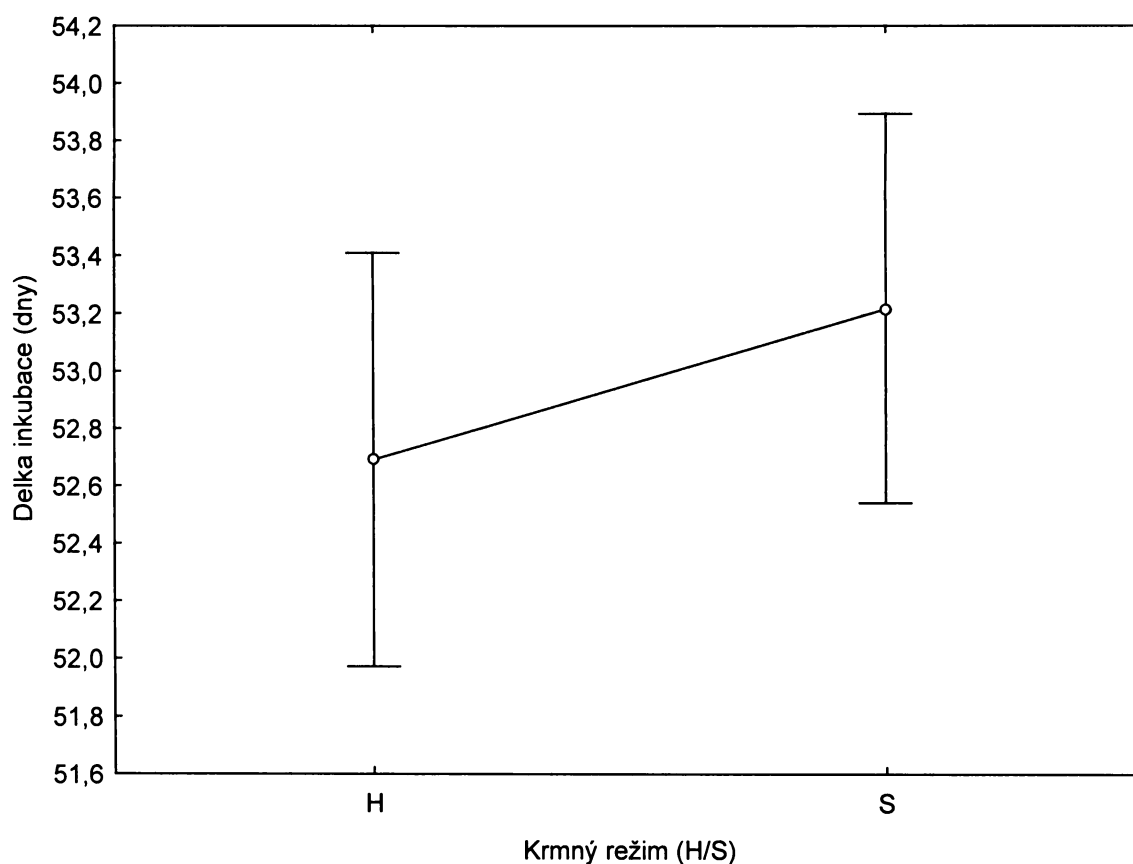


Obr 18a Graf závislosti hmotnosti vajíčka na identitě samice při kontrole na den snůšky v experimentu. Plné červené kolečko označuje hladové samice.

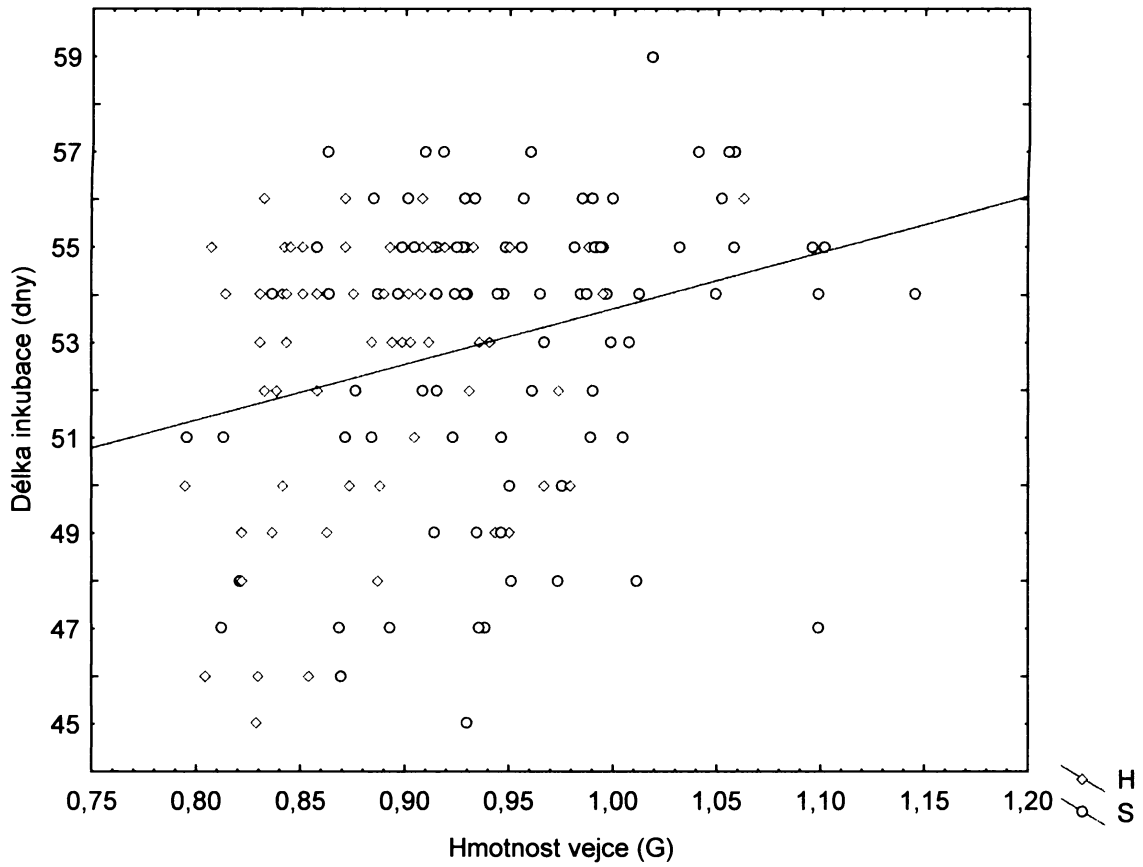


Obr 18b Graf závislosti hmotnosti vajíčka na identitě samice při kontrole na hmotnost samice po vykladení snůšky. Plné červené kolečko označuje hladové samice.

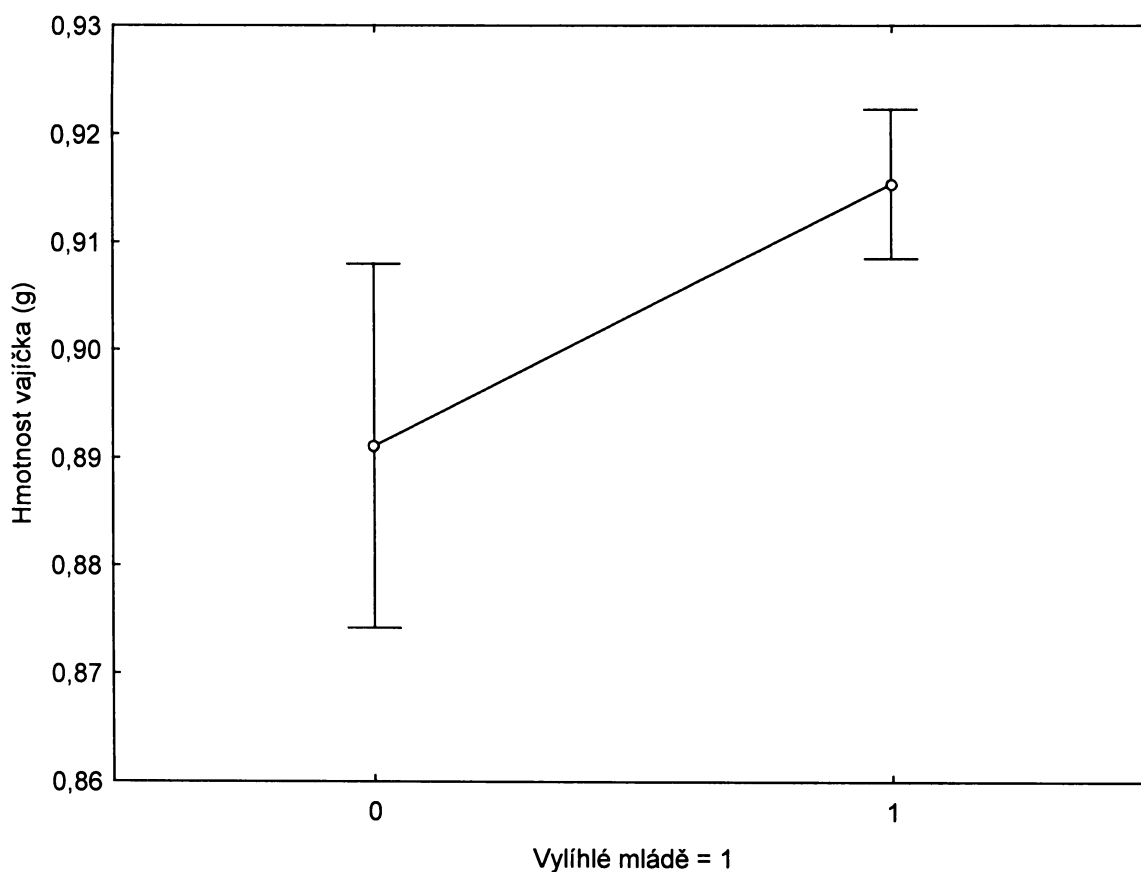
V modelu hierarchické ANOVy byla dále testována závislost délky inkubace na identitě samice a jejím krmném režimu. Délka inkubace nezávisela na identitě samice ($F = 1,4$; $P = 0,17$), ani na její krmné skupině (H/S) ($F = 1,1$; $P = 0,29$). Obr. 19a znázorňuje tento vztah pro krmný režim samic: mezi oběma skupinami není patrný rozdíl v délce inkubace (v průměru okolo 53 dnů pro obě skupiny). Lineární regresí byla zjištěna závislost mezi délkou inkubace a hmotností vajíčka ($P < 0,001$) (obr. 19b) – tento model ale vysvětluje relativně nízké procento celkové variability souboru ($R^2 = 8\%$).



Obr. 19a Graf závislosti délky inkubace na krmném režimu samic.



Celkové shrnutí líhnivosti vajec udává tab. 6. Procentuálně se obě skupiny v počtu vylíhlých mláďat nijak nelišily (85,3% pro hladové, 84,9% pro syté, celkové 85,1%). Rozptyl v hodnotách pro jednotlivé samice je však značný. Tyto závěry potvrdil i model GLZ (binomické rozdělení, logit link funkce): líhnivost vajec patrně nesouvisela s hmotností matky po vykladení snůšky ($F \ll 0,1$; $P = 0,99$) či dnem snůšky v experimentu ($F = 0,2$; $P = 0,65$). Souvisela ale s identitou samice ($F = 38,6$; $P \ll 0,001$) a s hmotností vajíčka ($F = 13,8$; $P \ll 0,001$). Významné odklony od průměrné líhnivosti 85,1% byly zjištěny u samice K2 (hladová) a u samic K1 a P2 (syté) – všechny měly extrémně vysoký počet nevylíhlých vajíček (nad 30 %) (viz tab. 6). Obr. 20 znázorňuje vztah hmotnosti vajíčka a jeho líhnivosti: malá vajíčka mají větší úmrtnost.



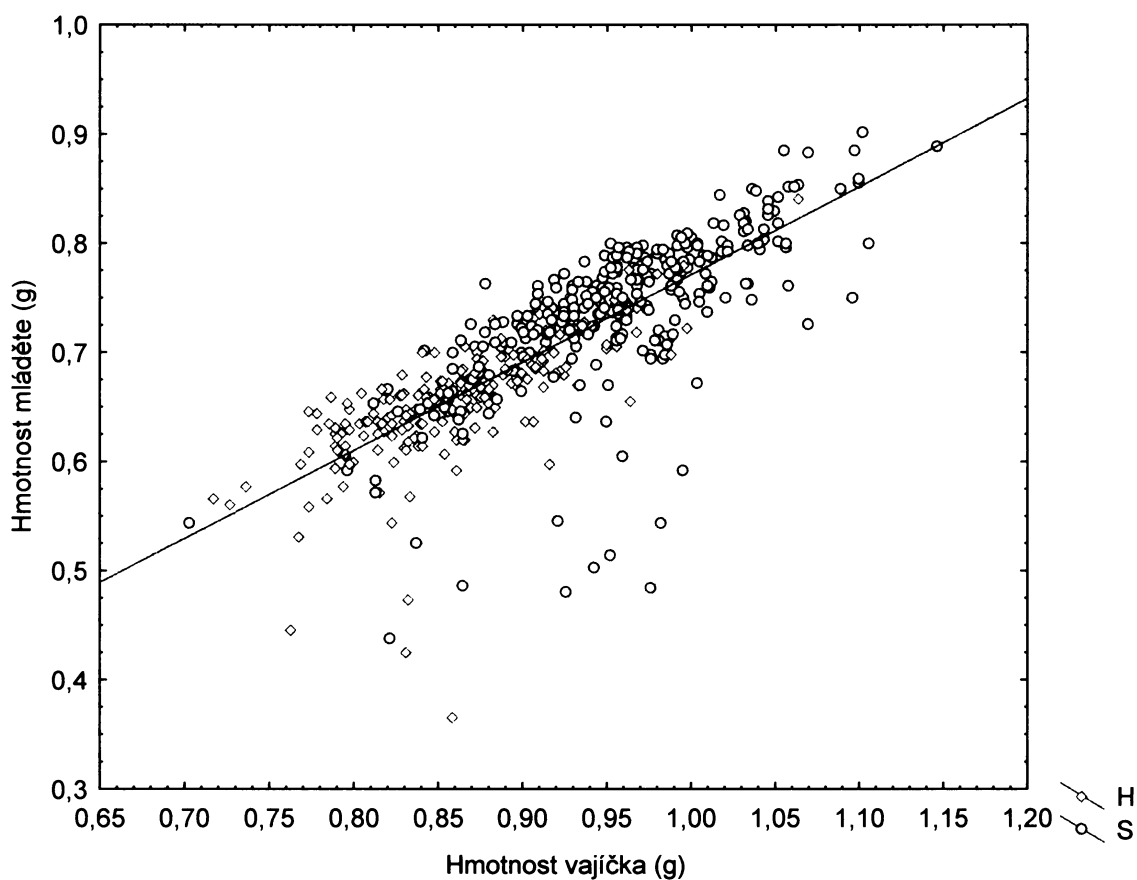
Obr. 20 Graf závislosti hmotnosti vajíčka na jeho úmrtnosti.

Tab. 6 Celková statistika zastoupení vylihých mláďat. Líhivost se vztahuje k počtu vajec bez těch rozbitých, extrémně nízké hodnoty (pod 70%) jsou zvýrazněny tučně.

Samice	Krmný režim (H/S)	Celkový počet vajec	Rozbitá vejce	Počet vajec bez rozbitých	Nevylíhlá vejce	Vylíhlá mláďata	Líhivost (%)
J1	H	39	1	38	4	34	89,5
K2	H	43	0	43	13	30	69,8
L1	H	39	1	38	2	36	94,7
M2	H	42	3	39	6	33	84,6
N1	H	29	1	28	4	24	85,7
O1	H	36	2	34	3	31	91,2
P1	H	33	1	32	5	27	84,4
Součet pro „H“		261	9	252	37	215	85,3
J2	S	47	0	47	5	42	89,4
K1	S	17	0	17	6	11	64,7
L2	S	55	1	54	1	53	98,1
M1	S	49	1	48	5	43	89,6
N2	S	45	2	43	8	35	81,4
O2	S	42	1	41	5	36	87,8
P2	S	39	2	37	14	23	62,2
Q1	S	46	1	45	6	39	86,7
Součet pro „S“		340	8	332	50	282	84,9
Celkové		601	17	584	87	497	85,1

4.3 Mláděta

Hmotnost mláděte při vylíhnutí závisela na hmotnosti vajíčka (model lineární regrese; $P \ll 0,001$; $R^2 = 64\%$). Obr. 21 znázorňuje tento vztah; extrémně vzdálené body od regresní přímky představují mláděta s nezataženým vaječným žloutkem (ta jsou vždy menší a lehčí).



Obr. 21 Graf závislosti hmotnosti mláděte na hmotnosti vajíčka.

Při porovnání abnormalit mezi oběma skupinami samic je zřejmé, že mlád'ata sytých samic daleko více trpěla poruchami ve vývoji (tab. 7). Mezi hladovými samicemi bylo zastoupení všech odchylek víceméně rovnoměrné. U sytých se vyskytovalo hned několik samic, které se lišily od ostatních: K1 a O2 měly extrémní počet mlád'at s lehkými deformacemi; nejvíce potomků s těžkými deformacemi bylo zjištěno u samice J2; P2 měla nejvíce mlád'at s nezataženým žlutkem. Většina mlád'at s nezataženým žlutkovým váčkem a s lehkými deformacemi byly samičky. Poměr pohlaví u těžkých deformací byl vyrovnaný. 7 mlád'at s těžkými deformacemi mělo i nezatažený žloutek, u lehkých deformací to bylo ve 4 případech.

Tab. 7 Výskyt zjištěných abnormalit

Samice	Krmný režim (H/S)	Mlád'ata		
		Lehké deformace	Těžké deformace	Nezatažený žloutek
J1	H	1	0	0
K2	H	0	0	1
L1	H	1	0	0
M2	H	1	0	2
N1	H	1	0	0
O1	H	0	0	0
P1	H	2	0	1
Součet pro „H“		6	0	4
J2	S	2	4	2
K1	S	9	0	2
L2	S	1	0	0
M1	S	0	2	2
N2	S	1	1	3
O2	S	16	0	2
P2	S	2	0	7
Q1	S	0	2	2
Součet pro „S“		31	9	20
Celkově		37	9	24
Z toho samců		7	5	4
Z toho samic		30	4	20

Během experimentu se celkově vylíhlo mnohem více samic než samců (272 : 219) (tab. 8). Stalo se tak díky čtyřem samicím (J1, N1 - hladové; N2, O2 – syté), jejichž poměr pohlaví byl silně vychýlen ve prospěch sameček. Poměr pohlaví potomků všech sytých samic dohromady se významně neodchyloval od očekávaného vyrovnaného. To platí i pro hladové samice – zjištěný a očekávaný poměr pohlaví se u nich průkazně nelišil.

Tab. 8 Celkový rozbor poměru pohlaví. Tučně je zvýrazněna hodnota P společně se skutečným zastoupením obou pohlaví pro daný soubor, kde se očekávaný a skutečný poměr pohlaví statisticky významně liší (χ^2 test; $P < 0,05$).

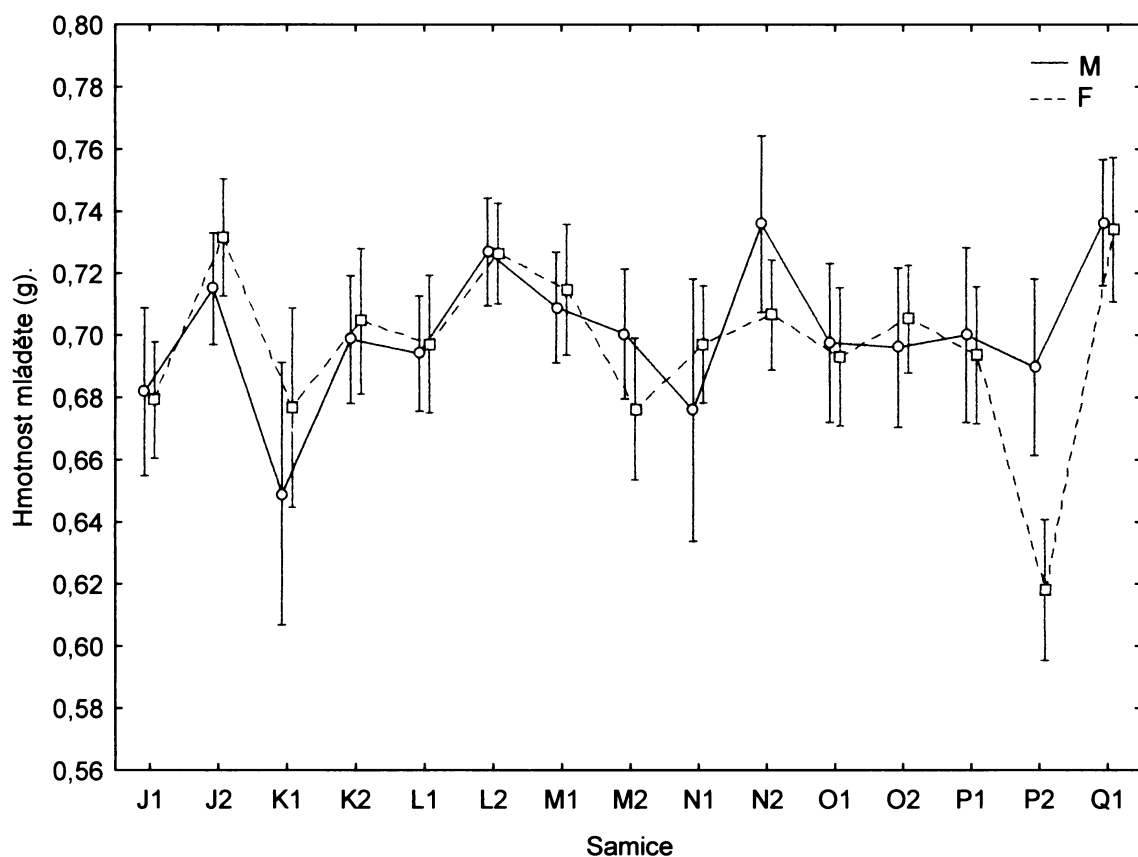
Samice	Krmný režim (H/S)	Mláďata s určeným pohlavím	Z toho samců	Z toho samic	Očekávaný počet samců	Očekávaný počet samic	Hodnota P (χ^2 test)
J1	H	32	10	22	16,0	16,0	0,034
K2	H	30	17	13	15,0	15,0	0,465
L1	H	36	21	15	18,0	18,0	0,317
M2	H	33	18	15	16,5	16,5	0,602
N1	H	24	4	20	12,0	12,0	0,001
O1	H	29	12	17	14,5	14,5	0,353
P1	H	27	10	17	13,5	13,5	0,178
Součet pro „H“		211	92	119	105,5	105,5	0,063
J2	S	42	22	20	21,0	21,0	0,758
K1	S	11	4	7	5,5	5,5	0,366
L2	S	53	25	28	26,5	26,5	0,680
M1	S	42	25	17	21,0	21,0	0,217
N2	S	34	9	25	17,0	17,0	0,006
O2	S	36	11	25	18,0	18,0	0,020
P2	S	23	9	14	11,5	11,5	0,297
Q1	S	39	22	17	19,5	19,5	0,423
součet pro „S“		280	127	153	140,0	140,0	0,120
Celkově		491	219	272	245,5	245,5	0,017

Pomocí testu GLZ (binomické rozdělení, logit link funkce) se u potomků žádné samice nepodařilo na statisticky významné hladině (0,0033 po Bonferoniho korekci) prokázat celkový model závislosti pohlaví mláďete na hmotnosti vajíčka, hmotnosti matky po vykladení snůšky a dni snůšky v experimentu (viz tab. 9.).

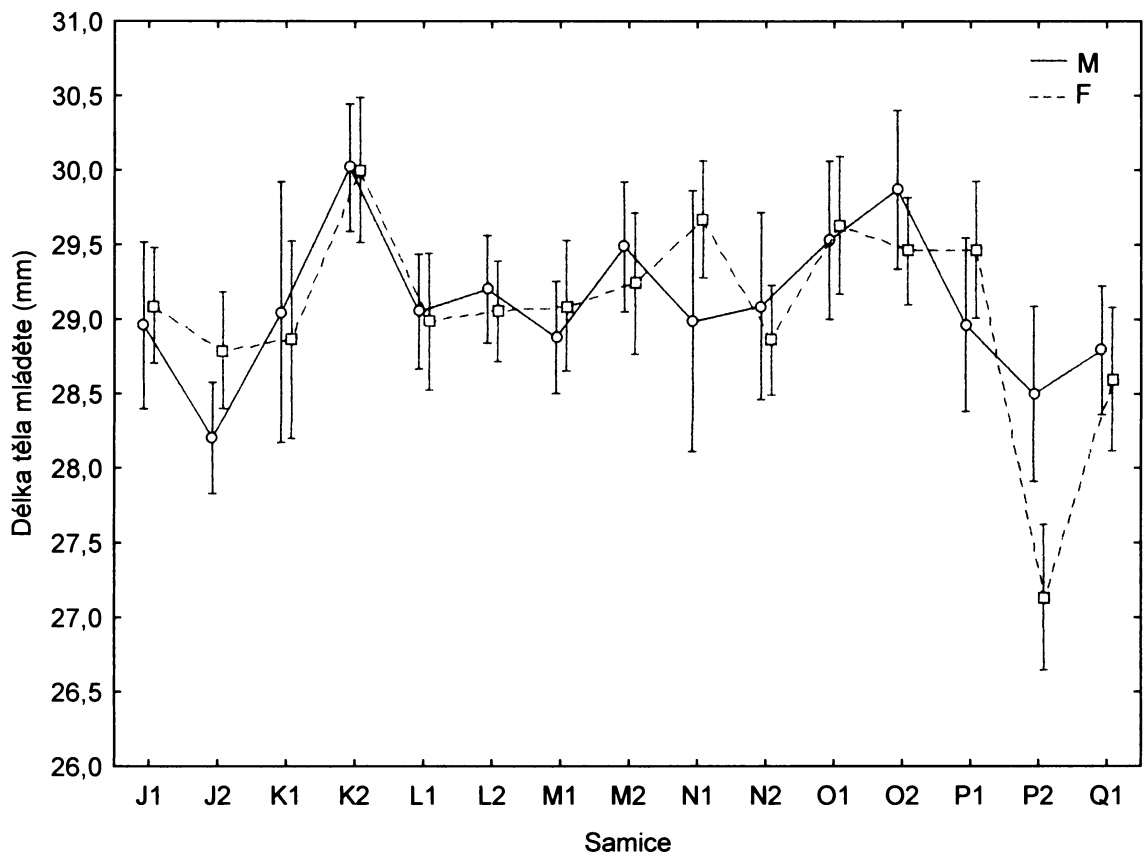
Tab. 9 Hodnoty P celkového modelu pro jednotlivé samice.

Samice	Krmný režim (H/S)	Hodnota P pro celkový test
J1	H	0,53
K2	H	0,48
L1	H	0,51
M2	H	0,52
N1	H	0,02
O1	H	0,49
P1	H	0,44
J2	S	0,87
K1	S	0,17
L2	S	0,58
M1	S	0,08
N2	S	0,06
O2	S	0,35
P2	S	0,63
Q1	S	0,05

Následný GLIM mix model nejprve testoval závislost hmotnosti mláděte na délce jeho těla - výsledek je vysoce průkazný ($F = 137,9$; $P < 0,001$). Jako další vysvětlující proměnná byl použit náhodný kategoriální faktor identita samice – ta rovněž souvisela s hmotností mláděte na statisticky průkazné úrovni ($F = 4,1$; $P = 0,005$). Hmotnost juvenila však již nesouvisela s jeho pohlavím ($F = 0,2$; $P = 0,68$). Velmi slabě, ale statisticky významně však souvisela s interakcí identity samice a pohlavím mláděte ($F = 2,1$; $P < 0,013$). Na obr. 22 je znázorněna a) závislost hmotnosti mlád'at na identitě samice, respektive b) závislost délky těla na identitě samice. Graf zachycuje výsledné hodnoty pro obě pohlaví zvlášť. Velikost samčích a samičích potomků se v rámci matky výrazně nelišila. Výjimku tvořila pouze samice P2, která náhodně produkovala menší a lehčí samičky.

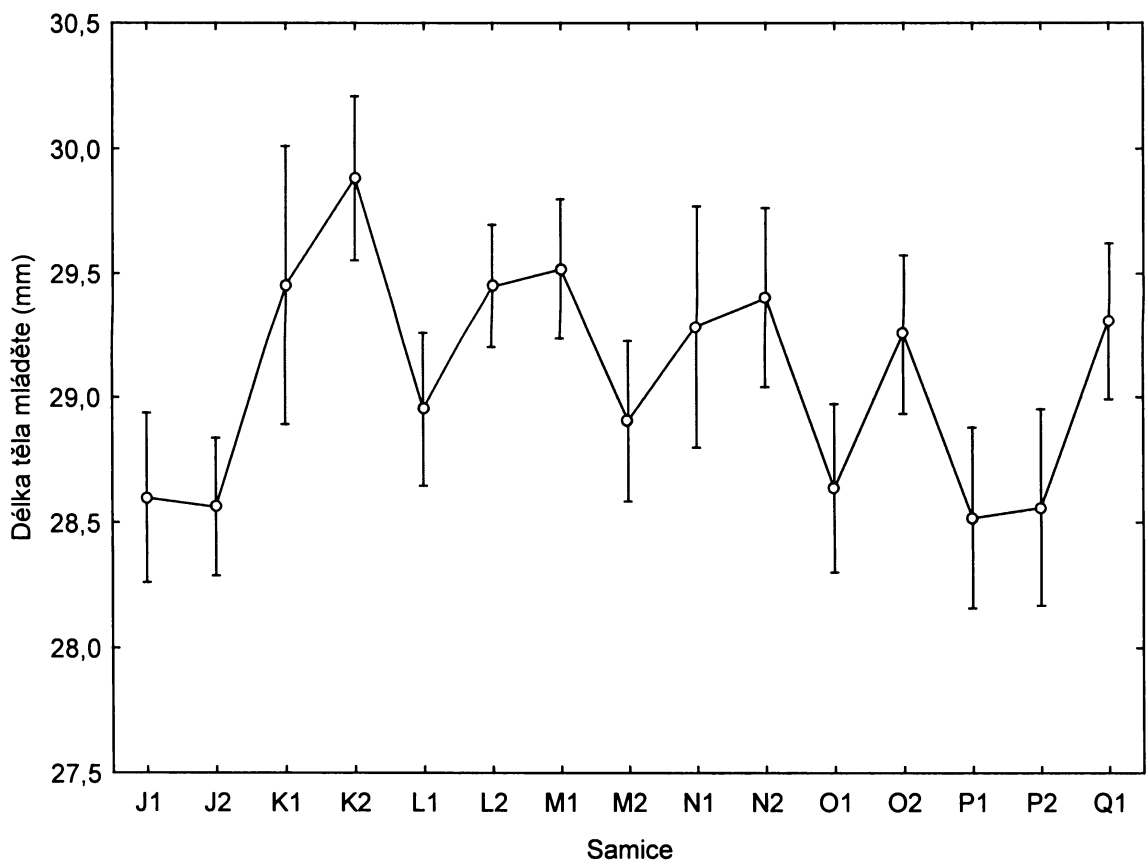


Obr. 22a Graf závislosti hmotnosti mláděte na identitě samice (hmotnost mláděte je kontrována hmotností vajíčka) (M = mládě samčího pohlaví).



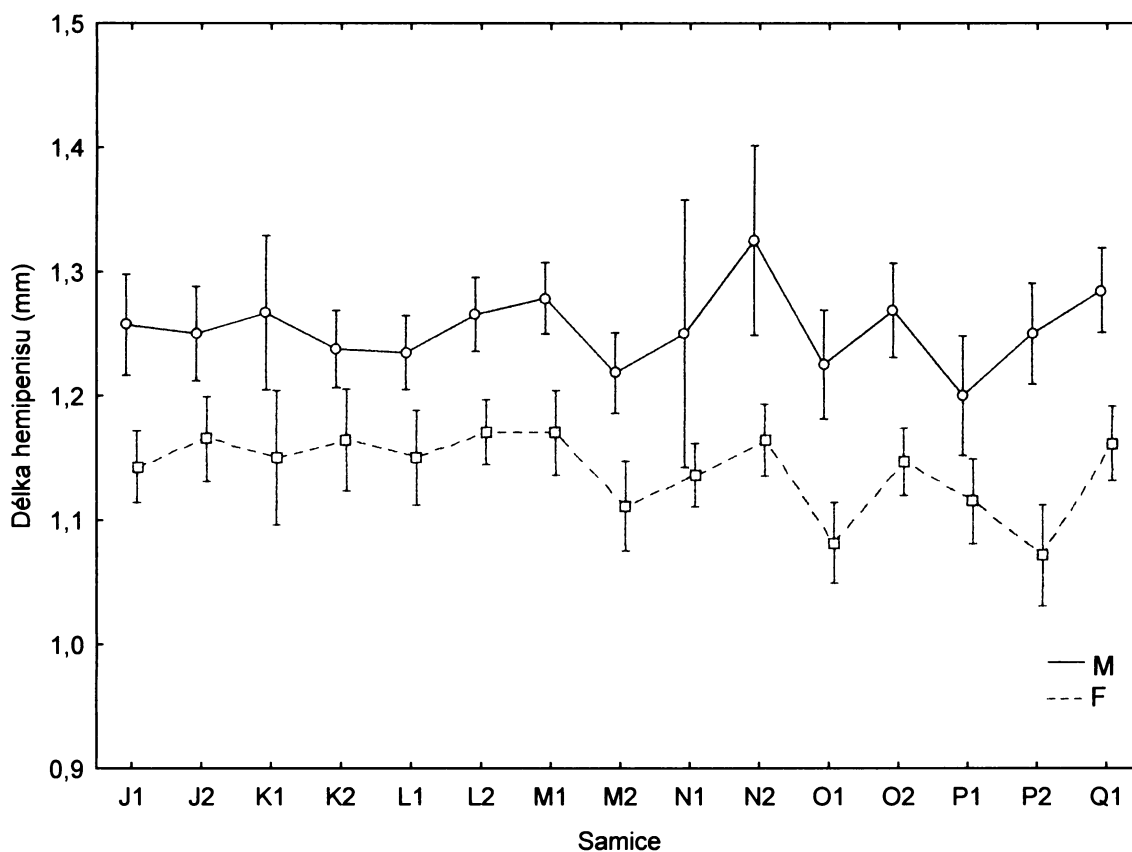
Obr. 22b Graf závislosti délky těla mláděte na identitě samice (délka těla je kontrována hmotností vajíčka) (M = mládě samčího pohlaví).

Z předchozího testu je patrná závislost hmotnosti mláděte na délce těla a identitě samice. Následný GLM model testoval relativní tvar těla mláděte: délka těla závisela na délce ocasu ($F = 14,2$; $P < 0,001$) a šířce hlavy ($F = 55,5$; $P < 0,001$). Současně platí i závislost délky těla mláděte na identitě samice ($F = 6,6$; $P < 0,001$): relativní tvar mláděte tedy souvisí s identitou jeho matky i po odfiltrování vlivu šířky hlavy a délky ocasu. Délka těla mláděte po kontrole na šířku hlavy, délku ocasu a identitu matky už ale nezávisela na jeho pohlaví ($F = 0,2$; $P = 0,68$), ani na interakci identity samice a pohlaví mláděte ($F = 1$; $P = 0,46$): pohlaví mláděte nejspíš tedy nemá vliv na jeho relativní tvar. Na obr. 23 jsou patrné rozdíly v relativním tvaru těla mezi mlád'aty jednotlivých samic.



Obr. 23 Graf závislosti relativního tvaru mláděte (délka těla je kontrována délkou ocasu a šířkou hlavy) na identitě samice.

Průměrná délka hemipenisu mláděte samčího pohlaví byla 1,25 mm (N = 121; SE = 0,006), pro mláďata samičího pohlaví to bylo 1,14 mm (N = 169; SE = 0,005). Test GLIM mix procedurou prokázal závislost délky hemipenisu na pohlaví mláděte ($F = 200,1$; $P \ll 0,001$), délka tohoto orgánu je také závislá na délce těla mláděte ($F = 31,9$; $P \ll 0,001$) a slabě, i když signifikantně na identitě samice ($F = 1,762$; $P = 0,044$). Závislost délky hemipenisu na interakci identity samice a pohlaví mláděte vyšla neprůkazná ($F = 0,78$; $P = 0,687$). Obr 24 znázorňuje rozdílnou délku hemipenisů pro obě pohlaví v závislosti na identitě samice.



Obr. 24 Graf závislosti délky hemipenisu na identitě samice pro obě pohlaví (M = mládě samčího pohlaví).

5. DISKUZE

Jedním z hlavních cílů diplomové práce bylo zjistit, jakým způsobem samice gekona *Paroedura picta* řeší v závislosti na různých hladinách potravy kompromis mezi alokací do reprodukce a do vlastního těla a jaké reprodukční parametry jsou fenotypově plastické. Výběrem pohlavně dospělých, avšak plně nedorostlých samic bylo možné v rámci investice do vlastního těla navíc sledovat kompromis mezi investicí do růstu a tvorbou tukových zásob. V rámci alokace do reprodukce jsem pak sledoval, jak samice s různými potravními zdroji řeší kompromis mezi kvalitou a kvantitou potomků.

5.1 Řešení „*trade - off*“ mezi alokací do reprodukce vs. do somatických tkání

Na konci experimentu se rozmnožující samice z jednotlivých krmných režimů nelišily v délce těla ani v délce hlavy (obr. 10). Z grafického vyjádření je patrný i společný trend růstu: hladové i syté samice záhy stejným tempem vyrostly na shodnou délku těla, která se do konce pokusu prakticky nezměnila (obr. 14). Tento společný růstový trend lze pak vyjádřit pomocí růstové křivky (Schoener & Schoener 1978, Powell & Russell 1985), jejíž průběh vysvětlil značnou část variability ve změně délky těla samic během pokusu. Nesignifikantní výsledek neparametrických testů závislosti jednotlivých růstových parametrů (především asymptotické velikosti a růstové rychlosti) na krmném režimu dále podporuje závěr, že se rozmnožující se samice v růstu opravdu nelišily.

Velikost krmné dávky má ale silný vliv na hmotnost samice: na konci experimentu dosahovaly syté samice výrazně větší hmotnosti než hladové (obr. 10). Rozdíl pak názorně dokumentuje i graf celkové hmotnosti, které samice dosahovaly v průběhu pokusu, zvýraznění této skutečnosti bylo dosaženo při znázornění čistého přírůstku hmotnosti a konečně, samice se značně lišily také v ukládání relativních tukových zásob (obr. 11, 12 a 13). Syté samice si mohly dovolit být na jednotku délky těla mnohem tučnější než hladové, které spíše hubly. Průběh ukládání tukových zásob u sytých samic však nebyl kontinuální – po dosažení maxima došlo k určité stabilizaci.

Neúmyslná kontrola Q2 nabízí příležitost pro srovnání s rozmnožujícími se samicemi. Původně nebyla použita kontrola záměrně, protože trvale velmi vysoké dávky potravy (což

0,5 g cvrčků na den u sytých samic bezpochyby je) zapříčiňují u nerozmnožujících se dospělých zvířat ztuhnutí jater - to vede k jejich disfunkci a následnému úmrtí jedince (vlastní pozorování). Q2 pak dokazuje, že krmnou dávku pro hladové (cca 0,333 g cvrčků na den) lze ustát i při absenci reprodukce. Tato samice navíc dosahovala ke konci pokusu mnohem větší velikosti a hmotnosti než ostatní, což je patrné i z grafů závislosti těchto parametrů na dni měření (obr.11 a 14). Množství relativních tukových zásob se ale časem plně shodovalo se sytými samicemi (obr. 13). Srovnání hladiny tukových zásob Q2 s hladovými samicemi (kam Q2 původně svým krmným režimem patřila) ukazuje náročnost reprodukce a její alokační nadřazenost investici do zásob – kladoucí hladové samice v průběhu pokusu energii neskladovaly (spíše ještě zhubly), Q2 při stejném množství potravy naopak postupně dosáhla stejné relativní tloušťky jako syté samice.

Kompromis alokace do reprodukce a do vlastního těla není evidentně pro jednotlivé krmné hladiny optimalizován na nějaké prostřední hodnotě, kdy by část zdrojů byla alokována do reprodukce a část do zásob. Hladové a syté samice vyrostly nezávisle na zdrojích stejným tempem na shodnou velikost, vzhledem ke které by pak měly produkovat stejná optimálně velká vajíčka (Vitt 1986, Doughty 1997). Samice se začaly rozmnožovat na úkor růstu až po dosažení této velikosti (to dokládá samice Q2, která celou dobu pokusu investovala do růstu). To odpovídá tvrzení, že zdroje alokované do reprodukce jsou nedostupné pro růst (Gregory & Skebo 1998). Hladové samice po dosažení konečné velikosti alokují vše do udržení těla a do reprodukce, netvoří tukové zásoby, protože už nemají dostatek zdrojů.

Sytým samicím zbyl dostatek energie pro tvorbu zásob – ani z jejich pohledu však nemusí být velikost produkovaných vajíček optimální. Ještěři s invariantní snůškou nemohou manipulovat počtem vajec v rámci snůšky, mohou ovlivnit pouze velikost vajíček a frekvenci snůšek (Tinkle & Ballinger 1972, Doughty 1996). Vajíčka lze ale zvětšovat jen do určité míry. Sinervo (1999) mimo jiné manipuloval počtem vyvíjejících se folikulů pomocí folikulární ablace u leguánka *Uta stansburiana* (druh s variabilní snůškou), čímž docílil snížení jejich počtu. Samice však investovala do snůšky v podstatě stejné množství zdrojů, ale mezi menší počet folikulů, čímž došlo k takovému enormnímu zvětšení jednotlivých vajíček, že neprošla pánevním otvorem a samice uhynula. Velikost vajec je tedy omezena horním limitem, daným např. šířkou pánevního otvoru (Sinervo & Licht 1991, Sinervo 1999). Některé skupiny s invariantní snůškou s enormní relativní velikostí vajíček (např. gekončící) řeší toto omezení prodloužením délky vajíček, i u nich

však je velikost vajíček omezena shora např. celkovým dostupným objemem břišní dutiny (Kratochvíl & Frynta 2006a, Kratochvíl & Kubička subm. - 3. článek přílohy). Zástupci čeledi Gekkonidae (kam *P. picta* patří) kladou vejce s vápenatou skořápkou. Vápník je pro ně důležitým, v zásadě pravděpodobně limitujícím prvkem. Samice proto dělají raději relativně kulatá vajíčka, koule má totiž nejmenší povrch a spotřeba vápníku je nižší. V souvislosti s tím lze jen těžko řešit omezení velikosti vajíček šířkou pánve prodloužením vajíček (Kratochvíl & Frynta 2006a). Je proto možné, že syté samice kladly v rámci omezení maximálně velká vejce. Je však výhodné zužitkovat všechny nadbytečné zdroje (tzn. dělat si zásoby), které lze využít v příští reprodukci (viz Sexton et al. 1971). Syté samice by pak měly produkovat snůšky tak rychle, jak jim fyziologické omezení rychlosti tvorby dovolí (energie je nadbytek, nemusí šetřit).

5.2 Řešení „trade - off“ mezi množstvím a kvalitou potomků v závislosti na krmné dávce

5.2.1 Snůšky a vejce

Snížená krmná dávka u hladových samic způsobila zastavení alokace do tvorby tukových zásob, sytým naopak zbyl dostatek energie pro jejich tvorbu. Samice tedy v závislosti na zdrojích energie upřednostňují alokaci do reprodukce před alokací do zásob. Liší se ale obě skupiny v dělení alokace do reprodukce?

Odpovědí na tuto otázku je zhodnocení parametrů reprodukčního úspěchu hladových a sytých samic (sumarizace a kategorizace provedena podle Kearnyho & Shina 2004 a 2005). Obě skupiny se nelišily v časovém úseku, po který kladly snůšky – lze tedy říci, že se samice začaly množit zhruba ve stejném období a množství zdrojů nemá vliv na nastartování reprodukce. Hladové samice měly vyšší průměrný interval mezi jednotlivými snůškami. S tím souvisí i celkový počet snůšek – syté jich měly víc. Překvapivě však nebyl nalezen rozdíl mezi počtem jednovaječných a dvojevaječných snůšek mezi oběma soubory.

Zde je nutné věnovat pozornost individuální variabilitě jednotlivých samic. V tomto směru se nejvíce problematická jeví samice K1 (viz tab. 5): v rámci sytých samic má

nejmenší počet snůšek (16) a ze všech samic má nejvíce jednovaječných (15) a současně nejméně dvojevaječných snůšek (1). K1 tak představuje extrém v rámci sytých (v některých případech i všech) samic a stahuje proto hodnoty sytých samic směrem k hladovým samicím. Patrně ze stejného důvodu byl nalezen jen marginálně signifikantní rozdíl v celkovém počtu snesených vajec (pro K1 to bylo 17, druhý nejmenší počet vajec pro sytou samici byl 39!), to samé nejspíš platí i pro marginální signifikanci rozdílu v průměrné tvorbě jednoho vajíčka (pro K1 9,8 dne, u další syté v pořadí 4,9 dní!). Na druhou stranu výsledky analýz, průkazné i přes extrémní hodnoty v individuální variabilitě samic, jsou dostatečně robustní a rozdíl mezi sytými a hladovými samicemi je ve sledovaných parametrech značný.

To je patrně i případ průkazného rozdílu v reprodukčním úsilí – průměrná hmotnost celkového počtu vajec syté samice byla mnohem vyšší než pro hladovou samici. Sytá samice mohla vyššího reprodukčního úsilí dosáhnout buďto zvětšením vajíček nebo zvýšením jejich počtu anebo produkcí vyššího počtu větších vajec. Hladové a syté samice se liší v intervalu mezi snůškami, v počtu snůšek a konec konců i v celkovém počtu vajec – větší reprodukční úsilí sytých samic je tedy zčásti zapříčiněno větším počtem vajíček. Hmotnost vajíčka průkazně závisí na identitě samice, ale i na jejím krmném režimu – tzn., že existuje určitá variabilita ve velikosti vajíček mezi jednotlivými samicemi, mezi sytými a hladovými samicemi však byl prokázán daleko větší rozdíl.

Alokace do reprodukce je tedy závislá na zdrojích dostupné energie: syté vyprodukovaly během experimentu vyšší počet větších vajíček. To znamená, že velikost vajíček je fenotypově plastická, což vyvrací tezi optimálně velkých vajec u ještěřů s invariantní snůškou (Vitt 1986, Doughty 1997). Hladové nejen že nedělají tukové zásoby, při omezeném množství navíc snižují i velikost vajíčka.

Reakce na zvýšenou hladinu potravy zvětšením vajec u *P. picta* je netriviální a tato závislost nemusí být vždy jasně daná. Příkladem mohou být ptáci, což jsou v podstatě archosaurní plazi a podle kritérií Shina a Greera (1991) by měli invariantní snůšku – je u nich zachovaný pouze levý vaječník, vejce jsou ovulována a snášena postupně. Při vyšší hladině zdrojů potravy bylo u ptáků prokázáno zvětšení velikosti vajec pouze u 10 z celkového počtu 28 prací, přičemž rozdíl ve velikosti vajec nebyl nikdy větší než 13% (Christians 2002). Přibližně desetiprocentní rozdíl je patrný i mezi vejci sytých a hladových samic, investice do jednotlivých vajec patrně není u hladových ani sytých samic optimální (viz výše).

Druhy s variabilní snůškou také většinou nemanipulují s velikostí vajíčka v závislosti na množství dostupných zdrojů potravy. Samice v lepší kondici raději zvýší počet vajíček ve snůšce (např. Vitt & Congdon 1978, Doughty & Shine 1997). Podle některých je tato velikost vajíčka optimalizovaná (např. Congdon & Gibbons 1985, Rajkumar & Shanbhag 2003), může se ale jednat i minimálně velké životaschopné vejce (např. Doughty 1996, Bauwens & Díaz-Uriarte 1997) (viz obr. 1).

5.2.1.1 Délka inkubace

Výsledky srovnání délky inkubace vajec sytých a hladových samic potvrzují závěry Blumberga et al. (2002) o délce inkubace při dané teplotě: ve 30°C trvala inkubace vajec obou skupin shodně – přibližně 53 dní. Variabilita délky inkubace mezi jednotlivými samicemi nebyla prokázána. Podobných výsledků zjištěných při porovnání délky inkubace u partenogenetických a bisexuálních populací gekona *Heteronotia binoei* dosáhli i Kearny & Shine (2004).

Zjištěná průkazná závislost mezi délkou inkubace a hmotností vajíčka se zdá být v ohledu na rozdíly v délce inkubace při různých teplotách (Blumberg et al. 2002) biologicky nevýznamná, hmotnost vajíčka navíc vysvětluje relativně nízké procento celkové variability v délce inkubace.

5.2.1.2 Líhivost vajec

Kvalita vajec se netýká pouze jejich hmotnosti, souvisí i s životaschopností embrya. Celková líhivost vajec sytých a hladových samic byla zhruba 85%. Krmný režim samic by patrně neměl mít vliv na mortalitu vajec. Tato pro obě skupiny stejná hodnota však představuje vybalancovaný průměr extrémních hodnot v líhivosti (viz tab. 6). Následný model pak ale potvrdil závislost líhivosti na identitě samice a na velikosti vajíčka - malá vajíčka mají větší úmrtnost.

Hladové samice kladou celkově menší vajíčka než syté, proč nemají také nižší líhivost vajec? Odpověď lze opět nalézt ve variabilitě líhivosti vajec jednotlivých samic.

Mezi sytými samicemi jsou dvě (K1 a P2), které mají extrémně vysokou mortalitu vajec, ty pak stahují celkovou průměrnou líhivost na úroveň hladových (kde pouze K2 vykazuje extrémně nízké hodnoty) (viz tab. 6). Líhivost vajec pak závisí na krmném režimu samice jen nepřímo – syté kladou větší vajíčka.

5.2.2 Mlád'ata

5.2.2.1 Velikost a deformace

Velikost mláděte závisí na velikosti vajíčka, ze kterého se vylíhne. Souvisí tak i s krmnou dávkou matky (hladové kladou menší vajíčka). Kvalita vajec a vylíhlých mlád'at se dá posuzovat i množstvím vývojových odchylek - liší jejich přítomnost u sytých a hladových samic?

Výsledky zastoupení abnormalit u mlád'at hladových a sytých samic ukazují na celkově větší přítomnost odchylek u sytých samic (tab. 7). Do jisté míry se zde opět uplatňuje vliv individuální variability samic. Nejvyšší počet potomků s lehkými deformacemi má samice O2 (16 mlád'at) následovaná samicí K1 (9 mlád'at) – ve většině případů byl deformovaný pouze ocas. Možné vysvětlení spočívá v úspěšnosti alokace vápníku do vajec – embryo pak nemá plnohodnotné podmínky pro zdárný vývoj a proto se u něj projevují příznaky nedostatku tohoto minerálu (např. křivice). Dalším možným vysvětlením je špatná genetická výbava mlád'at.

Těžce deformovaná mlád'ata se vyskytují pouze u sytých samic s jinak velkými a zdravými mlád'aty (J2, M1, N2 a Q1 – tab. 7) V souvislosti s lepší líhivostí větších vajec je možné, že díky velkému vajíčku s kvalitními zásobami došlo k vývoji i velmi hendikepovaných embryí, která by se za normálních okolností (z menších vajec) vůbec nevylíhla. Což by mimo jiné dokazovala i nepřítomnost těžce deformovaných mlád'at u hladových samic.

Nezatažený žloutkový vak lze v jedenácti případech objasnit jeho přítomností u lehce a těžce deformovaných mlád'at. Poruchy ve vývoji se tak v některých případech vyskytují kumulativně. Ve zbylých případech je interpretace obtížná. Kearny & Shine (2004)

vysvětlují přítomnost nezataženého žloutkového váčku stresem z nedostatečné vlhkosti při inkubaci. U gekonů s vápenatou skořápkou se tato možnost jeví nepravděpodobná, navíc přítomnost tohoto fenoménu u mlád'at jednotlivých samic je také značně variabilní. Největší počet mlád'at s touto odchylkou se vyskytuje u samice P2 (7 případů) (tab. 7).

Většina mlád'at s nezataženým žloutkovým váčkem a s lehkými deformacemi byly samičky. Lze jen těžko rozhodnout, zda se jedná jen o náhodný výsledek nebo určitý trend. Poměr pohlaví u těžkých deformací byl vyrovnaný.

5.2.2.2 Poměr pohlaví a dimorfismus

Celkový poměr pohlaví byl výrazně vychýlen ve prospěch samic (272 : 219) (tab. 8). Poměr pohlaví potomků všech sytých samic se ale významně nelišil od očekávaného (tj. 1:1). To samé platí i pro mlád'ata hladových samic. Tato disproporce ve výsledcích patrně nastala díky čtyřem samicím (J1, N1 - hladové; N2, O2 – syté), jejichž poměr pohlaví byl silně vychýlen ve prospěch samiček. Samice s vychýleným pohlavím byly zastoupeny rovnoměrně mezi oběma skupinami. Tento jev patrně nesouvisí s krmným režimem samic, spíš zase odráží jejich individuální variabilitu.

Model závislosti pohlaví mláděte na hmotnosti vajíčka, hmotnosti matky po vykladení či dni snůšky v experimentu vyšel neprůkazně pro všechny vysvětlující proměnné. Pohlaví mláděte patrně nesouvisí s hmotností vajíčka – to dokládá předchozí tvrzení, že poměr pohlaví nezávisí na krmném režimu samice. Samice nemanipuluje s pohlavím svých potomků v závislosti na zdrojích potravy.

Pohlaví mláděte nezávisí na hmotnosti vajíčka, zatímco hmotnost mláděte na vajíčku závisí. Jsou mlád'ata gekona *Paroedura picta* pohlavně dimorfní? Hmotnost mláděte souvisí s délkou jeho těla a také s identitou matky. Těžší mládě má delší tělo a mezi potomky jednotlivých samic existuje určitá variabilita. Hmotnost juvenila však již patrně nesouvisela s jeho pohlavím. Průkazně však vyšla závislost hmotnosti mláděte na interakci identity samice a pohlaví mláděte. Tento výsledek lze interpretovat pomocí obr. 22a: hmotnost potomků obou pohlaví se v rámci samic výrazně neliší. Výjimku však tvoří samice P2, která náhodně produkovala menší a lehčí samičky. Tato samice měla také nejvíce mlád'at s nezataženým žloutkovým váčkem (7). 6 těchto mlád'at bylo samičího

pohlaví. Při celkovém počtu 14 samic u P2 je zřejmé, že samičky s nezataženým žloutkem stáhly celkovou průměrnou hmotnost potomku tohoto pohlaví na nižší úroveň. Toto vysvětlení lze interpretovat i pomocí obr. 22b: délka těla samicích potomků P2 vykazuje podobný trend jako jejich hmotnost - mláďata s nezataženým žloutkovým vakem bývají také menší. Mláďata nejsou dimorfní v hmotnosti těla.

Když se neliší hmotnost, liší se tvar mláděte v závislosti na pohlaví? Délka těla mláděte souvisela s délkou ocasu a šířkou hlavy, což lze označit jako jeho relativní tvar. Ten závisel opět na identitě samice (potomci samic se vzájemně liší). Relativní tvar mláděte již ale nesouvisel s jeho pohlavím ani s interakcí identity samice a pohlavím. Relativní tvar mláďat tedy také není pohlavně dimorfní.

I když jsou dospělá zvířata značně sexuálně dimorfní, mláďata tento jev nevykazují. Samice nijak nemanipulují poměrem pohlaví ve prospěch některého z nich. Nelze tedy aplikovat Trivers-Willardovu hypotézu (1973).

Gekon *Paroedura picta* má geneticky určené pohlaví (Blumberg et al. 2002). Analýza stanovení množství estradiolu a testosteronu u 12 snůšek (24 vajíček) ukázala, že se vajíčka v rámci jedné snůšky výrazně neliší v poměrném zastoupení obou hormonů. Mezi jednotlivými snůškami je ale patrný značný rozdíl v hladinách těchto steroidů. (Kratochvíl et al. subm. - 2. článek přílohy). Analýza žloutkových steroidů znemožnila determinaci pohlaví mláďat z těchto vajíček (analyzována byla vždy čerstvě snesená vajíčka, ze kterých byl využit všechn žloutek). V další práci jsme u *P. picta* testovali poměr pohlaví sourozenců z 57 snůšek - ten se nelišil od očekávaného (sestra a sestra : bratr a sestra : bratr a bratr = 1 : 2 : 1) (Kratochvíl et al. subm. - 1. článek přílohy). Množství maternálních hormonů alokovaných do vajíček spíše odráží aktuální kondici matky, než aby ovlivňovalo pohlaví potomků (na které různé hladiny steroidů evidentně nemají vliv). Manipulace poměrem pohlaví tak ztrácí i fyziologické opodstatnění – pohlaví mláďat neovlivní ani teplota při inkubaci (vlastní pozorování) ani různé hladiny maternálních hormonů (Kratochvíl et al. subm. - 1. a 2. článek přílohy). Tyto závěry se přiklánějí k tvrzení, že manipulace poměrem pohlaví u obratlovců s geneticky určeným pohlavím je sporná (Krackow 2002, Silk et al. 2005, Kratochvíl et al. subm. - 1. článek přílohy).

Když není dimorfní tvar ani hmotnost mláděte, je dimorfní aspoň délka jeho hemipenisů? Test prokázal významný rozdíl v délce hemipenisu u mláďat obou pohlaví, přičemž tento orgán byl u samců v průměru o 0,1 mm větší (obr. 23). Délka hemipenisu je

také závislá na délce těla mláděte a identitě samice. Z toho vyplývá obtížná determinace pohlaví tímto způsobem: i přes existující rozdíly mezi pohlavími je délka hemipenisu určena i délkou těla mláděte, hemipenis je navíc variabilní mezi mlád'aty jednotlivých samic. Průměrný rozdíl v délce hemipenisu mezi juvenilny odlišného pohlaví se ztratí ve variabilitě délky tohoto orgánu. Určování pohlaví mlád'at pomocí vymačkávání hemipenisu (vymáčknutí = samec) tak pozbývá všeobecné platnosti a minimálně u zástupců rodu *Paroedura* jej nelze doporučit.

Používání této metody může někdy vést ke špatným závěrům, zejména je-li používána u velmi malých mlád'at. Příkladem jsou patrně práce zabývající se poměrem pohlaví dvou australských viviparních scinků rodu *Niveoscincus* (Olsson & Shine 2001, Wapstra et al. 2004). Pohlaví mlád'at bylo určeno právě „vymačkávací“ metodou. Autoři u těchto druhů překvapivě zjistili teplotně určené pohlaví, zatímco příbuzné skupiny mají geneticky určené pohlaví (Donellan 1985 ex Wapstra et al. 2004).

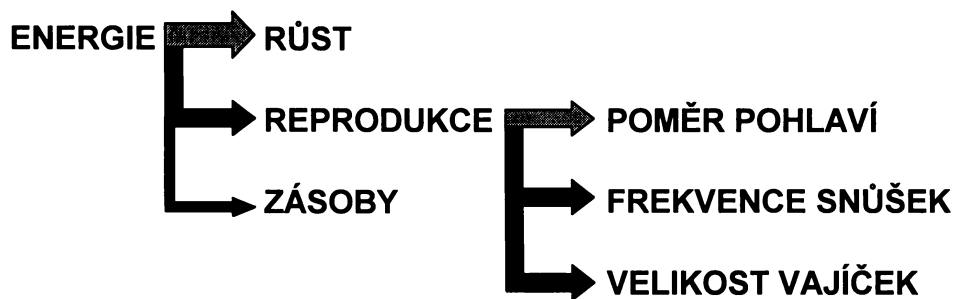
I když mají zástupci rodu *Niveoscincus* variabilní snůšku, počet potomků v rámci snůšky je relativně nízký (maximálně 5, většinou 1 až 3 – Olsson & Shine 2001). Gravidní samice alokuje steroidy do folikulů v průběhu jejich dozrávání, po ovulaci jsou zárodky vyživovány v těle matky – (Olsson & Shine 1999a ex Olsson & Shine 2001). Embrya by tak měla sdílet stejnou hladinu maternálních steroidních hormonů a inkubační teplota v těle gravidní samice by měla být pro všechna mlád'ata stejná (viz Kratochvíl et al. subm. - 1. a 2. clánek přílohy).

Kratochvíl et al. subm. (1. clánek přílohy) zjistili u druhu *Eublepharis macularius* (teplotně určené pohlaví, invariantní snůška) v rámci jedné snůšky produkci sourozenců vždy stejného pohlaví ve dvou inkubačních teplotách při zachování stejných inkubačních podmínek. Na pohlaví mlád'at má vliv jak inkubační teplota, tak patrně množství maternálních steroidních hormonu (Elf 2003). Samice v rámci jedné snůšky alokuje do folikulů stejné množství steroidů (Elf 2004, Kratochvíl et al. - 2. clánek přílohy). Pokud mají zkoumané druhy rodu *Niveoscincus* teplotně určené pohlaví, samice by pak měly produkovat vždy potomky pouze jednoho pohlaví. Olsson & Shine (2001) zaznamenali v rámci snůšky mlád'ata obou pohlaví, Wapstra et al. (2004) poměr pohlaví v rámci snůšky neuvádějí.

U vylíhlých mlád'at druhů s teplotně určeným pohlavím by hemipenisy neměly být příliš pohlavně diverzifikované (např. *Eublepharis macularius*) (Rhen et al. 2005).

U vylíhlých mlád'at druhů s geneticky určeným pohlavím jsou naopak některé sekundární pohlavní struktury jako hemipenisy plně (např. *Anolis carolinensis*, Holmes & Wade 2005,) nebo aspoň částečně (*Paroedura picta*, tato práce) diferenciované. Novorozená mlád'ata zkoumaných scinků dosahovala hmotnosti 0,4 – 0,6 g (Olsson & Shine 2001, Wapstra et al. 2004). Pokud platí, že druhy s teplotně určeným pohlavím nemají výrazně diferenciované pohlavní orgány (Rhen et al. 2005), pohlavní dimorfismus v hemipenisech takto velkých juvenilů u scinků by neměl být pozorován. Na základě svých výsledků získaných měření hemipenisů u velkého počtu mlád'at *Paroedura picta* nepovažují metodu určování pohlaví mlád'at ještěřů na základě velikosti hemipenisu za spolehlivou a závěry založené na této metodě za dostatečně doložené.

V souhrnu tedy syté samice kladou větší vajíčka, ze kterých se líhnou větší mlád'ata. Poměr pohlaví mlád'at se ale mezi oběma skupinami samic neliší a ani hmotnost spolu s tvarem mláděte nijak nesouvisí s jeho pohlavím (souhrnně obr. 24). Mlád'ata jsou pohlavně dimorfní pouze v délce párového pářícího orgánu – hemipenisu, rozdíl mezi pohlavími je však malý a ztrácí se ve variabilitě délky tohoto orgánu.



Obr. 24 Schéma hierarchie dělení investic do růstu, reprodukce a zásob v závislosti na zdrojích. V rámci reprodukce se samice s různými hladinami potravy neliší v poměru pohlaví mlád'at, ale mají nižší frekvence snůšek i velikost vajíček (jasná hierarchie mezi těmito parametry zde již není patrná). Šedé šipky představují situaci, kde se vliv množství zdrojů neuplatňuje.

6. ZÁVĚR

Dostupnost zdrojů hraje u gekona *Paroedura picta* významnou roli v ovlivnění většiny sledovaných „life-history“ parametrů, významnou výjimkou je alokace do růstu. Z výsledků je patrná hierarchie alokace zdrojů. Syté i hladové samice nejprve alokují stejné množství dostupných zdrojů do růstu. Růst navíc odráží trend růstové křivky - všechny rozmnožující se samice záhy vyrostou na stejnou preferovanou velikost, která je pak víceméně konstantní. Má-li samice možnost s rozmnožovat, činí tak po dosažení této velikosti na úkor růstu. Zásoby tvoří až po saturaci potřeby růstu a reprodukce.

V rámci reprodukce lze podle dostupnosti zdrojů nalézt rozdíl v počtu i kvalitě potomků. Hladové samice nejen že netvořily tukové zásoby, ale zmenšily i velikost vajíček (cca o 10% menší než u sytých), i když mají oproti sytým nižší frekvenci snůšek. Sytým samicím naopak zbyl dostatek energie pro tvorbu tukových zásob.

Mláďata sytých a hladových samic se však nelišila v poměru pohlaví a nebyla ani nijak pohlavně dimorfní (výjimku tvoří nepatrný rozdíl v délce hemipenisu). Velikost mláďate ovšem závisí na velikosti vajíčka. Různé hladiny dostupných zdrojů potravy tedy ovlivní i kvalitu mláďat. Samice ale nejsou schopny v závislosti na zdrojích manipulovat poměrem pohlaví svých potomků – neexistuje selektivní zvýhodňování určitého pohlaví.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Anderson, S. C. (1999) *The Lizards of Iran*. Ithaca, New York: Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
- Andrews, R. & Rand, A. S. (1974) Reproductive effort in anoline lizards. *Ecology* 55: 1317-1327.
- Angilletta, M. J. Jr.; Sears, M. W. & Winters, R. S. (2001) Seasonal variation in reproductive effort and its effect on offspring size in the lizard *Sceloporus undulatus*. *Herpetologica* 57: 365-375.
- Ashton, K. G. (2005) Life history of a fossorial lizard, *Neoseps reynoldsi*. *Journal of Herpetology* 39: 389-395.
- Aubret, F.; Bonnet, X.; Shine, R. & Maumelat, S. (2003) Clutch size manipulation, hatching success and offspring phenotype in the ball python (*Python regius*). *Biological Journal of the Linnean Society* 78: 263-272.
- Ballinger, R. E.; Tyler, E. D. & Tinkle, D. W. (1972) Reproductive ecology of a West Texas population of the greater earles lizard, *Cophosaurus texanus*. *The American Midland Naturalist* 88: 419-428.
- Bauwens, D. & Díaz-Uriarte, R. (1997) Covariation of life-history traits in lacertid lizards: a comparative study. *The American Naturalist* 149: 91-111.
- Blumberg, M. S.; Lewis, S. J.; Sokoloff, G. (2002) Incubation temperature modulates post-hatching thermoregulatory behavior in the Madagascar ground gecko, *Paroedura pictus*. *Journal of Experimental Biology* 205: 2777-2784.
- Caley M. J.; Schwarzkopf L; Shine R. (2001) Does total reproductive effort evolve independently of offspring size? *Evolution* 55: 1245-1248
- Colli, G. R.; Mesquita, D. O.; Rodrigues, P. V. V. & Kitayama, K. (2003) Ecology of the gecko *Gymnodactylus geckoides amarali* in a neotropical savana. *Journal of Herpetology* 37: 694-706.

- Congdon, J. D. & Gibbons, J. W. (1985) Egg components and reproductive characteristics of turtles: relationships to body size. *Herpetologica* 41: 194-205.
- Congdon, J. D. & Gibbons, J. W. (1987) Morphological constraint on egg size: A challenge to optimal egg size theory? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 4145-4147.
- Cooper, W. E. & Vitt, L.J. (2002) Distribution, extant, and evolution of plant consumption by lizards. *Journal of Zoology* 257: 487-517.
- Dixon, J. R. & Kroll, J. C. (1974) Resurrection of the generic name *Paroedura* for the Phyllodactyline geckos of Madagascar, and description of a new species. *Copeia* 1974: 24-30.
- Donellan, S. C. (1985) The evolution of sex chromosomes in scincid lizards. Ph.D. thesis, Macquarie University, NSW, Australia. ex Wapstra, E.; Olsson, M.; Shine, R.; Edwards, A.; Swain R. & Joss, J. M. P. (2004) Maternal basking behaviour determines offspring sex in a viviparous reptile. *Proceedings of the Royal Society B (Suppl.)* 271: S230-S232.
- Doody, J. S.; Georges, A. a. Young, J. E. (2003) Twice every second year: reproduction in the pig-nosed turtle, *Carettochelys insculpta*, in wet-dry tropics of Australia. *Journal of Zoology, London* 259: 179-188.
- Doughty, P. & Shine, R. (1997) Detecting life history trade - offs: measuring energy stores in „capital“ breeders reveals costs of reproduction. *Oecologia* 110: 508-513.
- Doughty, P. (1996) Allometry of reproduction in two species of gekkonid lizards (*Gehyra*): effects of body size miniaturization on clutch and egg sizes. *Journal of Zoology, London* 240: 703-715.
- Doughty, P. (1997) The effects of „fixed“ clutch sizes on lizard life-histories: reproduction in the australian velvet gecko, *Oedura lesueurii*. *Journal of Herpetology* 31: 266-272.
- Dunham, A. E. & Miles, D. B. (1985) Patterns of covariation in life history traits of squamate reptiles: the effects of size and phylogeny reconsidered. *The American Naturalist* 126: 231-257.

- Elf, P. K. (2003) Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. *General and Comparative Endocrinology* 132: 349-355.
- Elf, P. K. (2004) Yolk steroid hormones and their possible roles in TSD species. pp 111-118 in N. Valenzuela, V. Lance (Editors). *Temperature – dependent sex determination in vertebrates*. Smithsonian Books, Washinton.
- Gregory, P. T. & Skebo, K. M. (1998) Trade-offs between reproductive traits and the influence of food intake during pregnancy in the garter snake, *Thamnophis elegans*. *The American Naturalist* 151: 477-486.
- Hirshfield, M. F. & Tinkle, D. W. (1975) Natural selection and the evolution of reproductive effort. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 2227-2231
- Hendry, A. P.; Day, T. & Cooper, A. B. (2001) Optimal size and number of propagules: allowance for discrete stages and effects of maternal size on reproductive output and offspring fitness. *The American Naturalist* 157: 387-406.
- Henkel, F.W.; Schmidt, W.; Knothig, M.; Liebel, K.; Zobel, R. & Kaiser, H. (2000) *Amphibians and Reptiles of Madagascar, the Mascarene, the Seychelles, and the Comoro Islands*. Krieger Publishing Company.
- Holmes, M. M. & Wade, J. (2005) Sexual differentiation of the copulatory neuromuscular system in green anoles (*Anolis carolinensis*): normal ontogeny and manipulation of steroid hormones. *The Journal of Comparative Neurology* 489: 480-490.
- Christians, J. K. (2002) Avian egg size: variation within species and inflexibility within individuals. *Biological Review* 77: 1-26.
- Inger, R. F. & Greenberg, B. (1966) Annual reproductive patterns of lizards from Bornean rain forest. *Ecology* 47: 1007–1021.
- James, C. & Shine, R. (1988) Life-history strategies of Australian lizards: a comparison between the tropics and the temperate zone. *Oecologia* 75: 307-316.
- Jones, R. E.; Torkárz, R. R. & LaGree, F. T. (1975a) Endocrine control of clutch size in reptiles. V. FSH-induced follicular formation and growth in immature ovaries of *Anolis carolinensis*. *General and Comparative Endocrinology* 26: 354-367.

- Jones, R. E.; Torkarz, R. R.; LaGreek, F. T. & Fitzgerald, K. T. (1976) Endocrine control of clutch size in reptiles. VI. Patterns of FSH-induced ovarian stimulation in adult *Anolis carolinensis*. *General and Comparative Endocrinology* 30: 101-116.
- Jordan, M. A. & Snell, H. L. (2002) Life history trade-offs and phenotypic plasticity in the reproduction of Galápagos lava lizards (*Microlophus delanonis*). *Oecologia* 130: 44-52.
- Kaplan, R. H. & Salthe, S. N. (1979) The allometry of reproduction: an empirical view in salamanders. *The American Naturalist* 113: 671-689.
- Kearny, M. & Shine, R. (2005) Lower fecundity in parthenogenetic geckos than sexual relatives in the Australian arid zone. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 609-618.
- Kearny, M. & Shine, R. (2004) Developmental success, stability, and plasticity in closely related parthenogenetic and sexual lizards (*Heteronotia*, Gekkonidae). *Evolution* 58: 1560-1572.
- Kluge, A. G. (1983) Cladistic relationships among gekkonid lizards. *Copeia* 1983: 465-475.
- Krackow, S. (2002) Why parental sex ratio manipulation is rare in higher vertebrates. *Ethology* 108: 1041-1056.
- Kratochvíl, L. & Frynta, D. (2002) Body size, male combat and the evolution of sexual dimorphism in eublepharid geckos (Squamata: Eublepharidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 76: 303-314.
- Kratochvíl, L. & Frynta, D. (2006a). Body size effect on egg size in eublepharid geckos (Squamata: Eublepharidae), lizards with invariant clutch size: the negative allometry for egg size in ectotherms is not universal. *Biological Journal of the Linnean Society*, in press.
- Kratochvíl, L. & Frynta, D. (2006b). Egg shape and size allometry in geckos (Squamata: Gekkota), lizards with contrasting eggshell structure: Why lay spherical eggs? *Journal for Zoological Systematics and Evolutionary Research*, in press

- Kratochvíl L., Kubička L. (2006). Why to reduce clutch size to one or two eggs? Egg size allometries in lizards reveal different causes of invariant clutch size evolution. Subm. ms. – viz. 3. článek přílohy.
- Kratochvíl L., Kubička L., Landová E. (2006a). Does mechanism of sex determination constrain the potential for sex manipulation? A test in geckos with contrasting sex-determining system. Subm. ms. – viz. 1. článek přílohy.
- Kratochvíl L., Kubička L., Landová E. (2006b). Yolk hormone levels in the synchronously developing eggs of *Paroedura picta*, the gecko with genetic sex determination. Subm. ms. – viz. 2. článek přílohy.
- Lack, D. (1954) The natural regulation of animal numbers. Clarendon, Oxford. ex Sinervo, B. (1999) Mechanistic analysis of natural selection and a refinement of Lack's and Williams's principles. *The American Naturalist* 154: S26-S42.
- Nussbaum, R. A. (1981) Seasonal shifts in clutch size and egg size in the sde-blotched lizard *Uta stansburiana* baird and girard. *Oecologia* 49: 8-13.
- Olsson, M. & Shine, R. (1997) The limits to reproductive output: offspring size versus number in the sand lizard (*Lacerta agilis*). *The American Naturalist* 149:179-188.
- Olsson, M. & Shine, R (1999a) Phenotypic plasticity in the frequency of reproduction in female snow skinks, *Niveoscincus microlepidotus*. *Copeia* 1999: 794-796. ex Olsson, M. & Shine, R (2001) Facultative sex allocation in snow skink lizards (*Niveoscincus microlepidotus*). *Journal of Evolutionary Biology* 14: 120-128.
- Olsson, M. & Shine, R (2001) Facultative sex allocation in snow skink lizards (*Niveoscincus microlepidotus*). *Journal of Evolutionary Biology* 14: 120-128.
- Powell, G. L. & Russell, A. P. (1985) Growth and sexual size dimorphism in Alberta populations of the eastern short – horned lizard, *Phrynosoma douglassi brevirostre*. *Canadian Journal of Zoology* 63: 139-154.
- Rajkumar, S. R. & Shanbhag, B. A. (2003) Interrelationships among reproductive traits of female lizard, *Sitana ponticeriana* (Cuvier). *Current Science* 85: 89-91.

- Read, J. L. (1999) Longevity, reproductive effort and movements of three sympatric Australian arid-zone geckos. *Australian Journal of Zoology* 47: 307-316.
- Reaney, L. T. & Whiting, M. J. (2002) Life on a limb: ecology of the tree agama (*Acanthocercus a. atricollis*) in southern Africa. *Journal of zoology, London* 257: 439-448.
- Rhen, T.; Sakata, J. T. & Crews, D. (2005) Effects of gonadal sex and incubation temperature on the ontogeny of gonadal steroid concentrations and secondary sex structures in leopard geckos, *Eublephris macularius*. *General and Comparative Endocrinology* 142: 289-296.
- Robert, K. A. & Thompson, M. B. (2001) Viviparous lizard selects sex of embryos. *Nature* 412: 698-699.
- Rock, J.; Cree, A. & Andrews, R. M. (2002) The effect of reproductive condition on thermoregulation in a viviparous gecko from a cool climate. *Journal of Thermal Biology* 27: 17-27.
- Röll, B. (2000) Gecko vision – visual cells, evolution, and ecological constraints. *Journal of Neurocytology* 29: 471-484.
- Sexton, O. J.; Ortleb, E. P.; Mathaway, L. M.; Ballinger, R. E. & Licht, P. (1971) Reproductive cycles of three species of anoline lizards from the Isthmus of Panama. *Ecology* 52: 201-215.
- Shanbhag, B. A. (2003) Reproductive strategies in the lizard, *Calotes versicolor*. *Current Science* 84: 646-652.
- Shine, R. (1988) The evolution of large body size in females: a critique of Darwin's „fecundity advantage“ model. *The American Naturalist* 131:124-131.
- Shine, R. (1989) Alternative models for the evolution of offspring size. *The American Naturalist* 134:311-317.
- Shine, R. (1992) Relative clutch mass and body shape in lizards and snakes: is reproductive investment constrained or optimized? *Evolution* 46: 828-833.

- Shine, R. & Greer, A. E. (1991) Why are clutch sizes more variable in some species than in others? *Evolution* 45: 1696-1706.
- Shine, R. & Charnov, E. L. (1992) Patterns of survival, growth, and maturation in snakes and lizards. *The American Naturalist* 139: 1257-1269.
- Shine, R.; Keogh, S.; Doughty, P. & Giragossyan, H. (1998) Cost of reproduction and the evolution of sexual dimorphism in a „flying lizard“ *Draco melanopogon* (Agamidae). *Journal of Zoology, London* 246: 203-213.
- Schoener, T. W. & Schoener, A. (1978) Estimating and interpreting body – size growth in some *Anolis* lizards. *Copeia* 1978: 390-405.
- Silk, J. B.; Willoughby, E. & Brown, G. R. (2005) Maternal rank and local resource competition do not predict birth sex ratios in wild baboons. *Proceedings of the Royal Society B* 272: 859-864.
- Sinervo, B. (1999) Mechanistic analysis of natural selection and a refinement of Lack's and Williams's principles. *The American Naturalist* 154: S26-S42.
- Sinervo, B. & Light, P. (1991) Proximate constraints on the evolution of egg size, number, and total clutch mass in lizards. *Science* 252: 1300-1302.
- Smith, C. C. & Fretwell, D. (1974) The optimal balance between size and number of offspring. *The American Naturalist* 108: 499-506.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1995) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W. H. Freeman and Co., New York.
- Starostová, Z.; Kratochvíl, L. & Frynta, D. (2005) Dwarf and giant geckos from the cellular perspective: The bigger the animal, the bigger its erythrocytes? *Functional Ecology* 19: 744-749.
- StatSoft, Inc. (2001) *STATISTICA for Windows, Vers. 6.0*. StatSoft, Tulsa, Oklahoma.
- Stearns, S.C. (1992) The evolution of life histories. New York: Oxford University Press.
- Thompson, G. C. & Pianka, E. A. (2001) Allometry of clutch and neonate sizes in monitor lizards (Varanidae: *Varanus*). *Copeia* 2001: 443-458.

- Tinkle, D. W. & Ballinger, R. E. (1972) *Sceleropus undulatus*: a study of the intraspecific comparative demography of a lizard. *Ecology* 53: 570-584.
- Tinkle, D. W.; Wilbur, H. M. & Tilley, S. G. (1970) Evolutionary strategies in lizard reproduction. *Evolution* 24: 55-74.
- Trivers, R. L. & Willard, D. E. (1973) Natural selection on parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science* 179: 90-92.
- UTHSCSA (2002) *UTHSCSA Image Tool for Windows vers. 3.00*.
<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>.
- Vitt, L. J. (1986) Reproductive tactic of sympatric gekkonid lizards with a comment on the evolutionary and ecological consequences of invariant clutch size. *Copeia* 1986: 773-786.
- Vitt, L. J. & Congdon, J. D. (1978) Body shape, reproductive effort, and relative clutch mass in lizards: resolution of a paradox. *The American Naturalist* 112: 595-608.
- Wapstra, E.; Olsson, M.; Shine, R.; Edwards, A.; Swain R. & Joss, J. M. P. (2004) Maternal basking behaviour determines offspring sex in a viviparous reptile. *Proceedings of the Royal Society B (Suppl.)* 271: S230-S232.
- Williams, G. C. (1966) Natural selection, the cost of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist* 100: 687-690.
- Zaaf, A. & Van Damme, R (2001) Limb proportions in climbing and ground – dwelling geckos (Lepidosauria, Gekkonidae): a phylogenetically informed analysis. *Zoomorphology* 121: 45-53.

8. PŘÍLOHY

8.1 První článek přílohy

Does mechanism of sex determination constrain the potential for sex manipulation? A test in geckos with contrasting sex-determining systems

Lukáš KRATOCHVÍL¹, Lukáš KUBIČKA² and Eva LANDOVÁ²

..

¹ Corresponding author: Department of Ecology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 44 Praha 2, Czech Republic;

e-mail: lukkrat@email.cz, phone: +420 221951845; fax: +420 221951804;

² Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 44 Praha 2, Czech Republic.

Abstract

The concentration of yolk steroids was suggested to be the main determinant of offspring sex in oviparous animals with both temperature-dependent (TSD) and genetic sex determination (GSD). However, the proposed mechanisms involved in either group are different: a direct effect of oestrogens on gonad feminization in TSD species *vs.* a differential induction of male- or female-producing gametes in GSD species. Geckos offer an ideal opportunity for testing the suggested mechanisms. Closely related species differ in the mode of sex determination. They lay clutches of two eggs formed in phase, both eggs share equal steroid levels. If an identical hormonal composition and environment during vitellogenesis, gravidity and incubation determine the sex of progeny, siblings should share the same sex in both TSD and GSD geckos. We found strong support for this prediction in a TSD gecko species. Among clutches incubated at the temperature producing both sexes, there was none with siblings of the opposite sex. On the other hand, about half of clutches yielded siblings of opposite sex in four GSD species. The results suggest that sex-determining systems constrain female ability to produce single-sex siblings and hence the potential for sex manipulation.

Keywords *Coleonyx*, environmental sex determination, *Eublepharis macularius*, invariant clutch size, lizard, sex ratio

Introduction

Sex determination occurs in basically two different modes: the sex of an individual is determined either by genetic or by environmental factors (Valenzuela et al. 2003; for an alternative view considering a continuum of sex determining mechanisms rather than two polar modes see e.g. Sarre et al. 2004). In reptiles, the most important environmental factor determining sex in some species is temperature during the sensitive period of incubation. Environmental sex determination is then called temperature-dependent sex determination (TSD).

It is well established that steroid hormones, specifically oestrogens, play a crucial role in sex determination in TSD species (Elf 2003; Pieau and Dorizzi 2004; but see St. Juliana et al. 2004). In simple terms, the initially undifferentiated embryonal gonads are triggered to the ovaries determining pathway by the levels of estradiol (E_2) above a necessary threshold. The E_2 levels below this threshold lead to the development of testes. Certain temperature-dependent factors (such as aromatase activity or the expression level of the *aromatase* gene - aromatase converts testosterone to E_2 ; Pieau and Dorizzi 2004) are apparently responsible for either maintaining the E_2 levels above the threshold at temperatures producing females, or for a drop in the E_2 levels below the feminization threshold at male producing temperatures. In many reptile TSD species, particular constant temperatures invariably lead to the production of nearly 100% of males or 100% of females among progeny. By contrast, intermediate temperatures produce different proportion of each sex according to the clutch identity. For example, from 0 to 100% of males hatch at 32 °C in the alligator (*Alligator mississippiensis*) (Lang and Andrews 1994). Elf (2003) hypothesized that at intermediate temperatures, the clutch sex ratio depends on

the initial, maternally derived yolk levels of E_2 in each egg, which stay either above or below the threshold necessary for ovary development during the sensitive period.

Moreover, circumstantial evidence exists that maternal or yolk levels of steroid hormones might influence offspring sex in species with genetic sex determination (GSD) as well. Potential hormonal influence on sex determination was hypothesized in both female (ZZ/ZW) and male (XX/XY) heterogametic species. For example, Lovern and Wade (2003a) described sex differences in yolk testosterone (T) concentration in relatively freshly fertilised eggs of the green anoles, *Anolis carolinensis* (an XX/XY species). As steroids are allocated into eggs during vitellogenesis, i.e. before ovulation and fertilization, they suggested that the yolk hormonal composition could influence the selection of either X or Y-chromosome bearing sperm at the time of fertilization. Correspondingly, Petrie et al. (2001) proposed that sexually dimorphic profiles of yolk hormones could lead to the distortion of sex-chromosome segregation in the peafowl (*Pavo cristatus*), i.e. a ZZ/ZW species.

In conclusion, the concentration of yolk steroid hormones was suggested to be an important determinant of offspring sex in oviparous animals with both TSD and GSD. However, the propounded mechanisms involved in either group are different: a direct effect of oestrogens on gonad feminization in TSD species vs. a differential induction of male- or female-producing gametes in GSD species. Among reptiles, both GSD and TSD occur in closely related species in several lineages (Janzen and Krenz 2004). Such lineages offer an opportunity for testing the contribution of suggested mechanisms to offspring sex determination. Geckos are one of the groups encompassing species with both modes of sex determination. Females of most species lay invariant clutches of two eggs of approximately equal size. In comparison to other reptiles, their eggs are exceptionally large, relative to female size (Kratochvíl and Frynta 2006). Vitellogenesis and ovulation of

the two eggs are in phase (Rhen et al. 2000). During these processes, the quantities of steroids in the yolk of bird and reptile eggs correlate with circulating hormone levels in the female blood (e.g. Adkins-Regan et al. 1995; Janzen et al. 2002; Williams et al. 2005; but see Lovern and Wade 2003b). Synchronously formed gecko eggs therefore should have identical hormonal yolk composition, which is indeed the case. High interclutch, but very low intraclutch variance in T and E₂ concentrations was found in freshly laid eggs of *Eublepharis macularius*, a TSD gecko species (Elf 2004) and *Paroedura picta*, a distantly related GSD species (L. Kratochvíl, L. Kubička and E. Landová, unpublished data). If hormonal levels and environment during vitellogenesis, pregnancy and incubation influence the sex of progeny, siblings incubated in the common environment should share the same sex in both TSD and GSD gecko species. In order to test whether clutch identity and shared environment lead to the same sex of siblings, we collected fresh, laboratory-laid clutches of five species of geckos (one TSD, four GSD species). Eggs from a particular clutch were incubated side by side in the same box. Subsequently, we tested whether clutches consisting of siblings of opposite sexes were less frequent than expected by chance in both TSD and GSD species.

Material and methods

Four out of five gecko species studied are members of the family Eublepharidae. This is a small, monophyletic assemblage of primitive geckos, sister group to all other gekkotan lizards (Kluge 1987). The representatives of the TSD species, *Eublepharis macularius* (Viets et al. 1993), were caught in the field in Pakistan. The other three eublepharid species examined possess GSD: *Coleonyx variegatus* (Viets et al. 1994); *C. mitratus* (Viets et al. 1994; Bragg et al. 2000); *C. elegans* (own unpublished data from a different study). The

last GSD gecko species examined, *Paroedura picta* (Blumberg et al. 2002), is a member of the family Gekkonidae. In contrast to the eublepharid species, females of *Paroedura picta* lay hard-shelled eggs. All experimental animals were kept in the laboratory breeding room under common conditions described in detail elsewhere (Kratochvíl and Frynta 2002). Females were examined twice a week and the stage of egg development was determined. When a female of eublepharid species was considered to be gravid (oviductal eggs in geckos are easily recognizable through the abdomen wall), she was provided with a small box with wet substrate for egg laying. Gravid females were checked daily. After the eggs were laid, they were individually marked and put into an incubator with constant temperature (28 or 30 °C in *E. macularius* and *C. variegatus*; 26, 28 or 30 °C in *C. mitratus* and *C. elegans*; and 30 °C in *P. picta*). The eggs from the same clutch were always put side by side into the same small plastic box filled with moist substrate for eublepharids and dry sand for *Paroedura picta*. In species, where eggs were incubated at more temperatures, the constant temperature for a given clutch was chosen randomly. The position and orientation of boxes in the incubators were shifted regularly. Egg mortality was small. As we were interested in the sex ratio of siblings, only clutches where both siblings hatched successfully were included into the present analysis. Females of all species occasionally (very rarely in eublepharids, more often in *Paroedura picta*) lay only one egg per clutch. Such clutches were excluded. The sex of eublepharid juveniles was determined from the presence of secondary sexual characters (enlarged hemipenises, precloacal pores in males) at the age of ten months in eublepharid juveniles. The sex of *Paroedura picta* hatchlings was determined by the direct inspection of gonads during dissection at the time of hatching (ovaries are considerably smaller than and not as compact as testes). Data from all test constant temperatures were pooled for the GSD species where incubation temperature does not affect sex ratio. We tested the proportion of

clutches yielding two males : one male and one female : two females against the predicted numbers of such clutches by χ^2 -test. When deriving the predicted numbers, we assumed the ratio of 1:2:1 for the GSD species, but we went from the actual sex ratio at the given temperature for *E. macularius*, the TSD species.

Results

In total, we examined 340 gecko hatchlings from 170 double-eggs clutches of 80 females (17 females of *E. macularius*, 15 females of *P. picta*, 24 females of *C. elegans*, 15 females of *C. mitratus*, and 9 females of *C. variegatus*, respectively). Our wild-caught *E. macularius* individuals had the same dependence of sex ratio on temperature as a previously studied laboratory population (*cf.* Viets et al. 1993): we got 100% of females at 28 °C, but only 62% at 30 °C (Table 1). Among clutches incubated at 30 °C, there was none with siblings of the opposite sex, which is significantly different from the values predicted from the actual sex ratio at 30° C (observed 10:0:16 vs. predicted 3.75:12.25:9.99; $P < 0.00001$). On the other hand, in all four GSD species (*Coleonyx elegans*, *C. mitratus*, *C. variegatus*, and *Paroedura picta*), clutches with siblings of the opposite sex were the most frequent. Their proportion corresponded well to the theoretical predictions assuming equal sex ratio (Table 1).

Discussion

As gecko clutches consist of just two extremely large eggs, and maternal investment into each egg is thus enormous, the theory of sex allocation assumes strong selection on maternal manipulation of offspring sex, i.e. on producing offspring of the sex that shows

the greatest fitness in those particular situations. Gecko eggs within an individual clutch are of similar size (although egg size varies among clutches, see e.g. Kratochvíl and Frynta 2002), they grow and are fertilised under the same maternal conditions and they share the levels of yolk hormones and potentially also nutrient, water and other resources. As both eggs from a given clutch are deposited into a nest side by side, they share the conditions during incubation as well. Therefore, if there is any space for sex manipulation and adaptive differential investment into the sexes in particular circumstances, both siblings in gecko clutches should be of the same sex. With a single-sex litter, gecko mothers can optimally allocate their resources because they are not forced to compromise on the fitness of one sex of their offspring in a given clutch. Animal potential for sex ratio manipulations was expected to be strongly constrained (but not totally prevented; Trivers and Willard 1973) by the mechanism of sex determination (Krackow 2002). Here, we tested whether clutch identity leads to the same sex of offspring in closely related TSD and GSD geckos. A proximate mechanism that could lead to the same sex of siblings in geckos was proposed for both TSD and GSD animals. Our study could thus be considered a test of the strength of the mechanisms suggested to influence offspring sex ratio in TSD and GSD animals.

The results clearly show that shared environment during vitellogenesis, pregnancy and incubation in simultaneously formed eggs constrains siblings' sex ratio in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*), the TSD species. The leopard gecko siblings are of identical sex probably due to the same level of E_2 during the sensitive sex-determining period. Alternatively, shared sex of siblings in the TSD species could reflect a shared temperature environment of the eggs incubated side by side. The opposite sex of hatchlings from different clutches incubated in the same incubator could then reflect small differences in the thermal environment among clutches. We find this explanation much less plausible, as hatchlings from different clutches at 30 °C were often of opposite sex even though they

were incubated simultaneously in the same small plastic box side by side. Moreover, the incubation time in *E. macularius* is strongly dependent on incubation temperature (Viets et al. 1993), but male vs. female hatchlings from 30 °C did not differ in incubation time (Mann-Whitney U test, n = 52, P = 0.10)

Elf (2004) detected considerable differences in yolk hormone (E₂ and T) concentrations among clutches of different leopard gecko females, but only negligible differences between both eggs in a single clutch. Much larger inter- than intraclutch differences in yolk hormone concentrations were also found in other TSD reptiles (turtles: Elf et al. 2002; crocodiles: Conley et al. 1997). However, siblings of crocodile or TSD turtles from the same intermediate temperature do not always share the same sex (Lang and Andrews 1994; Rhen and Lang 1998). The difference between the leopard gecko and these TSD species in intraclutch sex ratio at intermediate temperatures might be explained by a different course of vitellogenesis or ovulation. In geckos with two eggs per clutch, a single egg is ovulated in each ovarium, and vitellogenesis of both eggs proceeds in parallel. By contrast, turtle and crocodile eggs, later oviposited simultaneously, could develop and grow more out of phase. For example, yolking follicles and eggs at different stages of maturation, differing significantly in size and hormone levels, can be found at the same time within a gravid female of the painted turtle (*Chrysemys picta*) from a population with a single clutch per season (Elf et al. 2002). Their numbers and size variation (*cf.* Fig 6 in Elf et al. 2002) suggest that they do not represent different clutches in varying states of maturation. Therefore, we could expect more differences in hormone levels between eggs from the same clutch in turtles and crocodiles than in the leopard geckos, where the eggs within the same clutch develop synchronously.

Bull et al. (1988) and Bragg et al. (2000) speculated that the leopard gecko females could manipulate offspring sex ratio by choosing the temperature for egg deposition.

However, they found that females choose nest-sites with temperatures rather tightly clustered around 29 °C (Bull et al. 1988; Bragg et al. 2000), where both sexes readily hatch (Viets et al. 1993). Our results suggest that females of this TSD species are able to manipulate the sex ratio of their progeny by different allocation of yolk steroid hormones to individual clutches precisely exclusively at the preferred intermediate temperature producing both sexes. To test it, future research should focus on the sex ratio of individual TSD females at intermediate temperatures and directly explore the relationships between sex ratio, nest temperatures and allocated levels of yolk steroids and their consequences for female and offspring fitness.

As both eggs are formed in parallel and thus share the same environment during vitellogenesis, ovulation, fertilization and pregnancy in GSD species of geckos as well, they were also predicted to produce hatchlings of the same sex. We do not know whether our GSD species have XX/XY or ZZ/ZW system of sex chromosomes (both systems occur in geckos; Moritz 1990). Nonetheless, a relationship between hormones and vertebrate sex determination was suggested for both of them. Maternally derived yolk steroid levels were hypothesized to influence sex by differentially affecting male- and female-inducing sperm in XX/XY species (Lovern and Wade 2003a), or by an induction of Z- or W-bearing follicle during meiosis in ZZ/ZW species (Petrie et al. 2001, reviewed in Pike and Petrie 2003; but see Pilz et al. 2005). At least in *Paroedura picta*, freshly laid eggs in a clutch have very similar T and E₂ levels, while individual clutches differ significantly in hormone concentrations even in our standardized lab conditions. Among clutches, range of T concentrations was *ca.* 1.00-2.00 ng/g; range of E₂ concentrations *ca.* 0.2-0.5 ng/g (L. Kratochvíl, L. Kubička and E. Landová, unpublished manuscript), which are variations comparable to those reported in leopard geckos or green anoles (Elf 2004; Lovern and Wade 2003a). In any case, in contrast to the TSD species, clutch identity in all the

examined GSD species of geckos examined does not constrain the sex of siblings. Our results thus suggest that identical levels of yolk steroid hormones and shared maternal conditions during fertilization do not affect offspring sex in GSD species. The observed siblings' sex ratio in GSD geckos indirectly supports the sceptical view (Krackow 2002; Ewen et al. 2004; Le Galliard et al. 2005; Silk et al. 2005; but see West and Sheldon 2002; West et al. 2005) that GSD vertebrates are not able to manipulate sex ratio of their offspring considerably, and that sex-determining systems strongly constrain the opportunity for sex ratio manipulations.

Acknowledgements

We thank M. Pokorná, Z. Starostová, J. Červenka, Š. Gorički and F. J. Janzen for critical reading of the manuscript and constructive comments. J. Břehová, H. Jirků, M. Pokorná, and K. Zelená helped us to take care of the studied animals. The research was supported by GAAV project No. KJB611302. All work was performed in accordance with the regulations of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Charles University.

References

- Adkins-Regan E, Ottinger MA, Park J (1995) Maternal transfer of estradiol to yolk alters sexual differentiation of avian offspring. *J Exp Zool* 271:466-470
- Bull JJ, Gutzke WHN, Bulmer MG (1988) Nest choice in a captive lizard with temperature-dependent sex determination. *J Evol Biol* 2:177-184

- Blumberg MS, Lewis SJ, Sokoloff G (2002) Incubation temperature modulates post-hatching thermoregulatory behavior in the Madagascar ground gecko *Paroedura pictus*. *J Exp Biol* 205:2777-2784
- Bragg WK, Fawcett TB, Bragg TB, Viets BE (2000) Nest-site selection in two eublepharid gecko species with temperature-dependent sex determination and one with genotypic sex determination. *Biol J Linn Soc* 69:319-332
- Conley AJ, Elf PK, Corbin CJ, Dubowsky S, Fivizzani A, Lang, JW (1997) Yolk steroid decline during sexual differentiation in the alligator. *Gen Comp Endocrinol* 107:191-200
- Elf PK (2003) Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. *Gen Comp Endocrinol* 132:349-355
- Elf PK (2004) Yolk steroid hormones and their possible roles in TSD species. In N. Valenzuela and V. Lance (eds.), *Temperature-dependent sex determination in vertebrates*, Washington, Smithsonian Books, pp. 111-118
- Elf PK, Lang JW, Fivizzani AJ (2002) Yolk hormone levels in the eggs of snapping turtles and painted turtles. *Gen Comp Endocrinol* 127:26-33
- Ewen JG, Cassey P, Moller AP (2004) Facultative primary sex ratio variation: a lack of evidence in birds? *Proc R Soc B* 271:1277-1282
- Le Galliard JF, Fitze PS, Cote J, Massot M, Clobert, J (2005) Female common lizards (*Lacerta vivipara*) do not adjust their sex-biased investment in relation to the adult sex ratio. *J Evol Biol* 18: 1455-1463.
- Janzen FJ, Krenz JG (2004) Phylogenetics: Which was first, TSD or GSD? In N. Valenzuela and V. Lance (eds.), *Temperature-dependent sex determination in vertebrates*, Washington, Smithsonian Books, pp. 121-130

- Janzen FJ, Wilson ME, Tucker JK, Ford SP (2002) Experimental manipulation of steroid concentrations in circulation and in egg yolks of turtles. *J Exp Zool* 293:58-66
- Kluge AG (1987) Cladistic relationships in the Gekkonoidea (Squamata, Sauria). *Misc Publ Mus Zool Univ Michigan* 173:1-54
- Krackow S (2002) Why parental sex ratio manipulation is rare in higher vertebrates. *Ethology* 108:1041-1056
- Kratochvíl L, Frynta D (2002) Body size, male combat and the evolution of sexual dimorphism in eublepharid geckos (Squamata: Eublepharidae). *Biol J Linn Soc* 76:303-314
- Kratochvíl L, Frynta D (2006) Body size effect on egg size in eublepharid geckos (Squamata: Eublepharidae), lizards with invariant clutch size: the negative allometry for egg size in ectotherms is not universal. *Biol J Linn Soc*, in press.
- Lang JW, Andrews HV (1994) Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *J Exp Zool* 270:28-44
- Lovern MB, Wade J (2003a) Yolk testosterone varies with sex in eggs of the lizard, *Anolis carolinensis*. *J Exp Zool* 295A:206-210
- Lovern MB, Wade J (2003b) Sex steroids in green anoles (*Anolis carolinensis*): uncoupled maternal plasma and yolking follicle concentrations, potential embryonic steroidogenesis, and evolutionary implications. *Gen Comp Endocrinol* 134:109-115
- Moritz C (1990) Patterns and processes of sex chromosome evolution in Gekkonid lizards (Sauria: Reptilia). In E. Olmo (ed.), *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*, Berlin, Birkhauser-Verlag, pp. 205-219
- Petrie M, Schwabl H, Brande-Lavridsen N, Burke T (2001) Sex differences in avian yolk hormone levels. *Nature* 412:498
- Pieau C, Dorizzi M (2004) Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in gonads. *J Endocrinol* 181: 367-377

- Pike TW, Petrie M (2003) Potential mechanisms of avian sex manipulation. *Biol Rev* 78:553-574
- Pilz KM, Adkins-Regan E, Schwabl H (2005) No sex difference in yolk steroid concentrations of avian eggs at laying. *Biol Lett* 1:318-321
- Rhen T, Lang JW (1998) Among-family variation for environmental sex determination in reptiles. *Evolution* 52:1514-1520
- Rhen T, Sakata JT, Zeller M, Crews D (2000) Sex steroid levels across the reproductive cycle of female leopard geckos, *Eublepharis macularius*, from different incubation temperatures. *Gen Comp Endocrinol* 118:322-331
- Sarre SD, Georges A, Quinn A (2004) The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays* 26:639-645
- St. Juliana JR, Bowden RM, Janzen FJ (2004) The impact of behavioral and physiological maternal effects on offspring sex ratio in the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Behav Ecol Sociobiol* 56:270-278
- Silk JB, Willoughby E, Brown GR (2005) Maternal rank and local resource competition do not predict birth sex ratios in wild baboons. *Proc R Soc B* 272:859-864
- Trivers RT, Willard DE (1973) Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science* 179:90-92
- Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ (2003) Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined? *Am Nat* 161:676-683
- Viets BE, Tousignant A, Ewert MC, Nelson CE, Crews D (1993) Temperature-dependent sex determination in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J Exp Zool* 265:679-683
- Viets BE, Ewert MA, Talent LG, Nelson CE (1994) Sex determining mechanisms in squamate reptiles. *J Exp Zool* 270:45-56

West SA, Sheldon BC (2002) Constraints in the evolution of sex ratio adjustment. *Science* 295:1685-1688

West SA, Shuker DM, Sheldon BC (2005) Sex-ratio adjustment when relatives interact: A test of constraints on adaptation. *Evolution* 59:1211-1228

Williams TD, Ames CE, Kiparissis Y, Wynne-Edwards KE (2005) Laying-sequence-specific variation in yolk oestrogen levels, and relationship to plasma oestrogen in female zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Proc R Soc B* 272:173-177

Table 1 Total sex ratio and the number of two-eggs clutches producing different sex ratios in the examined species of geckos. The results of χ^2 -test show the statistical significance of deviations from the predicted ratio (1:2:1) of clutches producing two males : a female and a male : two females in the GSD species. In *E. macularius*, a TSD species, the predicted number of clutches with different sex ratios was computed from the actual sex ratio at 30 °C.

Species		Sex ratio (males:females)	No. of clutches with two males : a female and a male : two females	χ^2-test
<i>Eublepharis macularius</i>	28 °C	0:54	0: 0:27	-
	30 °C	20:32	10: 0:16	P < 0.00001
<i>Paroedura picta</i>		50:64	11:28:18	P = 0.42
<i>Coleonyx mitratus</i>		16:18	3:10: 4	P = 0.72
<i>C. elegans</i>		35:33	9:17: 8	P = 0.97
<i>C. variegatus</i>		10: 8	3: 4: 2	P = 0.85

8.2 Druhý článek přílohy

Yolk hormone levels in the synchronously developing eggs of *Paroedura picta*, the gecko with genetic sex determination

LUKÁŠ KRATOCHVÍL^{1*}, LUKÁŠ KUBIČKA² and EVA LANDOVÁ²

¹*Department of Ecology, Charles University, Viničná 7, 128 44 Praha 2, Czech Republic*

²*Department of Zoology, Charles University, Viničná 7, 128 44 Praha 2, Czech Republic*

* Corresponding author: Tel: +0042 02 21951845; fax: +00420 221951804;

E-mail: lukkrat@email.cz

Abstract

Sex steroid hormones of presumably maternal origin have been found in yolk of many oviparous vertebrates. Their effects on behavioural or physiological traits are well documented in birds, but till now largely unknown in reptiles. The investigations of yolk steroids in reptiles have been focused mainly on species with temperature-dependent sex determination, where steroid levels are suggested to determine the sex of progeny. Here we report initial oestradiol (E2) and testosterone (T) levels in yolk of the Madagascar ground gecko, *Paroedura picta*, a species with genetic sex determination. The mean yolk concentration was 0.391 ± 0.021 ng/g in E2, the mean concentration of T was much higher (1.478 ± 0.063 ng/g). Geckos usually lay two exceptionally large eggs per a clutch, vitellogenesis and ovulation of both eggs proceed in phase. Individual two-eggs clutches differed considerably in E2 and T levels. A clutch mean of E2 levels varied from 0.22 to 0.53 ng/g, T levels varied from a clutch mean of 1.02 to 1.99 ng/g. Both eggs in a clutch possessed very similar levels of E2 and T. Initial yolk steroid levels thus presumptively reflect maternal conditions during egg formation rather than differential allocation of hormones according to offspring sex.

Keywords: Lizards; estradiol; estrogen; invariant clutch size

Introduction

Steroid hormones are a common yolk component in many vertebrates (Schwabl 1993; Conley et al. 1997; Janzen et al. 1998). Although a number of recent papers documented their effects on behavioural or physiological traits in birds (usually a positive effect on individual fitness is reported, e.g. Schwabl 1993; Gorman and Williams 2005; but see Sockman and Schwabl 2000), their quantity and role in forming of phenotype in reptiles are still largely unknown. The investigations of yolk steroids in reptiles have been focused mainly on species with temperature-dependent sex determination (TSD), where steroid levels are suggested to determine the sex of progeny (Bowden et al. 2000; Elf 2003; cf. St. Juliana et al. 2004). Much less investigated is the role of yolk steroids in reptiles with genetic sex determination (GSD).

In spite of the recent interest in yolk steroid hormones, we have not had an unequivocal proof of their origin yet. Two alternatives were proposed: steroid hormones were suggested to be deposited to yolk either locally from the cells of the follicular wall (Hackl et al. 2003) or from the female systemic circulation. The correlation between circulating female hormone levels and initial quantities of steroids in yolk of eggs formed at the same time in birds and turtles (e.g. Adkins-Regan et al. 1995; Janzen et al. 2002; Williams et al. 2005) was taken as an indication for the latter possibility. Williams et al. (2005) cited two papers (Painter et al. 2002; Lovern and Wade 2003a) as an evidence that the maternal and yolk steroid levels are uncoupled in lizards. However, Painter et al. (2002) only found that female plasma and yolk steroid levels are quantitatively different. Contrariwise, they reported slight, but significant increase in yolk progesterone levels after massive experimental elevation of maternal progesterone levels in a viviparous lizard, *Sceloporus jarrovi*. In an oviparous congener (*S. graciosus*), the same authors did not find

correlation between maternal and foetal or hatchlings' steroid levels, but they did not test the relationship between maternal and initial yolk hormone levels. Lovern and Wade (2003a) reported uncoupled maternal plasma and yolk oestradiol (E2) and testosterone (T) concentrations in eggs and developing follicles in the green anoles (*Anolis carolinensis*), but they tested the correlation between maternal plasma and yolk steroid levels in eggs and follicles at different stages of their development. As E2 and T concentrations in yolk strongly depend on the phase of follicle/egg development (Lovern and Wade 2001, 2003a; Elf et al. 2002), we should restrict a test of correlation between maternal and yolk levels on the same developmental stage. The paper of Lovern and Wade (2003) thus could not be taken as an affirmation that maternal and yolk hormone levels in lizards do not correlate. Moreover, in their previous work (Lovern and Wade 2001), the same authors found the correlation between maternal and initial yolk steroid levels in the same species of anolis.

Recent evidence implies that yolk steroid levels during sensitive period, that depend on the initial quantities of steroids allocated by female in interaction with incubation temperature, determine the sex of progeny in TSD reptiles (Bowden et al. 2000; Elf 2003; cf. St. Juliana et al. 2004). The role of yolk hormones in sex determination or differentiation in species with GSD is more controversial. The deposition of steroids allocated to yolk was found to be sexually dimorphic in birds (ZW animals) (Petrie et al. 2001; but see Pilz et al. 2005). Lovern and Wade (2001, 2003b) found that yolk T concentration of freshly laid or even freshly fertilised eggs giving rise to males are nearly twice that of eggs giving rise to females in green anoles, a lizard with GSD of XY type.

Owing to their unique life-history, geckos present an interesting group for investigation of yolk steroid allocation. Females usually lay two exceptionally large eggs per a clutch (e.g. Kratochvíl and Frynta, 2006a,b), vitellogenesis and ovulation of both eggs proceed in phase (Rhen et al. 2000). If circulating female hormone levels or female

physiological condition influence the quantities of steroids in yolk of eggs formed at the same time, synchronously formed gecko eggs should have identical yolk hormonal composition. High interclutch variance, but very low intraclutch variance in T and E2 concentrations was found in freshly laid eggs in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*), the TSD gecko species (Elf 2004). However, it is not clear, whether we should expect the same pattern in GSD species of geckos as well, where yolk steroid levels could reflect different allocation to male vs. female eggs. In GSD geckos having equal primary sex ratio, the proportion of clutches yielding two males : one male and one female : two females is 1:2:1 (Kratochvíl, Kubička, Landová, unpublished manuscript). If different allocation into male and female eggs exists, about a half of clutches in GSD geckos should have large intraclutch variance in steroid hormone levels.

Here we report intra- and interclutch variance in initial E2 and T levels in yolk of the Madagascar ground gecko (*Paroedura picta*), the species with GSD (Blumberg et al. 2002) relatively distantly related to the leopard gecko. We tested, how particular clutches differ in allocated quantities of steroids and whether eggs in a given clutch share levels of these important hormones.

Material and methods

Experimental animals were kept in the laboratory breeding room under common conditions. Geckos were housed individually in glass terraria (30 x 30 x 20 cm) with sandy substrate, water dishes, shelters and heating cables allowing active thermoregulation (gradient 26-45 °C) under 12:12 light/dark cycle. They were fed with vitaminised crickets. Gravid females were checked daily. Females of *Paroedura picta* lay hard-shelled eggs into dry substrate. Freshly laid eggs (i.e. found in maximally 12 hours after laying) were

cleaned from substrate remains and weighted. To prepare samples for hormone concentration measurement, each egg was ruptured and the whole yolk was homogenized, weighted and suspended in 500 μ l of human physiological solution in a microtube and stored at -20 °C till the subsequent analysis. E2 and T levels were measured in Endocrinologic institute, Praha using a competitive-binding RIA (Wingfield and Farnel 1975). Briefly, for measurement of T concentration, 200 μ l of the homogenate was diluted in 400 μ l of physiological solution. Subsequently, samples were extracted with 3 ml diethyl ether, centrifugated (1500g, 5 minutes, 4 °C) and dried. Lipids were extracted twice with 1 ml methanol (80 %) and 1 ml n-hexane for one minute, centrifugated again (1500g, 5 minutes, 4 °C) and n-hexane was drained off. Methanol was dried thereafter, and samples were reconstituted in 600 μ l phosphate buffer. 100 μ l of sample, standard, and control, respectively, with 100 μ l radioligand (2616 cpm/10 μ l) and 100 μ l of specific antibody (dilution 1:25000) were incubated for 16 hours at 4 °C. After adsorption of unbond radioligand by activated carbon, radioactivity was measured and T concentration in a sample was calculated using calibration curve known from standard recoveries. E2 was assayed using a commercial Estradiol RIA kit from Orion Diagnostica, Finland encompassing microtubes with immobilised antibody. The hormone levels were measured blindly with respect to present analysis.

Software Statistica vers. 6 (StatSoft 2001) was used for subsequent statistical analyses. First, the normal distribution of values of individual egg mass, E2 and T concentrations was checked using Kolmogorov-Smirnov tests. The differences in yolk T vs. E2 concentrations and differences in egg mass, E2 and T concentrations among individual clutches were tested by GLM ANOVAs. Due to small sample size, nonparametric Spearman rank correlation tests between mass, E2, resp. T concentration of the first and the second egg in a clutch were used to test for inter- vs. intraclutch differences in these

three variables. The same tests were used to check the relationship of mean egg mass, mean T and E2 concentrations among clutches.

Results

We analyzed yolk steroid levels in 24 eggs from 12 clutches. Individual egg mass, E2 and T concentrations did not significantly deviate from the normal distribution (Kolmogorov-Smirnov tests n.s., $N = 24$). The mean egg mass was 0.975 ± 0.019 g (mean \pm S.E.). All yolk samples had detectable E2 and T. The mean yolk concentration was 0.391 ± 0.021 ng/g in E2 and 1.478 ± 0.063 ng/g in T, respectively. Yolk T concentration was much higher than E2 concentration in all eggs (ANOVA; $F = 270.05$; $P < 0.00001$). Individual clutches significantly differ in egg mass, E2 and T concentrations (GLM ANOVA, all $P < 0.001$). ANOVA models including intercept and clutch identity explains overwhelming majority of variability in egg mass (92 %), E2 concentration (94 %) and T concentration (87 %), respectively. The Spearman rank correlations between mass, E2, resp. T concentration of the first and the second egg in a clutch were all highly significant (all $P < 0.0001$; Fig. 1, 2) showing high interclutch, but small intraclutch differences in all three variables again. Spearman rank correlation test indicated no significant correlation of mean egg mass, mean T and E2 concentrations among clutches (all $P > 0.10$).

Discussion

Individual clutches of the Madagascar ground gecko differ considerably in E2 and T levels, there were about twofold differences in the mean concentrations of these steroids among particular clutches. Nevertheless, both eggs in a clutch possessed very similar

concentrations of E2 and T (Fig. 1). We can conclude that the pattern of intra- vs. interclutch variance in the GSD gecko is technically the same as in previously studied TSD species (Elf 2004).

As our method of yolk sampling was destructive and the technique for molecular sexing of GSD geckos has not been developed yet, we have no information on the sex of embryos in the collected eggs. However, the proportion of double-eggs clutches yielding two males : one male and one female : two females in the Madagascar ground geckos in our laboratory is approximately 1:2:1 (Kratochvíl, Kubička, Landová, unpublished manuscript). Therefore, if there is a differential maternal allocation of steroids into male and female eggs in *Paroedura picta* (as was reported in the green anoles; Lovern and Wade 2001, 2003b), about a half of examined clutches should have large intraclutch variance in steroid hormone levels, which is obviously not the case (Fig. 1). It seems that the sex-specific allocation of yolk steroids in the Madagascar ground gecko does not exist or that the difference in hormonal levels between male vs. female eggs are negligible in comparison to interclutch variation.

Reproducing female geckos are apparently not able to differently allocate hormones into simultaneously yolked follicles. Nearly identical levels of initial yolk steroids in synchronously formed eggs in *Paroedura picta* presumptively reflect common maternal conditions during vitellogenesis, which further supports the parallel function of either ovary in geckos (Rhen et al. 2000). Nevertheless, individual clutches significantly differ in the hormone concentrations. Future research should explore the phenotypic (and fitness) consequences of different steroid concentrations for offspring.

An interesting question is whether differences in yolk E2 and T levels and their ratio across taxa reflect phylogenetic relationships or sex-determining modes (Janzen et al. 1998; Lovern and Wade 2003a). The relevant information accumulated to this issue is still

scarce, but it suggests the latter possibility. The initial yolk T:E2 tends to be > 1 in birds and lizards with GSD, but < 1 in a crocodile and turtles with TSD (Lovern and Wade 2003a and references there; data listed in Elf 2004). Interestingly, the first data in geckos show the same trend. Yolks of freshly laid eggs possess higher concentration of E2 than T in the leopard gecko with TSD (Elf 2004), but the opposite is true in the Madagascar ground gecko (GSD). Initial yolk E2 levels between examined GSD and TSD geckos are comparable, but T levels are about ten times lower in the TSD species. The taxonomic range of studied GSD and TSD geckos should be definitively broaden during the next research. For the resolution of the relationship between initial yolk steroid level and system of sex determination within an explicit phylogenetic framework, it will be particularly important to focus on closely related gecko species with different sex-determining modes. It will be also fascinating to uncover the potential functional differences and evolutionary shifts in steroid roles during offspring phenotypic differentiation in GSD vs. TSD lizards.

In summary, our study is one of the first steps to the comparative analysis of yolk steroid allocation in lizards with different modes of sex determination. The examined TSD and GSD species of geckos share similar yolk E2 concentrations, however, the allocated level of T in the TSD species is much lower. The present paper reports for the first time the significant interclutch, but slight intraclutch differences in initial yolk levels of E2 and T in the GSD species of geckos, the phenomenon previously described in the gecko with TSD (Elf 2004). As gecko eggs in a clutch develop in phase, these observations can be interpreted as a support for the hypothesis that initial yolk steroid levels in synchronously developing eggs reflect common maternal conditions during egg formation. We believe that geckos laying clutches of similarly-sized eggs with comparable initial hormone levels, but differing in the mode of sex determination, present an excellent model for studies of maternal effects, phenotype differentiation and animal reproduction.

Acknowledgement

We thank R. Hampl (Endocrinologic institute, Praha) for the constituent help with hormone assays. The research was supported by GAAV project No. KJB611302.

Institutional support was given by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project No. 0021620828). All work was performed in accordance with the regulations of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Charles University.

References

- Adkins-Regan E, Ottinger MA, Park J (1995) Maternal transfer of estradiol to yolk alters sexual differentiation of avian offspring. *J Exp Zool* 271:466-470
- Blumberg MS, Lewis SJ, Sokoloff G (2002) Incubation temperature modulates post-hatching thermoregulatory behavior in the Madagascar ground gecko *Paroedura pictus*. *J Exp Biol* 205:2777-2784
- Bowden RM, Ewert MA, Nelson CE (2000) Environmental sex determination in a reptile varies seasonally and with yolk hormones. *Proc R Soc Lond* 267:1745-1749
- Conley AJ, Elf P, Corbin CJ, Dubowsky S, Fivizzani A, Lang JW (1997) Yolk steroids decline during sexual differentiation in the alligator. *Gen Comp Endocrinol* 107:191-200
- Elf PK (2003) Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. *Gen Comp Endocrinol* 132:349-355

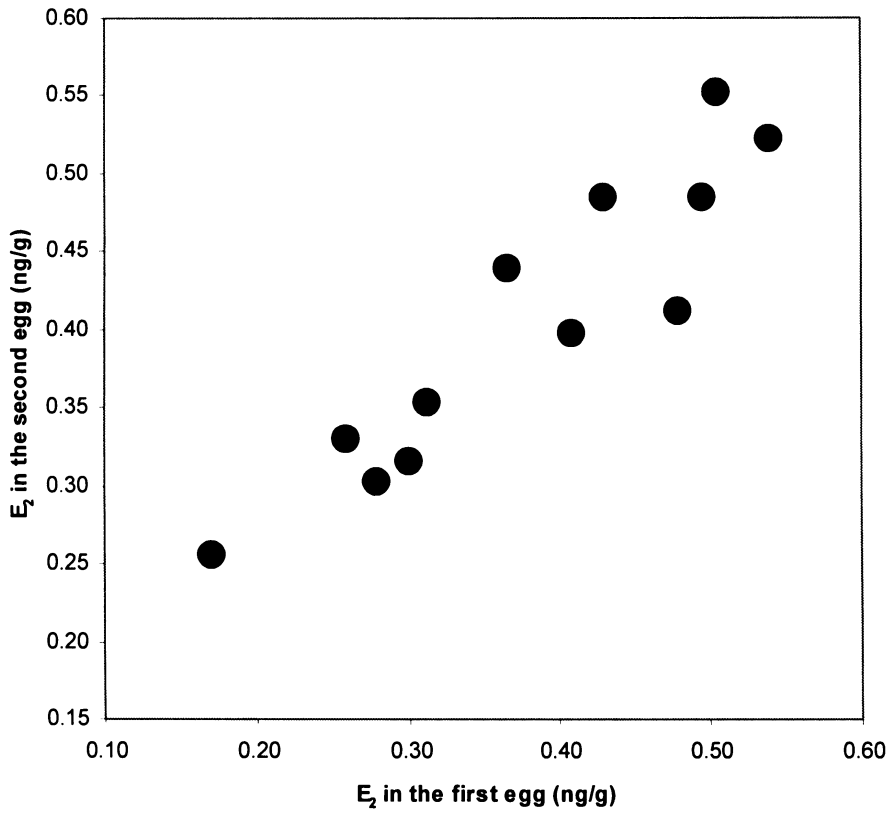
- Elf PK (2004) Yolk steroid hormones and their possible roles in TSD species. In: Valenzuela N, Lance V (eds) Temperature-dependent sex determination in vertebrates. Smithsonian Books, Washington, pp 111-118
- Elf PK, Lang JW, Fivizzani AJ (2002) Yolk hormone levels in the eggs of snapping turtles and painted turtles. *Gen Comp Endocrinol* 127:26-33
- Gorman KB, Williams TD (2005) Correlated evolution of maternally derived yolk testosterone and early developmental traits in passerine birds. *Biol Lett* 1:318-321
- Hackl R, Bromundt V, Kotrschal K, Möstl E (2003) Distribution and origin of steroid hormones in the yolk of Japanese quail eggs (*Coturnix coturnix japonica*). *J Comp Physiol B* 173:327-331
- Janzen FJ, Wilson ME, Tucker JK, Ford SP (1998) Endogenous yolk steroid hormones in turtles with different sex-determining mechanisms. *Gen Comp Endocrinol* 111:306-317
- Janzen FJ, Wilson ME, Tucker JK, Ford SP (2002) Experimental manipulation of steroid concentrations in circulation and in egg yolks of turtles. *J Exp Zool* 293:58-66
- Kratochvíl L, Frynta D (2006a) Egg shape and size allometry in geckos (Squamata: Gekkota), lizards with contrasting eggshell structure: Why lay spherical eggs? *J Zool Syst Evol Res* (in press)
- Kratochvíl L, Frynta D (2006b). Body size effect on egg size in eublepharid geckos (Squamata: Eublepharidae), lizards with invariant clutch size: the negative allometry for egg size in ectotherms is not universal. *Biol J Linn Soc* (in press)
- Lovern MB, Wade J (2001) Maternal plasma and egg yolk testosterone concentrations during embryonic development in green anoles (*Anolis carolinensis*). *Gen Comp Endocrinol* 124:226-235

- Lovern MB, Wade J (2003a) Sex steroids in green anoles (*Anolis carolinensis*): uncoupled maternal plasma and yolk follicle concentrations, potential embryonic steroidogenesis, and evolutionary implications. *Gen Comp Endocrinol* 134:109-115
- Lovern MB, Wade J (2003b) Yolk testosterone varies with sex in eggs of the lizard, *Anolis carolinensis*. *J Exp Zool A* 295:206-210
- Painter D, Jennings DH, Moore MC (2002) Placental buffering of maternal steroid hormone effects on fetal and yolk hormone levels: a comparative study of a viviparous lizard, *Sceloporus jarrovi*, and an oviparous lizard, *Sceloporus graciosus*. *Gen Comp Endocrinol* 127:105-116
- Petrie M, Schwabl H, Brande-Lavridsen N, Burke T (2001) Sex differences in avian yolk hormone levels. *Nature* 412:498
- Pilz KM, Adkins-Regan E, Schwabl H (2005) No sex difference in yolk steroid concentrations of avian eggs at laying. *Biol Lett* 1:318-321
- Rhen T, Sakata JT, Zeller M, Crews D (2000) Sex steroid levels across the reproductive cycle of female leopard geckos, *Eublepharis macularius*, from different incubation temperatures. *Gen Comp Endocrinol* 118:322-331
- Schwabl H (1993) Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proc Nat Acad Sci USA* 90:11446-11450
- Sockman KW, Schwabl H (2000) Yolk androgens reduce offspring survival. *Proc R Soc Lond B* 267:1451-1456
- St. Juliana JR, Bowden RM, Janzen FJ (2004) The impact of behavioral and physiological maternal effects on offspring sex ratio in the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Behav Ecol Socbiol* 56:270-278
- Wingfield JC, and Farnel DS (1975) The determination of five steroids in avian plasma by radioimmunoassay and competitive protein-binding. *Steroids* 26:311-327

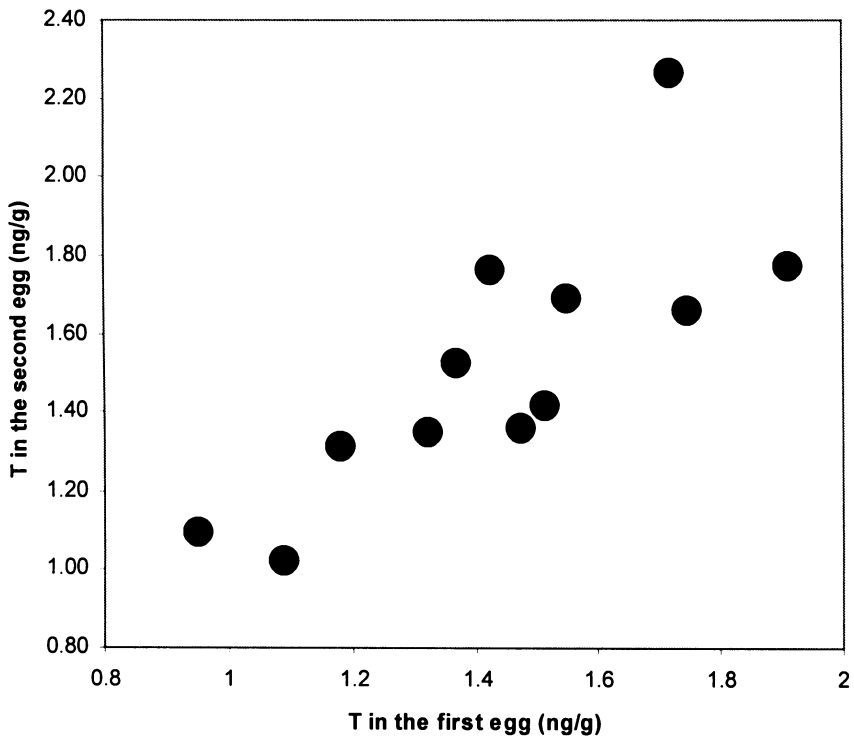
Williams TD, Ames CE, Kiparissis Y, Wynne-Edwards KE (2005) Laying-sequence-specific variation in yolk oestrogen levels, and relationship to plasma oestrogen in female zebra finches (*Taeniopygia guttata*). Proc R Soc Lond B 272:173-177

Fig. 1a,b: Scatterplot of (a) oestradiol (E2) and (b) testosterone (T) yolk levels among 12 clutches of *Paroedura picta*.

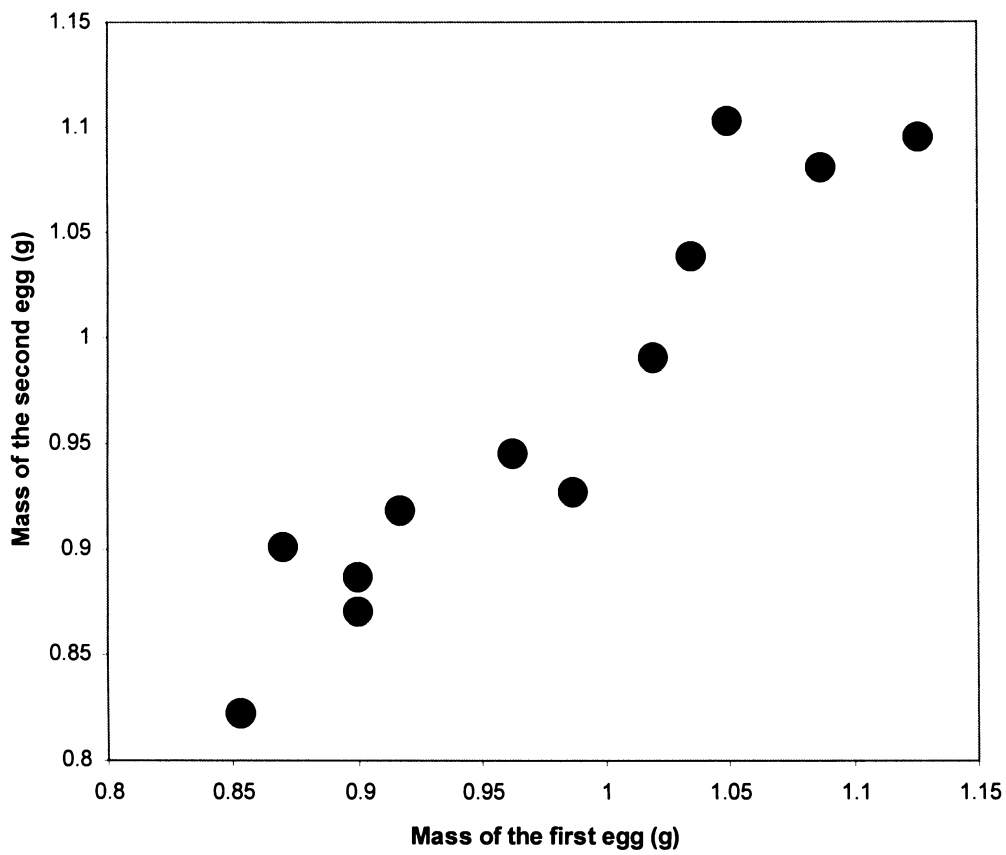
Fig. 2: *Paroedura picta* exhibit large interclutch variation in egg mass, however, eggs within a single clutch are of similar mass.



a)



b)



8.3 Třetí článek přílohy

Why reduce clutch to one or two eggs? Reproductive allometries reveal different evolutionary causes of invariant clutch size in lizards

LUKÁŠ KRATOCHVÍL^{1*}, LUKÁŠ KUBIČKA²

¹*Dept. Ecology, Charles University, Viničná 7, 128 44 Praha 2, Czech Republic*

²*Dept. Zoology, Charles University, Viničná 7, 128 44 Praha 2, Czech Republic*

**Corresponding author: Tel: +420 221951845; fax: +420 221951804;*

E-mail: lukkrat@email.cz

Short running title: *Evolution of invariant clutch size in lizards*

Summary

1. Large clutch size is unambiguously an ancestral state in reptiles. However, females of several lizard lineages lay just one or two eggs per clutch (so called invariant clutch size, ICS). Selective forces that lead to such a dramatic drop in fecundity during a single reproductive bout are still only poorly understood.
2. We compared interspecific egg and clutch mass allometries in four lizard lineages with contrasting ways of reproduction: in lacertids and sceloporines having ancestral variable clutch size (VCS), and in anoles and eublepharid geckos with independently evolved ICS. In order to reconstruct the ancestral situation in anoles more precisely, we included data on a member of the closely related genus *Polychrus*, which is also arboreal but possesses VCS.
3. We found out that the relative mass of eublepharid double-eggs clutch is comparable to the relative mass of the whole clutch in lizards with VCS. Clutch mass in both eublepharids and lizards with VCS increases proportionally to female size. On the other hand, single-egg clutches of anoles show the same negative allometry as a sole egg of lizards with VCS.
4. It appears that ICS evolved under (and is maintained by) selection on offspring enlargement in geckos, but selection on reduction of female reproductive burden in anoles, i.e. that the phenomenon of ICS apparently evolved in individual groups from different reasons.
5. Besides the extension of the knowledge of lizard life-history, the current study illustrates how we can reconstruct singular events in life-history evolution comparing ancestral and derived reproductive allometries.

Key-words: *Anolis*, allometry, egg size, gecko, life-history

Introduction

Taking into account the intraspecific variability in egg number per clutch, animals can be divided into two basic groups. Females of many species lay large clutches, where the number of eggs varies according to size and/or physical condition of an individual female (here referred to as variable clutch size, VCS). On the other hand, females of other species produce small clutches of constantly one or two eggs per a clutch (the so called invariant clutch size, ICS).

In reptiles, VCS is unequivocally an ancestral state. It occurs in crocodiles, tuataras, most turtles and squamate reptiles. ICS evolved in lizards independently more than twenty times. It is present in all anoles, all gekkotan lizards, the whole family Dibamidae and in certain members of the groups where VCS dominates, i.e. some skinks, agamids and gymnophthalmids (Shine & Greer 1991). Although some ecological correlates of the evolution of ICS (such as arboreality: Andrews & Rand 1974; Shine *et al.* 1998 or conversely fossoriality: Ashton 2005) - are well known, the selective forces that lead to such a dramatic drop in fecundity during single reproductive bout are only poorly understood.

Researchers of lizard life-history agree that natural selection favours a limited number of large clutches in a seasonal climate, particularly if the periods suitable for reproductive activities are relatively short (Tinkle, Wilbur & Tilley 1970; Andrews & Rand 1974; James & Shine 1988). However, the relationship between clutch size and climate is not straightforward and does not explain the whole pattern. Even if VCS is preferred in seasonal and ICS in aseasonal climate, many tropical lizards still possess VCS and some lizards living in strongly seasonal climate lay clutches of invariant size (e.g. Inger & Greenberg 1966; Anderson 1999).

The evolution of ICS is presumably the most theoretically elucidated in relation to miniaturisation of body size (Shine & Greer 1991). ICS in miniaturised members of the lineages with VCS probably occurs as a consequence of the widespread negative egg size allometry. It means that larger species of lineages with VCS invest the resources during the given reproductive bout into larger number of relatively small eggs, while smaller species invest into few relatively large eggs (reviewed in Kratochvíl & Frynta 2006a). Due to the ubiquitous trade-off between offspring size and number, small species are forced to produce relatively large eggs in small clutches, in extreme cases of only one or two eggs.

However, ICS does not occur solely in miniaturised lizards and not all hypotheses on the origin of ICS operate with negative egg size allometry. The ecological hypotheses trying to explain the emergence of ICS can be divided into two groups differing in the fundamental predictions. The first group considers ICS a result of the selection for reduced female reproductive burden to maintain female agility during pregnancy. It predicts smaller relative clutch mass in lizards with ICS in comparison to their ancestors with VCS. Under the arboreal hypothesis, ICS evolved in arboreal species to relieve a gravid female in the locomotory-complicated environment (Andrews & Rand 1974; Shine *et al.* 1998). Similarly, according to the predation hypothesis, ICS is the outcome of the pressure on decreasing total clutch mass as well, which should this time facilitate increased spryness during interactions with predators (Andrews & Rand 1974). On the other hand, hypotheses of the second group postulate a selection for larger offspring size. The selective agents could be, for example, size-specific predation on juveniles giving an advantage to larger hatchlings (Ashton 2005), competitive advantage of larger offspring in resource acquisition (James & Shine 1988; Ashton 2005) or the “safe harbour”. The later hypothesis expects an enlargement of investment per individual offspring in a protected environment, for instance in the presence of parental care or hard shells (Smith & Fretwell 1974, Christian &

Bedford 1993). Although the hypotheses from the second group expect larger size of individual eggs, they do not always predict an increase of relative mass of total clutch. The total clutch mass cannot actually exceed certain limits. It is, for example, naturally constrained by an isometrically increasing amount of space in the maternal body cavity (Shine 1992). This is probably the most important factor determining proportional increase of clutch mass with female mass among species of lizards with VCS. Therefore, according to the hypotheses of the second group, the relative clutch mass in lizards with ICS should be comparable to ancestral relative clutch mass of lizards with VCS.

ICS has been fixed in two large, unrelated groups of lizards: anoles and geckos. Both groups experienced intensive radiations (geckos include more than 1000 species, anoles *ca.* 350 species; Uetz 2006) with considerable diversification in body-size. The occurrence of ICS had to have a large impact on the life-history and ecology of these animals. We can speculate that it was just ICS which became a key evolutionary novelty enabling their evolutionary success. Anyway, ICS emerged early in the history of these groups. As a result, we cannot make direct observations when investigating the evolutionary causes of the emergence of ICS in geckos or anoles and we are therefore restricted to phylogenetic comparative studies. Here we try to reconstruct the evolutionary mechanisms leading to ICS in these two important reptile lineages using comparison of ancestral and derived reproductive allometries and to test how they fit the predictions of the above-mentioned hypotheses.

Material and methods

We aimed to compare the interspecific egg and clutch mass allometries in lizard lineages with contrasting ways of reproduction. The criteria for the inclusion of a lineage were 1)

sufficient variability in body size in each group allowing the determination of the allometric coefficient with adequate power; 2) comparable body sizes (as different influences can operate in animals with unmatched sizes – for this reason we omitted for example otherwise very suitable data on monitor lizards; Thompson & Pianka 2001), and last but not least, 3) the availability of reliable data on the egg and clutch mass and body size in an adequate number of species or populations. We compiled the already published and our own data in four lineages: two lineages we focused on (anoles and eublepharid geckos) possess independently evolved ICS, and two others (lacertids and sceloporines) have ancestral variable clutch size (VCS). Anoles lay only a single egg per clutch, while geckos lay usually two eggs per clutch (although secondarily miniaturised geckos lay also only one egg per clutch, but this state is derived within geckos; Doughty 1996). To reconstruct the ancestral situation in anoles more precisely, we added data on a single species of the genus *Polychrus* Cuvier, 1817, which is closely related to anoles (e.g. Cooper & Vitt 2002) and arboreal as well, but possesses VCS (Vitt & Lacher 1981). In geckos, we used only data on the family Eublepharidae, because we intended to reconstruct evolutionary causes of the origin of ICS. We thus need to consider a primitive state for the gekkotan clade and eublepharids are the basal gecko group (Kluge 1987). They share egg-shape and egg-size allometry with carphodactylid and diplodactylid geckos (Kratochvíl & Frynta 2006b). These allometries are ancestral for the whole clade Gekkota, where different, unequivocally derived allometries occur only in pygopodids and gekkonids (Kratochvíl & Frynta 2006b), the groups forming terminal branches of the gekkotan cladogram (Han, Zhou & Bauer 2004).

We gathered original data on total clutch mass, egg mass and body size from the papers by Tinkle *et al.* (1970), Tinkle & Ballinger (1972), Andrews & Rand (1974), Vitt & Lacher (1981), Dunham & Miles (1985), Bauwens & Díaz-Uriarte (1997), Schleich, Kästle

& Kabisch (1996) and Kratochvíl & Frynta (2006a,b). We included data from several different populations where available. The authors mostly presented data on mean total clutch mass and mean clutch size. In such cases (usually in sceloporines), we estimated mean egg masses as the total clutch mass divided by mean egg number per clutch. Because of the shortage of appropriate data, we were forced to use maximal female SVL for a species or population as a proxy of female body size, although we would ideally prefer a different measure. We are aware that using SVL as a measure of body size in scaling analyses could be fairly problematic (for the objectives see Thompson & Pianka 2001 and Kratochvíl *et al.* 2003). However, in our analyses we searched for the main scaling pattern, keeping in mind that subtle differences in allometric coefficients could be affected e.g. by the multiple origin of data or differences in body shape within and predominantly among lineages. Nevertheless, Shine (1992) demonstrated that anoles and geckos do not substantially differ from lizards with VCS in body shape, at least in respect to the amount of body volume available for eggs within female abdomens.

To determine the scaling of egg or clutch mass (M) on female SVL (L) among species within individual lizard lineages, we applied the power function $M = aL^b$ (Huxley 1932) in its \log_{10} -transformed form ($\log_{10} M = \log_{10} a + b \log_{10} L$). When considering isometric relationship, the expected slope (b) is 3.0 as mass increases with the third power of linear dimension (L). All allometries were analysed using an ordinary least squares linear regression model. Deviations from isometry were considered significant if the expected isometric slope fell outside the 95% confidence interval of the estimated slope. Furthermore, we employed ANCOVA (general linear model, homogeneity of slopes procedure in STATISTICA) with $\log_{10}(\text{SVL})$ as a continuous predictor, family as a categorical predictor, and $\log_{10}(\text{clutch mass})$, resp. $\log_{10}(\text{egg mass})$ as a dependent variable to test the differences among lizard clades. All calculations were performed using

STATISTICA, version 6.0 (StatSoft Inc. 2001).

A comparative analysis should not assume that the species data points are statistically independent (Harvey & Pagel 1991). Usually, certain phylogenetic comparative methods are used to control the species non-independence. However, we did not find them necessary here for the following reasons. We assume that clutch mass and egg mass are such fundamental life-history traits that their balance after the shift in body size is reached quickly and independently in every species. The phylogenetic signal in these traits should be consequently weak. Therefore, using “raw” species data when computing allometries should give the same results as any phylogenetic comparative method. The phylogenetic contrasts used separately in the previous studies involving reproductive allometries in two examined lizard lineages (lacertids: Bauwens & Diaz-Uriarte, 1997; geckos: Kratochvíl & Frynta 2006a,b) support our view: the differences between “raw” analysis and phylogenetic contrasts were in both cases minor.

Results

The allometric coefficients estimated for individual groups are shown in Table 1. Lizards with VCS (lacertids and sceloporines) and eublepharid geckos share the isometric relationship between clutch mass and body size (Table 1; Fig. 1a). Neither the slopes nor the intercepts of their allometric lines differ significantly between these clades (ANCOVA: $P > 0.30$) and the slopes do not substantially depart from 3 indicating isometry. Their clutch mass thus increases more or less in direct proportion to the female body size. Clutch mass of *Polychrus* evidently fits the same rule: the single point reflecting *Polychrus acutirostris* Spix, 1825 lies in the close vicinity of the allometric line of lacertids, eublepharids and sceloporines but far from the line of anoles (Fig. 1a). Anoles have

negative clutch-mass allometry (Table 1). Across species, their clutch mass increases much more slowly than the female body mass. As their clutch size is reduced to a single egg, their clutch-mass allometry is simultaneously an egg-mass allometry. Egg-mass allometries of anoles and lizards with VCS are similar (Table 1; ANCOVA: $P > 0.65$), and *Polychrus acutirostris* lies near these lines (Fig. 1b). In contrast, eublepharids hold broadly isometric relationship between the egg and female size (Table 1; Fig. 1b).

Discussion

Although included lineages with ancestral VCS are distantly related and underwent radiation in body size independently, they share both clutch-mass and egg-mass allometries. Lacertids belong to the clade Scleroglossa, sceloporines to the clade Iguania. Lacertids are thus more related to geckos than to sceloporines, that are relatively closely related to Polychrotidae (Cooper & Vitt 2002). Therefore, we feel quite confident that the negative egg-mass allometry and clutch mass isometry are ancestral for lizard clades.

Relative clutch mass in eublepharid geckos is similar to that of lizards with VCS (Kratochvíl & Frynta 2006a; *cf.* Fig. 1a). In eublepharids, individual egg mass increases in direct proportion to female size, whereas it come up much more slowly than female size in lizards with VCS. We can conclude that primitive geckos possess principally the same clutch-mass allometry as their ancestors, but their egg-mass allometry is derived. This pattern is congruent with the hypothesis that ICS in geckos appeared as a result of the selection on egg enlargement. Earlier references of smaller relative clutch mass in geckos than in lizards with VCS (e.g. Shine 1992) were based on the comparison of members of the family Gekkonidae, the best known and numerous group of geckos. However, as we mentioned, the gekkonid egg and clutch mass allometries were derived much later within

gekkotan radiation, probably as a consequence of the emergence of hard shells in the ancestor of this family (Kratochvíl & Frynta 2006b). Therefore, the situation in gekkonids is uninformative for the reconstruction of evolutionary causes of ICS in gekkotans.

Strictly opposite to eublepharid geckos, anoles possess ancestral egg-mass allometry, but their clutch-mass allometry is derived. In comparison to lizards with VCS, anoles have much lower relative clutch mass. Although the small relative clutch mass in anoles is well known (Andrews & Rand 1974; Shine 1992; Sinervo & Licht 1991), it was not directly compared to closely related lizards with VCS. Position of *Polychrus acutirostris* in the graph (Fig. 1) indicates, that it still has clutch-mass allometries typical for lizards with VCS. The inclusion of *Polychrus* allows us to deduce that primitive Polychrotidae turned to the arboreal way of life, but maintained ancestral reproductive features. They evolved derived clutch-mass allometry only later in their history, probably as a result of the selection for the reduced reproductive burden of females.

In summary, anoles reduced their clutches to a single egg from the clutch of lizards with VCS. In contrast, eublepharid geckos expanded their eggs (each in a single ovary) nearly up to the whole ancestral clutch with numerous eggs (Fig. 2). Our aim was to detect forepast selective regimes that led to the evolution of ICS in anoles and geckos and to illustrate how we can reconstruct singular events in life-history evolution comparing ancestral and derived reproductive allometries. We concluded that the phenomenon of ICS evolved in these individual groups for different reasons. However, our conclusions have one important flaw. We cannot unequivocally prove that the processes forming allometries observable in the present members of the clades were also responsible for the origin of ICS. ICS could have occurred for reasons that are different from those assumed from the current allometries. For example, we can imagine that ICS had evolved in a miniaturised ancestor, and stayed fixed even after increase of body size in the course of subsequent

evolution (“bottlenecking” hypothesis; Andrews & Rand 1974; Shine & Greer 1991). Nevertheless, we have some evidence (based on phylogenetic comparisons) that the ancestor of eublepharids was a middle-sized lizard (Kratochvíl & Frynta 2002; Starostová, Kratochvíl & Frynta 2005). Moreover, in contrast to the hypotheses of egg expansion in geckos and clutch-mass reduction in anoles, the hypothesis of miniaturised ancestor cannot explain the allometries observed in the recent representatives of these groups. It is more parsimonious to suppose a single mechanism involved in both the origin of ICS and the formation of the present allometries.

The interspecific reproductive allometries in primitive geckos and anoles are probably maintained by the selection on large egg mass, respectively small clutch mass. Clutch size, egg mass and clutch mass are important life-history traits, usually assumed to experience strong natural selection that should optimise their values in every particular species (e.g. Sinervo 2000). Although species changed their body size and reached their balance in the mentioned traits independently, they still fit the interspecific allometry of a given group reasonably well (Fig. 1). Moreover, the clutch-mass allometries of primitive geckos and lizards with VCS and egg-mass allometries of anoles and lizards with VCS are remarkably concordant. We cannot simply imagine why, for example, the optimal relative egg mass should be similar for lizards living in such diverse environments and having such different ways of life as sceloporines, lacertids and anoles. To us, the concordant interspecific allometries among clades indicate the important role of allometric constraints in the life-history evolution of lizards.

It seems that females of species with ancestral VCS and eublepharid geckos are selected to reach the maximal total clutch mass up to the limit constituted by the isometrically increasing accessible body volume. At least in three eublepharid species, the clutch, resp. egg mass positively correlates with female mass also intraspecifically

(Kratochvíl & Frynta 2002). Intraspecific correlations between female and egg size indicate that egg size is not optimized (otherwise both large and small females within a species should make eggs of the same – optimal - size), but constrained by female size. The same is true for the total clutch mass of lizards with VCS: within species, it increases with female body size as well (e.g. Olsson & Shine 1997).

The concordance between egg-mass allometries of lizards with VCS and anoles makes sense in the light of the existence of minimal viable egg size. The fecundity selection probably presses lizards with VCS to divide the total clutch mass onto as many viable eggs as possible. If female anoles are selected to decrease their reproductive burden and to make a clutch as often as possible, they are apparently forced to make a minimal viable egg as well. Interspecific negative allometry of propagule size has been documented in many oviparous animal clades (e.g. in spiders: Marshall & Gittleman 1994; many insects: Berrigan 1991, García-Barros 2000; fish: Blueweiss *et al.* 1978; turtles: Elgar & Heapy, 1989; snakes: Shine *et al.*, 1998; monitor lizards: Thompson & Pianka 2001; birds: Rahn, Paganelli & Ar 1975). The negative allometry in egg size is probably the results of ecological, physiological, or developmental processes constraining the minimal propagule size (Minelli 2003; Kratochvíl & Frynta 2006a). We can only speculate, why the minimal viable egg size increases with female body size. We stress the word minimal: the case of primitive geckos demonstrates that the negative relationship between maternal and egg size is not always inevitable and it is thus probably not forced by upper limits constraining egg size (such as limitation by pelvic opening or long developmental time; minutely in Kratochvíl & Frynta 2006a). It will be interesting to explore the constraints on minimal egg size in different clades and to judge whether there is any unifying principle in their formation.

Further research should also focus on the potentially simple proximate mechanisms enabling the major evolutionary changes in reproductive allometries and thus facilitating such a dramatic restructuring of life-histories. Without any doubt, shifts in their hormonal levels or in their roles are among the ‘hot candidates’. It is well known that levels of gonadotropins influence the number of maturing and ovulated follicles in lizards (e.g. Jones, Tokarz & LaGreek 1975; Sinervo 1999). Therefore, we can predict that both anoles and geckos exhibit functional alterations related to gonadotropins – they ovulate maximally just a single egg per ovary during a reproductive bout. On the other hand, the control of the amount of yolk given to an egg - in reptiles directed by steroids (e.g. Jones *et al.* 1976; Bowden *et al.* 2004) - should dramatically differ between members of these two groups with ICS. We can expect that the mechanism controlling egg size should change especially in the gecko ancestor starting to produce enormous eggs. What would be ideal for the future physiologic comparative studies are closely related animals differing in the mode of reproduction, e.g. *Polychrus* vs. anoles, or geckos vs. their relatives with VCS.

In summary, by comparing the basic reproductive allometries in four lineages of lizards with contrasting ways of reproduction, we revealed that ICS in two important lizard groups (anoles and geckos) likely emerged for different reasons. Among lizards, anoles and primitive geckos probably occupy the opposite extremes in the space of egg and/or clutch mass allometries set by the upper limit to total clutch mass and lower limit to minimal egg size. Besides the extension of our knowledge on the evolution of ICS and general lizard life-history, our study illustrates that a comparative study of ancestral and derived reproductive allometries among clades can be rather informative. In some cases, such comparisons can allow us to deduce the causes of singular events in the life-history evolution, and to reveal constraints delimitating space of different solutions to life-history issues.

Acknowledgements

We thank E. S. Roitberg, D. Frynta, K. Kutišová, and J. Červenka for stimulating discussions and comments or critical reading of former versions of the manuscript. The research was supported by the Grant Agency of the Czech Academy of Sciences (No. A6111410), institutional support was given by MSMT, project no. 0021620828.

References

- Anderson, S.C. (1999). *The Lizards of Iran*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, New York.
- Andrews, R. & Rand, A.S. (1974) Reproductive effort in anoline lizards. *Ecology* **55**, 1317-1327.
- Ashton, K.G. 2005. Life history of a fossorial lizard, *Neoseps reynoldsi*. *Journal of Herpetology* **39**, 389-395.
- Bauwens, D. & Díaz-Uriarte, R. (1997) Covariation of life-history traits in lacertid lizards: a comparative study. *The American Naturalist* **149**, 91-111.
- Berrigan, D. (1991) The allometry of egg size and number in insects. *Oikos* **60**, 313-321.
- Blueweiss, L., Fox, H., Kudzma, D., Nakashima, D., Peters, R. & Sams, S (1978) Relationships between body size and some life history parameters. *Oecologia (Berlin)* **37**, 257-272.
- Bowden, R.M., Harms, H.K., Paitz, R.T. & Janzen, F.J. (2004) Does optimal egg size vary with demographic stage because of a physiological constraint? *Functional Ecology* **18**, 522-529.

- Christian, K. & Bedford, G. (1993) High reproductive expenditure per progeny in geckos relative to other lizards. *Journal of Herpetology* **27**, 351–4.
- Cooper, W.E., & Vitt, L.J. (2002) Distribution, extant, and evolution of plant consumption by lizards. *Journal of Zoology, London* **257**, 487-517.
- Doughty, P. (1996) Allometry of reproduction in two species of gekkonid lizards (*Gehyra*): effects of body size miniaturization on clutch and egg sizes. *Journal of Zoology, London* **240**, 703-715.
- Dunham, A.E. & Miles, D.B. (1985) Patterns of covariation in life history traits of squamate reptiles: the effects of size and phylogeny reconsidered. *The American Naturalist* **126**, 231-257.
- Elgar, M.A. & Heaphy, L.J. (1989) Covariation between clutch size, egg weight and egg shape: comparative evidence for chelonians. *Journal of Zoology, London* **219**, 137-152.
- Han, D., Zhou, K. & Bauer, A.M. (2004) Phylogenetic relationships among gekkotan lizards inferred from *C-mos* nuclear DNA sequences and a new classification of the Gekkota. *Biological Journal of the Linnean Society* **83**, 353-368.
- Harvey, P.H. & Pagel M.D. (1991) *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford University Press, Oxford.
- Huxley, J. S. (1932) *Problems of relative growth*. Methuen, London.
- Inger, R.F. & Greenberg, B. (1966) Annual reproductive patterns of lizards from Bornean rain forest. *Ecology* **47**, 1007–1021.
- James, C. & Shine, R. (1988) Life-history strategies of Australian lizards – a comparison between the tropics and the temperate zone. *Oecologia (Berlin)* **75**, 307-316 1988

- Jones, R.E., Tokarz, R.R. & LaGreek F.T. (1975) Endocrine control of clutch size in reptiles. V. FSH-induced follicular formation and growth in immature ovaries of *Anolis carolinensis*. *General and Comparative Endocrinology* **26**, 354-367.
- Jones, R.E, Tokarz, R.R., LaGreek, F.T. & Fitzgerald, K.T. (1976) Endocrine control of clutch size in reptiles. VI. Patterns of FSH-induced ovarian stimulation in adult *Anolis carolinensis*. *General and Comparative Endocrinology* **30**, 101-116.
- Kluge, A.G. (1987) Cladistic relationships in the Gekkonoidea (Squamata, Sauria). *Miscellaneous Publications Museum of Zoology University Michigan* **173**, 1-54.
- Kratochvíl, L. & Frynta, D. (2002) Body size, male combat and the evolution of sexual dimorphism in eublepharid geckos (Squamata: Eublepharidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **76**, 303-314.
- Kratochvíl, L. & Frynta, D. (2006a). Body size effect on egg size in lizards with invariant clutch size: negative allometry for egg size in ectotherms is not universal. *Biological Journal of the Linnean Society*, in press.
- Kratochvíl, L. & Frynta, D. (2006b) Egg shape and size allometry in geckos (Squamata: Gekkota), lizards with contrasting eggshell structure: Why lay spherical eggs? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, in press.
- Kratochvíl, L., Fokt, M., Reháč, I. & Frynta, D. (2003) Misinterpretation of character scaling: A tale of sexual dimorphism in body shape of common lizards. *Canadian Journal of Zoology* **81**, 1112-1117.
- Marshall, S.D. & Gittleman J.L. (1994) Clutch size in spiders: is more better? *Functional Ecology* **8**, 118-124.
- Minelli, A. (2003) *The development of animal form*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Olsson, M. & Shine, R. (1997). The seasonal timing of oviposition in sand lizards (*Lacerta agilis*): why early clutches are better. *Journal of Evolutionary Biology* **10**, 369-381.
- Rahn, H., Paganelli, C.V. & Ar, A. (1975) Relation of avian egg weight to body weight. *Auk* **92**, 750-766.
- Schleich, H.H., Kästle, W. & Kabisch, K. (1996) *Amphibians and reptiles of North Africa*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Shine, R. (1992) Relative clutch mass and body shape in lizards and snakes: is reproductive investment constrained or optimized? *Evolution* **46**, 828-833.
- Shine, R. & Greer, A.E. (1991) Why are clutch sizes more variable in some species than in others? *Evolution* **45**, 1696-1706.
- Shine, R., Keogh, S., Doughty, P., Giragossyan, H. (1998) Costs of reproduction and the evolution of sexual dimorphism in a "flying lizard" *Draco melanopogon* (Agamidae). *Journal of Zoology, London* **244**, 203-213.
- Sinervo, B. (1999) Mechanistic analysis of natural selection and a refinement of Lack's and Williams's principles. *The American Naturalist* **154**, S26-42.
- Sinervo, B. (2000) Adaptation, natural selection, and optimal life-history allocation in the face of genetically based tradeoffs. *Adaptive genetic variation in the wild* (eds T. A. Mousseau, B. Sinervo & J.A. Endler), pp. 41-64. Oxford University Press, Oxford.
- Sinervo, B. & Licht, P. (1991) Proximate constraints on the evolution of egg size, number, and total clutch mass in lizards. *Science* **252**, 1300-1302.
- Smith, C.C. & Fretwell, S.D. (1974) The optimal balance between size and number of offspring. *The American Naturalist* **108**, 499-506.
- Starostová, Z., Kratochvíl, L. & Frynta, D. (2005) Dwarf and giant geckos from the cellular perspective: The bigger the animal, the bigger its erythrocytes? *Functional Ecology* **19**, 744-749.

StatSoft, Inc. (2001) STATISTICA, vers. 6.0. www.statsoft.com

Thompson, G.G. & Pianka, E.R. (2001) Allometry of clutch and neonate size in monitor lizards (Varanidae: *Varanus*). *Copeia* **2001**, 443-458.

Tinkle, D.W. & Ballinger, R.E. (1972) *Sceloporus undulatus*: a study of the intraspecific comparative demography of a lizard. *Ecology* **53**, 570-584.

Tinkle, D.W., Wilbur, H.M. & Tilley, S.G. (1970) Evolutionary strategies in lizard reproduction. *Evolution* **24**, 55-74.

Uetz P. (2004) EMBL reptile database. <http://www.reptile-database.org>

Vitt, L.J. & Lacher, T.E. (1981) Behavior, habitat, diet, and reproduction of the iguanid lizard *Polychrus acutirostris* in the Caatinga of northeastern Brazil. *Herpetologica* **37**, 53-63.

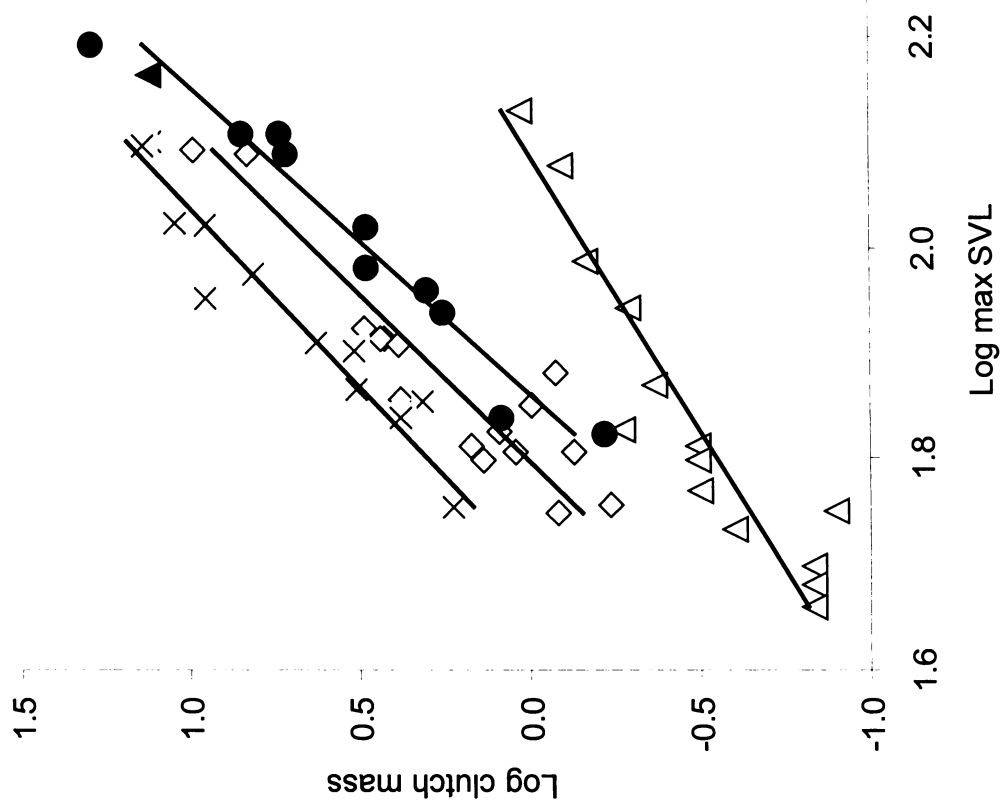
Table 1. Coefficients of interspecific regression of egg and clutch mass on adult female SVL based on \log_{10} -transformed data (means \pm S. E. are given). All regressions are highly significant ($P < 0.00001$ in all cases). Intercepts significantly deviating from isometry, i.e. expected 3.0, are highlighted with asterisks.

	<u>Clutch mass allometry</u>			<u>Egg mass allometry</u>			No. of cases
	<i>r</i>	Intercept	Slope	<i>r</i>	Intercept	Slope	
Lacertids	0.92	-6.187 \pm 0.683	3.428 \pm 0.364	0.82	-3.302 \pm 0.315	1.521 \pm 0.168*	16
Sceloporines	0.96	-4.970 \pm 0.513	2.927 \pm 0.264	0.74	-3.665 \pm 0.999	1.776 \pm 0.514*	12
Eublepharids	0.97	-6.398 \pm 0.564	3.435 \pm 0.281	0.97	-6.699 \pm 0.564	3.435 \pm 0.281	10
Anoles	0.90	-3.789 \pm 0.505	1.806 \pm 0.270*	0.90	-3.789 \pm 0.505	1.806 \pm 0.270*	14

Fig. 1. Allometries of a) clutch mass and b) egg mass in four lizard lineages. Lines represent the ordinary least square regression for a given clade. Legend: empty triangles – anoles; filled triangles – *Polychrus acutirostris*; circles – eublepharid geckos; squares – lacertids; crosses – sceloporines.

Fig. 2. Simplified schema of the probable evolution of invariant clutch size in anoles and geckos. Two eggs in a clutch of eublepharid increase up nearly to the size of the whole clutch in lizards with variable clutch size. Contrarywise, anoles reduced their clutch to a single egg of the size of a sole egg of lizards with variable clutch size. For simplicity, cross-point of axes is not (0,0).

a)



b)

