

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
Katedra zoologie



České Budějovice 2009

Ontogenetický vývoj *os penis* a přítomnost *os clitoridis* u vybraných druhů hlodavců

Magisterská diplomová práce



Jitka Sovová

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Robovská, Ph.D.

Odborný konzultant: Mgr. Jan Robovský

Magisterská diplomová práce

Sovová, J., 2009: Ontogenetický vývoj *os penis* a přítomnost *os clitoridis* u vybraných druhů hlodavců [Ontogenetic development of *os penis* and distribution of *os clitoridis* in selected species of rodents] - 33 pp., Department of Zoology, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This study is focused on a bacular development in *Microtus arvalis*, histological sections in two species of voles for the detection of a presence of *os clitoridis*, and description of an *os clitoridis* in *Sciurus vulgaris*. In the last part, there is the penile morphology and bacular structure of one species of African mole rat (*Heliophobius argenteocinereus*) described.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

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

V Českých Budějovicích dne 5. 1. 2009

Jitka Sovová

Velké poděkování patří Pavle a Honzovi za jejich pomoc a trpělivost, se kterou se mi věnovali. Dík patří také hlavně Kláře Šíchové a Radimovi Šumberovi za to, že mi dodali potřebný materiál, Věře Řičánkové za drobné, ale důležité rady a Simoně (Kazi) Polákové za pomoc s grafy. A samozřejmě nesmím zapomenout na své rodiče, za jejich trpělivost a porozumění.

OBSAH

1. Úvod.....	3
1.1. Co je bakulum a <i>os clitoridis</i>	3
1.1.1. Určování věku.....	5
1.1.2. <i>Os clitoridis</i>	6
1.1.3. Penis a bakulum rypošů.....	7
2. Cíle práce.....	9
3. Materiál a metodika.....	9
4. Výsledky.....	12
4.1. Vývoj bakula u hrabošovitých.....	12
4.2. Výskyt <i>os clitoridis</i> u studovaných samic.....	17
4.2.1. Histologické řezy.....	17
4.2.2. Popis <i>os clitoridis</i> veverky obecné.....	18
4.3. Popis penisu a bakula rypoše stříbřitého.....	19
5. Diskuze.....	20
5.1. Vývoj bakula hraboše polního.....	20
5.1.1. Rozdělení do věkových tříd.....	20
5.1.2. Metody popisu růstu bakula.....	21
5.1.3. Vliv doby narození na růst bakula.....	22
5.2. <i>Os clitoridis</i>	22
5.2.1. Výskyt <i>os clitoridis</i> u hrabošovitých.....	22
5.2.2. <i>Os clitoridis</i> veverkovitých.....	26
5.3. Penis a bakulum rypošů.....	27
6. Závěry.....	28
7. Literatura.....	29

1. Úvod

1.1. Co je bakulum a os clitoridis

Os penis neboli bakulum je poměrně variabilní element umístěný uvnitř distální části žaludu (*glans penis*) dorzálně k močové trubici (*urethra*) a s bází napojenou na kavernózní těleso penisu (*corpus cavernosum*). Vyskytuje se různě napříč celou skupinou savců, a to u těchto skupin: hlodavců (Hooper & Hart, 1962; Lidicker, 1968), některých „hmyzožravců“ (Tenrecidae, Eulipotyphla) (Gilbert, 1892; Jellison, 1945; Kaudern, 1910; Simokawa, 1938), letounů (Hosken et al., 2001; Smirnov & Tsitsulina, 2003), letuch (Starck, 1995), většiny primátů (Geissmann & Limm, 1994; Hobday, 2000) a šelem (kromě hyen a některých cibetek) (Baryshnikov et al., 2003; Dixson, 1995; Lönnberg, 1902). Kromě těchto skupin je bakulum ještě uváděno u vombata (Bolk & al., 1933) a také bylo zaznamenáno u jednoho samce velryby biskajské (*Eubalaena glacialis*) (Turner, 1913), kde šlo ale spíše o patologický jev kvůli nepřítomnosti u žádných jiných kytovců. Tuto kost, kterou prvně označil jako „baculum“ Thomas v roce 1915, ale zaznamenal u některých šelem již Aristoteles (Jellison, 1945).

Funkce bakula zatím nebyla plně objasněna, ale je zřejmě u jednotlivých skupin různá a zabývalo se jí několik zajímavých studií: zdá se, že tato kost má funkční roli při kopulaci, je tedy předmětem přímé selekce, a je proto považována za adaptivní znak (Patterson & Thaeler, 1982). Tato hypotéza je podporována anatomickými daty ze studie mutantních myší *Hoxd-13*. Mutantní samice jsou fertillní, ale samci, i když normálně kopulují, nejsou schopni zplodit potomstvo. Mají totiž zdeformované bakulum, což naznačuje, že k úspěšnému oplodnění samice je třeba buď specifický tvar bakula nebo nějaká bakulární aktivita během kopulace (Patterson & Thaeler, 1982). Bakulum může také hrát důležitou roli v reprodukci tím, že poskytuje mechanickou oporu a ochranu močové trubice během kopulace. Může také sloužit jako klín k otevření vaginálního traktu samice a usnadnit tak proniknutí penisu do vagíny (Kelly, 2000). Bakulum může také stimulovat samici vyvoláním neuroendokrinní odpovědi, která buď zvýší transport spermií, indukuje ovulaci nebo připravuje dělohu pro implantaci (Kelly, 2000; Patterson & Thaeler, 1982). Bakulum může také poskytovat samicím informace o kvalitě samce během páření (Dixson, 1987, 1995; Dyck & al., 2004).

Pro porozumění evoluci a funkci bakula lze také porovnat jeho relativní velikost, růst a variabilitu. Např. samice ve vodním prostředí se pářících ploutvonožců (tj. tulení,

Phocidae) se páří opakovaně několik dní s jedním nebo více samci, kteří mají dlouhé a jednoduché bakulum a jehož funkcí je zřejmě umožnit co nejhlubší uložení spermatu a tím znesnadnit jeho vyplavení. Naopak samice terestricky se rozmnožujících ploutvonožců (tj. lachtani, Otariidae) se obvykle páří pouze jednou za den a samci mají podstatně menší bakulum, které má složitější distální konec (Dyck & al., 2004).

Bakulum vzniká endochondrální osifikací, tedy z chrupavčitého základu, který tvarově zhruba odpovídá budoucí kosti (Deveci, 1998; Glucksmann, 1976). Předpokládalo se, že by mohlo také jít o podobně izolovanou kost jako je *os cordis* v srdci skotu a *os diaphragmatis* u velblouda (Ruth, 1934 in Jellison, 1945). Existuje i teorie o možné homologii bakula s vakovými kostmi vačnatců, které vznikají také endochondrálně. Někteří autoři (např. Jellison, 1945) se domnívají, že tato homologie je naznačena vývojovými stádii u rodu *Canis*, kde se bakulum začíná vyvíjet jako dva zřetelné boční proutky velmi podobné velikostí a tvarem vakovým kostem u bandikuta (*Perameles* sp.), které se později spojují do jediné silné kosti. Také u některých dalších savců je naznačeno původní rozdělení kosti na dvě části (Scheffer, 1942 – *Aplodontia*: Aplodontidae). Ovšem vzhledem k tomu, že se takový vývoj *os penis* vyskytuje jen u některých izolovaných rodů, půjde patrně spíše o konvergenci.

Morfologicky je bakulum jednou z nejrozmanitějších savčích kostí. V posledních zhruba šedesáti letech se tato kost úspěšně uplatnila v taxonomii několika savčích skupin či při hledání fylogenetických vazeb mezi některými druhy-rody (např. Altuna & Lessa, 1985; Anderson, 1960; Hooper & Hart, 1962; Lidicker, 1968; Simson & al., 1993). Je to dáno tím, že se jeho velikost, tvar a stavba často zřetelně liší mezi druhy a v některých případech i poddruhy (např. Altuna & Lessa, 1985 – *Ctenomys*: Octodontidae). Dále může bakulum sloužit také jako relativní kritérium pro zjištění věku jedinců z volné přírody, alespoň u některých druhů. Délka, hmotnost a objem této kosti jsou použitelné také pro zjištění sociality a věku u hlodavců, šelem a snad i letounů, přinejmenším v průběhu dospívání (např. Elder & Shanks, 1961; Morris, 1972; Zejda & Hrabě, 1973).

U některých druhů je přítomna podobná kost také v klitorisu samic. Bakulum a *os clitoridis* (neboli *baubellum*) jsou s největší pravděpodobností homologické struktury se srovnatelným vývojem a osifikací (Murakami & Mizuno, 1984). Na rozdíl od bakula ale není variabilita *os clitoridis* tak výrazná a její využití z taxonomického a fylogenetického hlediska je tak zřejmě velmi omezené (Layne, 1952; Zeigler, 1960).

1.1.1. Určování věku

Přesné určení věku je důležité pro porozumění mnoha aspektům života zvířete. Bez údaje o věku nemůžeme určit rychlost růstu, dobu dosažení dospělosti, délku trvání života a celý řadu faktorů životních zájmů jedince i druhu (Morris, 1972).

U některých zvířat mohou být přesná data získána v laboratorních podmínkách či z chovu v lidské péči (zoologické zahrady, hospodářské chovy), kde jsou jedinci pod kontrolou od narození do smrti. To samozřejmě neplatí pro volně žijící savce, a proto u nich musíme použít jiné způsoby jak přibližně určit jejich věk. K tomu existují různé metody, spolehlivé i méně přesné (Morris, 1972).

K často používaným metodám patří např. míra opotřebování zubů, určování růstových zón u zubů, lebeční švy, postup růstu a osifikace některých kostí - to je ostatně i případ bakula (Morris, 1972). Na možné použití bakula jako prostředku rozlišení věku u některých druhů savců bylo poukázáno vlastně jen v několika studiích, pokud zohledníme druhovou rozmanitost savčích skupin s bakulem. U hlodavců jsou to např. Arata et al., (1965); Hrabě, (1972); Zejda & Hrabě, (1973), dvěma druhům letounů se věnovali Smirnov & Tsytsulina, (2003) a několik studií se zabývalo také šelmami, např. Miller et al., (2000); Oosthuizen, (2000); Walton, (1968). U dalších skupin (např. primáti) nebylo toto téma ještě dostatečně studováno.

Bakulum a *corpus cavernosum*, se kterým je svou bází pevně spojeno, vznikají ze stejné mezenchymální tkáně (Glucksmann, et al., 1976; Murakami & Mizuno, 1984). U některých myšovitých a hrabošů je bakulum tvořeno ze dvou vývojově odlišných částí - proximální a distální. Hrot proximální části je tvořen kostní strukturou pokrytou hyalinní chrupavkou a distální část tvoří vláknitá chrupavka (Glucksmann, et al., 1976; Murakami & Mizuno, 1984). Proximální začíná osifikovat několik dní po narození. Distální část často osifikuje až před dosažením dospělosti, např. u *Microtus montanus* se objevuje osifikace těchto tří prstů až po 35 dnech života a jejich růst v podstatě končí v 50 - 60 dnech (Arata et al., 1965). Dochází k celkovému prodlužování, zesilování hlavně v bází a tvarové diferenciaci kosti. Postnatální růst bakula a jeho osifikace je závislá na androgenech, kost se nevyvíjí bez indukce testosteronu (Murakami, 1986). Růstové změny bakula mohou být kvalitativně využity pro rozdělení zvířat do věkových tříd na mladé (juvenile), dospívající (adolescent, subadult) a dospělé (adult) (např. Arata et al., 1965; Morris, 1972; Zejda & Hrabě, 1973).

Vývoj bakula je ale u některých druhů ovlivněn obdobím jejich narození. Např. u norníka rudého (*Myodes glareolus*) byla zjištěna odlišná rychlost růstu u jedinců

narozených v různých ročních obdobích. Nejrychlejší vývoj bakula byl pozorován u členů jarní kohorty (samci narození v období března až květen). Růst bakula byl u nich v podstatě ukončen ve věku přibližně 1,5 měsíce, kdy už měli osifikované distální části. Další růst bakula byl pak velmi pomalý a závisel na trvání období sexuální aktivity jedince. Členové letní kohorty (narození v červnu až srpnu) vykazovali vysokou variabilitu v rychlosti růstu bakula a záleželo na době vstupu do reprodukce. Pokud byli sexuálně aktivní již v roce svého narození, pak vykazovali podobný vývoj bakula jako členové jarní kohorty. U některých se, společně se členy podzimní kohorty (září a později), vývoj této kosti víceméně zastavil v dospívající fázi, tedy s nápadně štíhlým šípem a málo rozšířenou bází. U některých jedinců zůstával v juvenilním stavu, tedy bez vyvinutých distálních výběžků a celá kost se plně osifikovala až následující rok na jaře. Celý výzkum byl prováděn na zvířatech chycených ve volné přírodě (Zejda & Hrabě, 1973).

Já jsem se zajímala především o růst bakula ve vztahu ke známému věku jedince a chtěla jsem vědět, zda se dají zařadit do několika věkových kategorií podobně jak to provedli Zejda & Hrabě (1973). Proto jsem se zaměřila na zvířata chovaná v zajetí, u kterých je přesně znám jejich věk, a cílem bylo zjistit, zda má také vliv období jejich narození. Také bych chtěla prověřit přesnost metody dosud využívané u hrabošovitých hlodavců pro výpočet celkové plochy bakula, tzv. bakulárního indexu.

1.1.2. *Os clitoridis*

Bakulum bylo již mnohokrát popsáno a jeho hodnota jako systematického a věkového kritéria byla potvrzena (např. Breed, 1986; Hooper & Hart, 1962). Ovšem o samičím protějšku této kosti, *os clitoridis*, existuje pouze málo záznamů (Layne, 1954). Distálně se klitoris savců skládá ze tří tkáňových laloků, které jsou homologické s místem, kde se zakládají u některých hlodavců tři distální výběžky bakula (Arata et al., 1965). Právě zde se někdy vytváří *os clitoridis* (např. u ondatry, hrabošů r. *Microtus* - Arata et al., 1965) tvořená stejně jako prstovité výběžky bakula vláknitou chrupavkou (Arata et al., 1965), která může za určitých okolností osifikovat (Zeigler, 1960). U některých skupin může být tato kost umístěna více proximálně a má poměrně stálý tvar a velikost (např. u křečka zlatého - Arata et al., 1965; Callery, 1951; veverka - Layne, 1954) a je histologicky identická s proximální částí bakula, která i svým uložením v proximální části klitorisu potvrzuje tuto homologii (Arata et al., 1965). *Os clitoridis* tedy také vzniká endochondrální osifikací (t.j. osifikací chrupavky) (Deveci et al., 1998; Glucksmann, 1976). Na rozdíl

od bakula je tato kost téměř vždy jednoduchá, tyčinkovitá, s případnými výběžky na vrcholu a mírným rozšířením v bázi. Její variabilita není nijak závratná a tento element se nevyskytuje se u všech druhů, které mají bakulum, dokonce ani u všech jedinců (např. Layne, 1952; Ziegler, 1960). U hlodavců byl výskyt *os clitoridis* zaznamenán u bobrušek (Scheffer 1942), veverek (Layne, 1952, 1954; Simokawa, 1938), pytlonošů (Layne, 1954), některých hrabošů (Ziegler, 1960), křečků (Arata et al., 1965; Callery, 1951; Simokawa, 1938), některých myšovitých (např. Arata et al., 1965; Elder & Shanks 1961; Simokawa, 1938), rypošů (Thomas, 1917 in Layne, 1954), dikobrazů (Gilbert, 1892) a morčat (Simokawa, 1938). Veverkovití jsou jedny z mála savců, u kterých se vyskytují klitoridové kosti vždy (kromě *Tamiasciurus hudsonicus*), přičemž platí, že jde v podstatě o zmenšenou verzi bakula (Layne, 1954). O její adaptivní funkci není zatím nic známo, i když podle jednoho názoru se můžou výběžky této kosti spojit s penisovou tkání během kopulace (Meczynski, 1974 in Patterson & Thaeler, 1982).

Oproti *os penis* je *os clitoridis* logicky nepoměrně méně uplatňovaná v systematice či pro určení věku. Ačkoliv u některých skupin mají asi taxonomicky-fylogenetickou významnost (veverky a syslové) (Layne, 1954), u jiných je její využití díky nestálé přítomnosti minimální (např. u hrabošů) (Ziegler, 1960) nebo je tak malá, že zřejmě uniká pozornosti.

Os clitoridis jsem se snažila najít s pomocí diferenciálního barvení chrupavky a kosti u několika druhů hlodavců (*Myodes glareolus*, *Microtus agrestis*, *M. arvalis* a u rodu *Apodemus*) už ve své bakalářské práci. Tento způsob, který se tak dobře osvědčil v případě samců, nepřinesl u samic žádné pozitivní výsledky, proto jsem se rozhodla pro jemnější a detailnější metodu, a to histologické řezy. Hraboše (*M. arvalis* a *M. bradti*) jsem vybrala na základě možnosti jejich odchovu v laboratorních podmínkách s cílem získat samice různého věku, protože výskyt *os clitoridis* může být na věku nezávislý (Ziegler, 1960).

1.1.3. Penis a bakulum rypošů

Genitální anatomie všech samců je velice složitá a často vysoce mezidruhově variabilní (Burt, 1960). Taková variabilita vychází z přirozené a sexuální selekce, která je hlavní silou řídící evoluci samčích genitálií a může poskytnout informace o ekologii a chování druhů (Hosken & Stockley, 2003; Lidicker, 1968). U samců se může vyvíjet komplikovanější morfologie penisu, která funguje jako efektivní stimulant samice. Je tedy

zřejmé, že penisové trny a jiné ornamenty můžou indukovat ovulaci samice stimulací vagíny (Altuna & Lessa, 1985) a mohou mít tedy adaptivní hodnotu zvláště u soliterních zvířat, kde se partneři setkávají jen na krátké období (Parag et al., 2006). Tak je tomu např. u soliterně žijícího tukotuko Pearsonova (*Ctenomys pearsoni*), jehož *glans penis* je hustě pokryt malými trny (Altuna & Lessa, 1985). Podobně soliterně žijící rypoši - rypoš prasečí (*Bathyergus suillus*) a rypoš kapský (*Georychus capensis*) mají také mnohem větší množství epidermálních trnů na penisu, než podobně zkoumaní sociální rypoš hotentotský (*Cryptomys hottentotus natalensis*) i eusociální rypoš damarský (*Fukomys damarensis*) a rypoš lysý (*Heterocephalus glaber*) (Parag et al., 2006). Podobně jako trny na penisu, může i bakulum sloužit jako efektivní stimulant k indukování ovulace u samic (Altuna & Lessa, 1985; Larivière & Ferguson, 2002). Jeho další možné funkce jsou uvedeny výše. Nejen bakulum, ale i celý žalud (*glans penis*) se pro zoology stává zdrojem informací a může pomoci v odlišení blízce příbuzných druhů a sloužit jako zdroj znaků při hledání fylogenetických vztahů hlodavců (Lidicker, 1968), ale i jiných skupin (např. Dixson, 1987; Lüpold et al., 2004).

Bakulární a penisovou morfologií se u rypošů zabýval pouze Parag et al., (2006), a to u pěti druhů (viz výše). Zabýval se zvláště vztahem penisové morfologie k pářicím strategiím, metodám ovulace a stupněm sociality u těchto druhů. Zajímal se také o otázku, zda relativní velikost bakula je spojena s ornamentací penisu. Právě na jeho výsledky chci navázat, prověřit jeho předpoklady a doplnit o poznatky u rypoše stříbřitého (*Heliophobius argenteocinereus*).

2. Cíle práce

Výsledkem této práce má být splnění následujících úkolů:

- popsat průběh vývoje bakula u vybraných druhů hrabošů
- najít známky přítomnosti *os clitoridis* u vybraných druhů hlodavců
- popsat vnější morfologii *glans penis* a bakula u rypaše stříbřitého (*Heliophobius argenteocinereus*)

3. Materiál a metodika

Pro vytvoření ontogenetické řady bakula bylo získáno 30 samců hraboše polního (*Microtus arvalis*) a 19 samců hraboše sýslího (*M. brandtii* nebo *Lasiopodomys brandtii*) z chovů katedry zoologie PřF JU v Českých Budějovicích. Pro práci byli nakonec použiti pouze samci hraboše polního, protože nebylo možné vždy zajistit hraboše sýslí v určeném věku. Tento druh se rozmnožuje sezónně a mláďata byla využívána k jiným, hlavně etologickým výzkumům. Oproti tomu hraboš polní se v laboratorních podmínkách úspěšně rozmnožuje celý rok, takže nebyl problém získat poměrně dost samců v potřebném věku.

Vzorky jsem odebírala tak, aby byli samci od sebe věkově vzdáleni minimálně týden a počet vzorků daného věku se pohyboval od jedné do čtyř. U samců se měřily standardní rozměry (délka těla, ocasu, zadní tlapky, výška ušního boltce a délka a šířka varlat – viz Anděra & Horáček, 1982) a následně se odebral celý penis a byl uložen v 10% formaldehydu. Před začátkem barvení byly vzorky dehydratovány minimálně 24 hod v 95% ethanolu, a pak byl použit mírně modifikovaný postup podle Wassersuga (1976) (snížila se koncentrace KOH a čas, protože jde o velmi malé vzorky). Chrupavčité části byly obarveny alciánovou modří (400 ml ledové kyseliny octové, 600 ml 95% ethanolu a 10-30 mg alciánové modří) a osifikované části alizarinem Red S (nasycený roztok v ethanolu). Hotové vzorky byly umístěny do čistého glycerolu, pro dlouhodobější uchování a dílčí výzkum (zvětšení binokulární lupou, fotografování, apod.).

K určení rozdílů ve velikosti bakula byla použita jednak celková délka kosti a potom tzv. bakulární index (bi) (Arata et al., 1965; Hrabě 1972; Zejda & Hrabě, 1973) odrážející zjednodušenou plochu bakula: $bi = (A * B) + (X * Y)$, kde A je délka proximální části, B je šířka báze, X je délka středního distálního výběžku a Y je délka bočního distálního výběžku, viz obr. č. 1)



Obr. č. 1. Schematický nákres bakula hraboše polního (*Microtus arvalis*)

Skutečnou plochu bakula jsem následně určila s pomocí programu ImageTool, který umožňuje vypočítat ohraničenou plochu fotografie podle zadaného měřítka.

Pro zjištění přítomnosti *os clitoridis* bylo použito 7 samic hrabošů (hist. řezu), z toho 3 hraboši polní (*Microtus arvalis*) a 4 hraboši syslí (*M. brandtii*) z chovů PřF JU, a 1 veverka obecná (*Sciurus vulgaris*) (dif. barvení) z vlastní sbírky, která představovala ve své podstatě referenční vzorek, protože veverkovití hlodavci jsou známí pravidelným výskytem bakula a *os clitoridis* (Layne, 1954). Vzorke určené k histologickým řezům byly vybírány namátkou, ale tak, aby mezi nimi byly samice starší i mladé, samice které ještě neměly potomky i ty po několika porodech, protože výskyt *os clitoridis* bývá u některých druhů nepravidelný a největší kost se nemusí vždy vyskytnout u nejstarší samice (Rinker, 1944). Použit u samic histologické řezu jsem se rozhodla na základě své bakalářské práce, kde jsem pro obě pohlaví použila pouze diferenciální barvení.

Všechny samice byly změřeny (délka těla, ocasu, zadní tlapky, výška ušního boltce a délka a šířka vaječnicků, případně i embryí – viz Anděra & Horáček, 1982) a byl jim odebrán klitoris, který byl uložen do 10% formaldehydu. Vzorke pro histologické řezu musely nejprve projít kvůli dostatečnému odvodnění vzestupnou řadou roztoku ethanolu (70, 80, 96%), aby se zabránilo smrštění tkáně. Po odvodnění se vzorky prosycovaly xylenem, a pak byly přemístěny do bločku rozehřátého parafínu, který se nechal ztuhnout. Pro nařezání vzorků o tloušťce 7 μm . byl použit sáňkový mikrotom. Před barvením bylo nutné řezu odparafinovat v xylenu, a pak byly přenášeny sestupnou řadou ethanolů (96, 80, 70%) až do vody vždy po pěti min. Následný postup barvení byl:

- alciánová modř (1000 cm^3 70% alkoholu, 1 g alciánové modři) 50 min.
- destilovaná H_2O 1 min.

- Mayerův hematoxylin (1000 cm³ destilované vody, 1 g krystalického hematoxylinu, 0,2 g KIO₃, 50 g KAl(SO₄)₂, 1 g C₆H₈O₇ a 50 g CCl₃CHO) 2 min.,
- destilovaná H₂O 1 min.,
- kyselý alkohol několik s
- praní v tekoucí vodě 10 min.
- eosin (10 cm³ nasyceného vodného roztoku kyseliny pikrové, 10 cm³ absolutního alkoholu, 80 cm³ destilované vody) 15 min.

Potom následovalo opět projasnění řezů v 96 a 100% alkoholu na 2-5 min. a nakonec do xylenu na stejnou dobu. Po projasnění se řezy uzavíraly kanadským balzámem a přiloženým krycím sklíčkem. Hotový preparát se pak několik dní sušil, aby balzám dostatečně utuhl. Preparáty byly nakonec pozorovány pod mikroskopem a vyfotografovány.

Veverka byla barvena podle upravené metody Wassersuga (1976), viz výše. Obarvená kost pak byla vypreparována z měkkých tkání a vyfotografována.

Zkoumaní rypoši stříbřítí (*Heliophobius argenteocinereus*) byli získáni ze sbírek Dr. Radima Šumbery, který se rypoši na PřF JU dlouhodobě zabývá. Celkem 13 samců bylo změřeno (délka těla, ocasu, zadní tlapy a délka a šířka varlat – cf. Anděra & Horáček, 1982) a následně pitváno pro odběr penisů, které byly uloženy v 10% formaldehydu. Vzorky byly dehydratovány v 95% ethanolu po dobu minimálně 24 hod. Pro barvení tkáně jsem pak použila mírně modifikovaný postup podle Wassersuga (1976) (viz výše).

V průběhu tohoto odbarvování byl celý penis (konkrétně *glans penis*) vyfotografován z ventrální, laterální a dorzální strany pro vizualizaci případných dílčích charakteristik penisu (složitost *glans penisu*, velikost rohovitých háčků apod.). Pro rychlejší odbarvení byla použita silnější koncentrace KOH (5%), případně byl opakován celý postup odbarvování. Hotové vzorky byly uloženy do čistého glycerolu. Kost byla pozorována přes měkké tkáně pomocí binokulární lupy a vyfotografována z dorzální a laterální strany.

4. Výsledky

4.1. Vývoj bakula u hrabošovitých

Ze 30 jedinců hraboše polního se mi bakulum u 3 jedinců neobarvilo, pravděpodobně v důsledku dlouhodobého projasňování, protože jsem odbarvovací postup musela kvůli neprůhlednosti měkkých tkání opakovat. Tvar bakula je přesto v tkáni patrný, bakulum pouze není dostatečně obarvené.

Postup osifikace a růst dílčích částí bakula je v tabulce č. 1. Jsou zde zaznamenány velikosti jednotlivých částí bakula (v mm) pro daný vzorek hrabošů určitého známého věku. Velikost částí bakula u jednotlivců je uveden ve formě rozptylu a průměru.

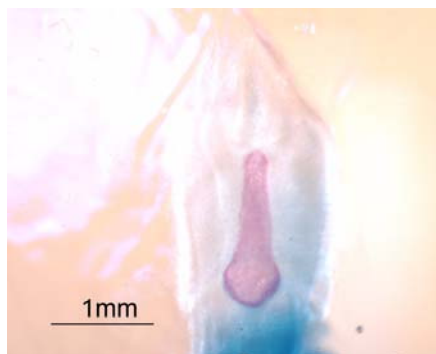
věk (dny)	10	20	28	35	42	55	63	81	91	110	150
počet vzorků	(3)	(2)	(1)	(2)	(2)	(3)	(3)	(3)	(4)	(1)	(3)
průměrná délka šípů	-	1,50	1,90	1,80	2,30	2,00	2,10	2,10	2,20	2,30	2,40
průměrná délka středního výběžku	-	-	-	0,90	0,80	0,90	1,00	1,10	1,10	0,80	0,80
průměrná délka postranního výběžku	-	-	-	0,40	0,50	0,50	0,70	0,80	0,90	0,50	0,70
celková délka bakula (průměr a rozptyl)	-	1,50 (1,49- 1,52)	1,90 (1,90)	2,90 (2,87- 2,93)	3,20 (3,10- 3,29)	3,00 (2,89- 3,10;)	3,30 (3,28- 3,31)	3,40 (3,35- 3,43)	3,40 (3,38- 3,42)	3,50 (3,50)	3,50 (3,49- 3,50)

Tab. č. 1. Postup osifikace u 27 hrabošů polních a délka jednotlivých úseků bakula (mm). Velikosti jednotlivých elementů se u jedinců stejného věku lišily pouze o setiny mm.

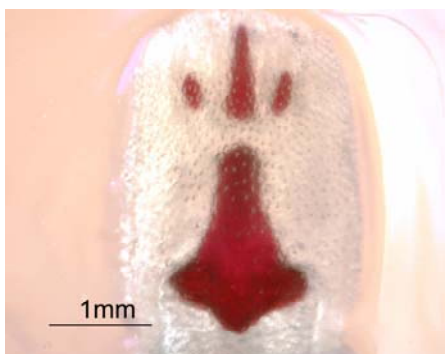
Diferenciální barvení ukázalo, že už krátce po narození má samec chrupavku ve tvaru budoucího bakula bez distálních výběžků a brzy začíná také osifikace. Z tabulky č.1. vyplývá, že ve 20 dnech věku je již větší část středu chrupavčitého šípů osifikovaná a se vzrůstajícím věkem osifikace postupuje k opačným koncům. Proximální část dále roste a nejvýraznější změna je patrná hlavně v její bázi, která se postupem času výrazně rozšiřuje a mohutní. V distální části jako první osifikuje střední prst a později se objevují oba boční, které jsou viditelné ve věku 35 dní. Přestože hraboš polní může být pohlavně aktivní už měsíc po narození (Hayssen et al., 1993), velikost jeho bakula i nadále mírně roste (obr. č. 2-8).



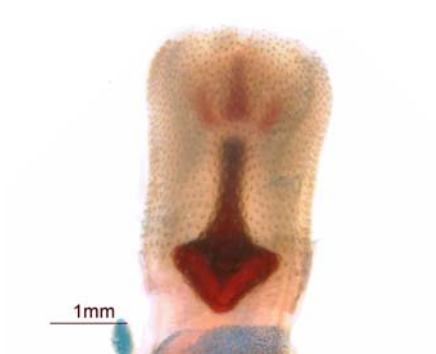
obr. č. 2 - 10 dní (LC = 63,30mm)
dorzální pohled



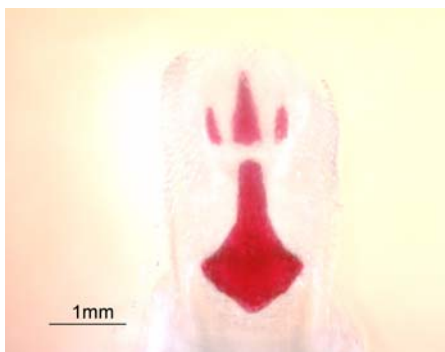
obr. č. 3 - 20 dní (LC = 56,10 mm)
dorzální pohled



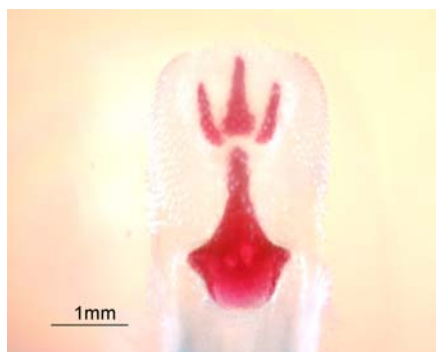
obr. č. 4 - 35 dní (LC = 83,50 mm)
dorzální pohled



obr. č. 5 - 42 dní (LC = 87,94mm)
dorzální pohled



obr. č. 6 - 55 dní (LC = 102,10mm)
dorzální pohled

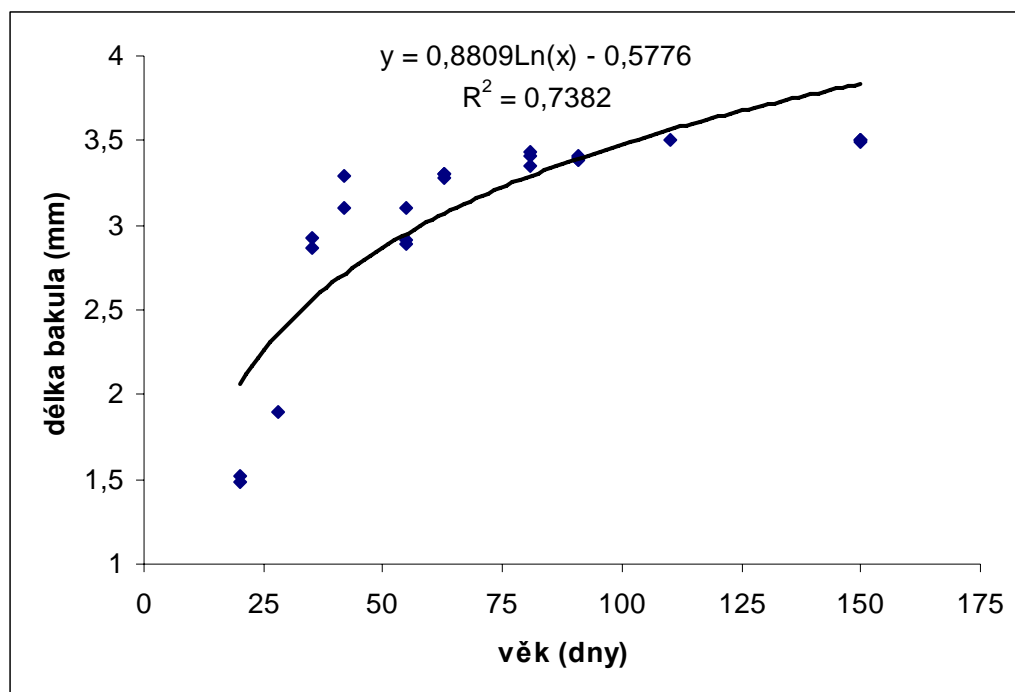


obr. č. 7 - 91 dní (LC = 110,71mm)
dorzální pohled



obr. č. 8 - 100 dní (LC = 107,20mm)
dorzální pohled

Pro popis růstu bakula jsem zaprvé použila celkovou délku bakula (osa Y) proti věku jedince (osa X) - viz graf č. 1. Graf ukazuje výrazný růst kosti hlavně do zhruba 1,5 měsíce života, který se kolem 75 dne zpomaluje.

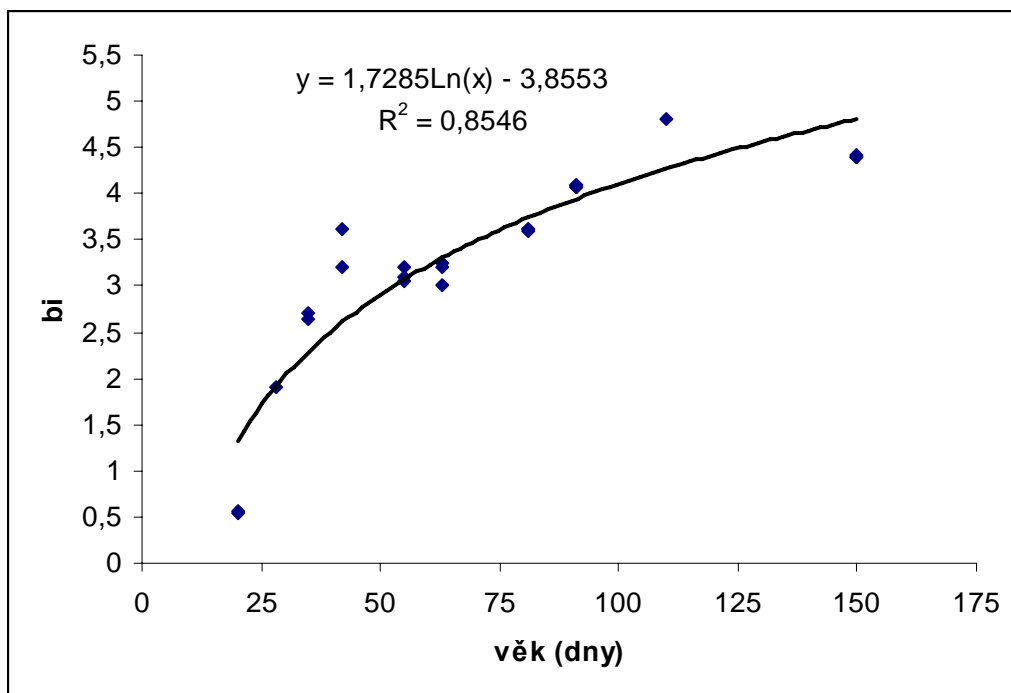


Graf č. 1. Růst bakula u laboratorně chovaných hrabošů polních.

K dalšímu popisu růstu bakula jsem použila také tzv. bakulární index (bi) (Arata et al., 1965), který zjednodušeně vypočítává plochu celé kosti (tab. č. 2, graf č. 2).

věk (dny)	20	28	35	42	55	63	81	91	110	150
(počet vzorků)	(2)	(1)	(2)	(2)	(3)	(3)	(3)	(4)	(1)	(3)
průměrná délka šípů (A)	1,40	1,90	1,80	2,30	2,00	2,10	2,10	2,20	2,30	2,40
průměrná šířka báze (B)	0,40	1,00	1,30	1,40	1,30	1,20	1,30	1,40	1,40	1,60
průměrná délka středního výběžku (X)	-	-	0,90	0,80	0,90	1,00	1,10	1,10	0,80	0,80
průměrná délka postranního výběžku (Y)	-	-	0,40	0,50	0,50	0,70	0,80	0,90	0,50	0,70
bakulární index	0,56	1,90	2,68	3,41	3,12	3,15	3,60	4,08	4,81	4,40
bi=(A*B)+(X*Y)	(0,55 - 0,56)	(1,90)	(2,65 - 2,70)	(3,20 - 3,62)	(3,05 - 3,20)	(3,01 - 3,25)	(3,59 - 3,61)	(4,07 - 4,10)	(4,81)	(4,40 - 4,41)

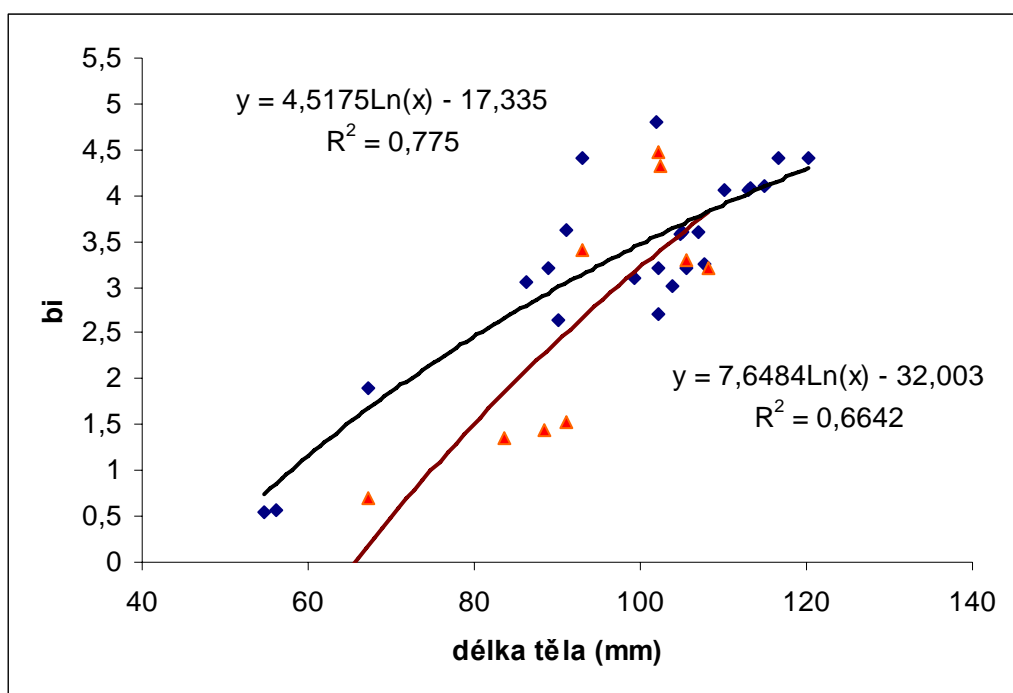
Tab. č. 2. Rozměry jednotlivých osifikovaných částí bakula a bakulární index u 24 jedinců laboratorně odchovaných hrabošů polních. Velikosti jednotlivých elementů se u jedinců stejného věku lišily pouze o setiny mm.



Graf č. 2. Srovnání známého věku a bakulárního indexu (bi) u laboratorně chovaných hrabošů polních.

Při použití bakulárního indexu je křivka růstu bakula velmi podobná (pouze pozvolnější) a zpomaluje se přibližně ve stejném věku, i když stále ještě narůstá. Nedochozí k tak výraznému zpomalení jako u grafu č.1.

V dalším grafu (graf č.3) jsem porovnávala závislost růstu bakula (bi) na velikosti těla nejen u hrabošů odchovaných v laboratorních podmínkách, ale i u jedinců odchycených ve volné přírodě. U volně žijících zvířat je vidět podle spojnice výraznější růst kosti, zato u laboratorně chovaných jedinců dochází k pozvolnějšímu nárůstu bakula a má i větší rozptyl. Na základě růstu bakula lze tedy odhadnout věk i pro volně žijící jedince.

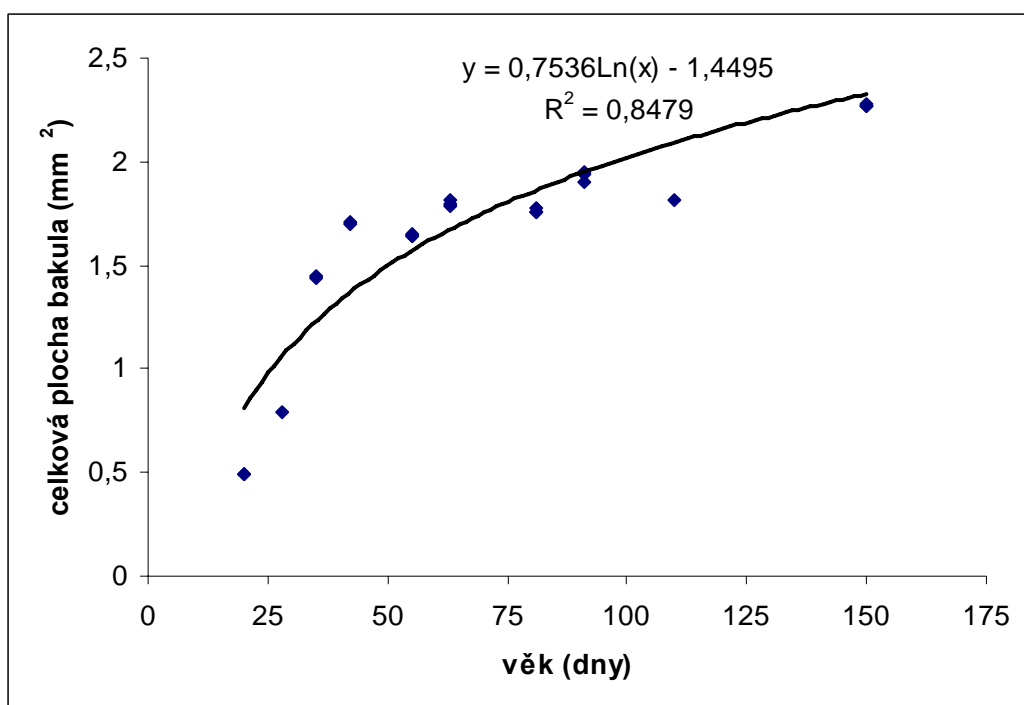


Graf č. 3. Srovnání známé délky těla a bakulárního indexu (bi) u laboratorně odchovaných (modře) a v přírodě odchycených (červeně) hrabošů polních.

Pro vypočítání skutečné plochy a ověření přesnosti bakulárního indexu podle Araty et al. (1965) jsem použila počítačový program ImageTool, který po zadání přesného měřítka umožní přesný výpočet ohraničené plochy objektu. Výsledky jsou v tabulce č. 3 a grafu č. 4.

věk (dny) (počet vzorků)	20 (2)	28 (1)	35 (2)	42 (2)	55 (3)	63 (3)	81 (3)	91 (4)	110 (1)	150 (3)
průměrná plocha šípů	0,49	0,79	1,19	1,37	1,26	1,34	1,26	1,40	1,34	1,63
průměrná plocha středního výběžku	-	-	0,17	0,19	0,24	0,27	0,28	0,26	0,29	0,30
průměrná celková plocha postranních výběžků	-	-	0,05	0,08	0,07	0,10	0,12	0,14	0,09	0,17
celková plocha bakula (průměr a rozptyl)	0,49 (0,49)	0,79 (0,79)	1,45 (1,44 – 1,45)	1,70 (1,70 – 1,71)	1,64 (1,64 – 1,65)	1,80 (1,79 – 1,81)	1,78 (1,76 – 1,78)	1,94 (1,92 – 1,95)	1,81 (1,81)	2,27 (2,27 – 2,28)
bakulární index (bi) (průměr a rozptyl)	0,56 (0,55-0,56)	1,90 (1,90)	2,68 (2,65-2,70)	3,41 (3,20-3,62)	3,12 (3,05-3,20)	3,15 (3,01-3,25)	3,60 (3,59-3,61)	4,08 (4,07-4,10)	4,81 (4,81)	4,40 (4,40-4,41)
odchylka bi od celkové plochy bakula	0,07	1,11	1,23	1,71	1,48	1,35	1,82	2,14	3,00	2,13
odchylka v procentech	14,29	140,51	84,83	100,59	90,24	75,00	102,25	110,31	165,75	93,83

Tab. č. 3. Plocha (mm²) jednotlivých osifikovaných částí bakula laboratorně odchovaných hrabošů polních podle programu ImageTool a rozdíl bakulárního indexu. Velikosti jednotlivých elementů se u jedinců stejného věku lišily o setiny mm.



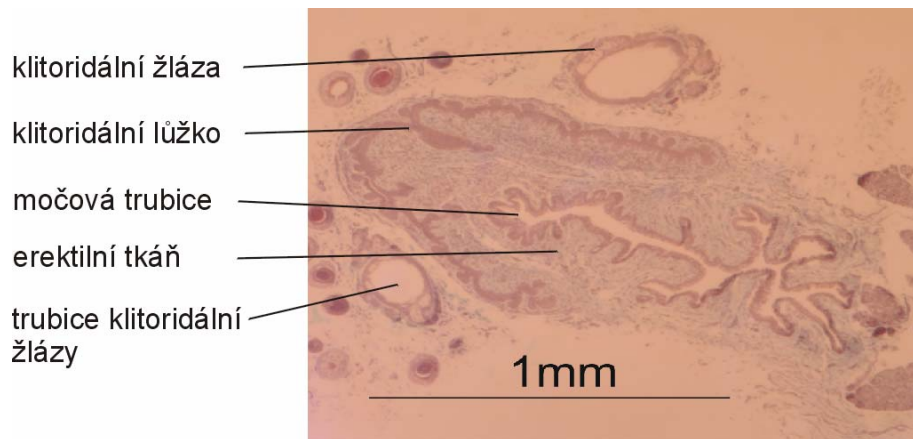
Graf č. 4. Srovnání známého věku a skutečné plochy bakula u laboratorně chovaných hrabošů polních.

Při použití skutečné plochy bakulum zvolna narůstá, podobně jako u bi. Při délce 1,80-2,00 mm² se růst zpomaluje, ale ještě mírně pokračuje. Přestože jsou si grafy č. 2. a č. 4. velmi podobné, rozdíl bi od skutečné plochy je výrazný a odchylka v procentech je vysoká (viz tab. č. 3).

4.2. Výskyt os clitoridis u studovaných samic

4.2.1. Histologické řezy

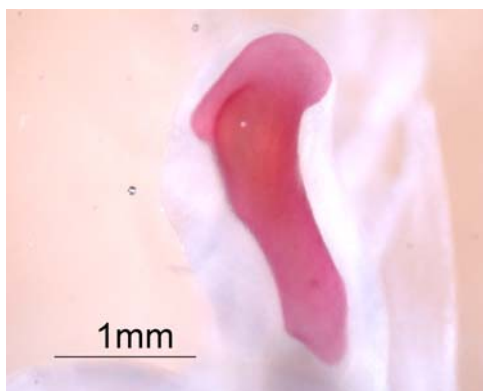
Diferenciální barvení hrabošů bylo úspěšné pouze v případě samců, u samic jsem při použití této metody barvení vzorků nenašla známky kosti ani chrupavky, proto jsem chtěla vyzkoušet jemnější a přesnější metodu histologických řezů. Chrupavčitá tkáň obarvená alcianovou modří je na řezech zřetelně rozeznatelná v podobě větších modře ohraničených buněk, kost zůstává neobarvená. Bohužel, ani tímto způsobem jsem neobjevila žádný náznak osifikace nebo přítomnosti chrupavky, i když u některých řezů (u dvou samic) pozorovaných mikroskopem, jsem našla několik modře zbarvených oblastí. *Os clitoridis*, pokud by byla přítomná, by se vyskytovala v oblasti nad močovou trubicí na konci klitoris (viz obr. 9). Tato oblast byla u všech jedinců bez náznaku přítomnosti této kosti.



Obr. č. 9. Histologický řez klitorisem hraboše polního

4.2.2. Popis *os clitoridis* veverky obecné

Os clitoridis jsem objevila pomocí barvení alizarinem a alciánovou modří pouze u samice veverky obecné. Šlo o kontrolní vzorek, abych prověřila, že tato technika barvení je pro *os clitoridis* vhodná. U veverky leží tato kost ve střední části *glans clitoridis*, těsně nad močovou trubicí a svou bazální částí je pevně spojena s kavernózním tělesem (*corpus cavernosum*) klitorisu. *Os clitoridis* (obr. č.10) je plně osifikovaná a stejně jako u samce (obr. č.11) je tvořena pouze jedinou kostí bez oddělených distálních výběžků. Kost je dlouhá (2,40 mm) a poměrně rovnoměrně široká (kolem 0,50 mm) a v bázi se nerozšiřuje jako u jiných hlodavců, pouze se stáčí ke straně do mírně zaoblené špičky. V místě spojení s kavernózním tělesem klitorisu je báze konkávní. Distální část šípů má kost podobně jako u samců asymetrickou, ale více široce rozšířenou, vykrojenou a zploštělou. Na rozdíl od bakula zde ale není žádný výrazný postranní hrot. Kost je výrazně menší než u samců, u samce, kterého jsem měla k dispozici, jsem naměřila délku 8,20 mm.



obr. č. 10 *os clitoridis* veverky obecné
(LC = 221,00mm) dorzální pohled

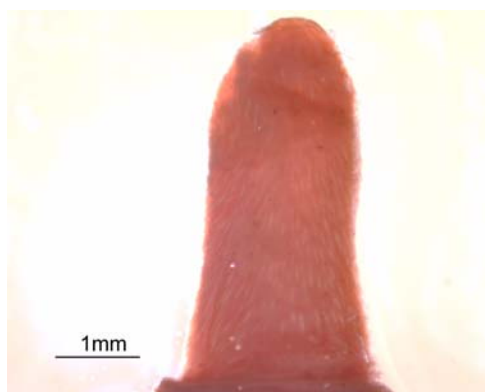


obr. č. 11 bakulum
(LC = 234,00mm) dorzální pohled

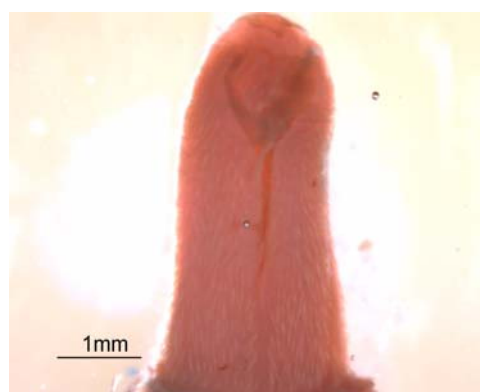
4.3. Popis penisu a bakula rypoše stříbřitého

Měla jsem k dispozici 13 samců rypoše stříbřitého, a přestože 12 samců bylo dospělých, pouze u 3 se bakulum obarvilo, u ostatních však byl jeho tvar v tkáni přesto patrný.

Glans penis tohoto druhu rypoše je jednoduchý, válcovitý tvar se zakulaceným distálním koncem a jeho průměrná délka byla 4,33 mm (n=12), od 3,20 do 4,70 mm. Celý jeho povrch hustě pokrývají epidermální trny, jejichž délka se pohybuje od 0,16 do 0,23 mm, průměr je 0,19 mm (vždy jsem měřila 10 trnů u každého z 12 jedinců). Trny se vyskytují rovnoměrně po celé ploše, pouze hrot *glans* je poměrně hladký. Vzdálenost mezi jednotlivými trny je mezi 0,04-0,06 mm, a průměrná vzdálenost je 0,05 mm (pro vzorek viz výše u trnů). Na ventrální straně je od poloviny *glans penis* směrem k hrotu zřetelně viditelný a hluboký zářez ve tvaru Y (obr.12-13).



obr. č. 12 *glans penis* rypoše stříbřitého (LC = 190,00mm) dorzální pohled



obr. č. 13 *glans penis* rypoše stříbřitého (LC = 190,00mm) ventrální pohled

Bakulum dvou jedinců je jednoduché (tedy bez distálních výběžků), poměrně silné a od distálního konce se k bázi zvolna rozšiřuje. Proximální část má rozšířený cibulovitý tvar (obr. č. 14). Kost třetího jedince je podlouhlá, poměrně štíhlá, s pouze mírným rozšířením v bázi a v 2/3 délky šípů. Rozměry všech tří kostí včetně *glans penis*, velikosti jedinců a jejich hmotnosti jsou zahrnuty v tabulce č. 4.



obr. č. 14 bakulum rypoše stříbřitého
(LC = 150,00mm) dorzální pohled

č. vzorku	velikost jedince		velikost bakula				velikost glans				trny na glans	
	délka těla	hmotnost (g)	délka	šířka báze	šířka středu	šířka distální části	délka	šířka báze	šířka středu	šířka distální části	délka trnů (n=10)	vzdál. mezi trny (n=10)
6	159,00	204,00	4,70	0,80	0,70	0,50	5,50	1,40	1,20	0,90	0,20	0,05
9	137,00	150,00	2,80	1,10	0,70	0,50	3,40	2,00	1,50	1,20	0,18	0,05
13	142,00	126,00	3,20	1,20	0,80	0,60	4,10	1,60	1,50	1,20	0,17	0,05

Tab. č. 4. Souhrn rozměrů jedinců, u kterých se obarvilo bakulum (v mm).

5. Diskuze

5.1. Vývoj bakula hraboše polního

5.1.1. Rozdělení do věkových tříd

Pro hrabošovité je typická oddělená proximální a distální část bakula s postupnou osifikací začínající v horní části šípů (proximální část) (Sovová, 2006 – u hraboše mokřadního *M. agrestis*) nebo v bázi (Dearden, 1958 – u hraboše pelyňkového *Lemmiscus curtatus*). Kost se postupně prodlužuje a zesiluje hlavně v bázi. Osifikace dále pokračuje nejprve ve středním prstu a před jejím skončením začínají osifikovat i oba boční. U hraboše polního je to stejné, jen se mi tentokrát nepodařilo nalézt osifikační centrum šípů. Přesto to vypadá, že bude ve středu bakula, protože osifikace postupuje poměrně rovnoměrně k oběma koncům. Na základě postupu růstu bakula u tohoto druhu pak lze vytvořit maximálně tři věkové třídy:

- 1) Mláďata mají pouze chrupavku nebo jim začíná osifikovat proximální část bakula. Osifikovaná plocha tvoří pouze 30% plochy dospělého jedince.
- 2) Dospívajícím pokračuje osifikace proximální části a postupně osifikují i distální prsty. Osifikovaná plocha narůstá na 80% plochy dospělého jedince.
- 3) U dospělců je osifikace všech čtyř částí ukončena a jejich růst už výrazně nepokračuje. Jde o jedince, jejichž celková velikost bakula se pohybuje kolem 3,40-3,50 mm.

Na základě velikosti bakula je tedy možné určit dospělost a v případě mladších i přibližný věk jedince.

5.1.2. Metody popisu růstu bakula

Celková délka bakula, jako jedna z hodnot pro popis růstu této kosti, není úplně přesná, protože kromě délky šípku a středního výběžku zahrnuje i spojovací tkáň mezi oběma částmi. Tento prostor se však mezi jednotlivými vzorky svým rozměrem příliš neliší. Tato metoda se jeví jako dostatečně použitelná pro určení přibližného věku jedince, alespoň v průběhu dospívání.

Pro určení plochy bakula jsem použila tzv. bakulární index (bi) (Arata et al., 1965), který byl využíván v minulosti, a porovnávala jsem jeho výsledky s programem ImageTool, který podle obkresleného obrysu objektu a určeného měřítka vypočítá přesnou plochu. Zjistila jsem, že výsledný rozdíl mezi bi a skutečnou plochou bakula se liší o průměrnou odchylku 1,39 mm² (0,07-3,00 mm² u n=24 jedinců), a bi přidává ke skutečné hodnotě v průměru o 97,76% (14,29-165,75% u n=24) (viz tab. č. 3). Odchylka bi od celkové plochy bakula je tedy velmi výrazná, což je způsobeno tím, že bi nezohledňuje značně rozšířenou bázi v kombinaci s úzkým šípem bakula u dospělců. Bakulární index je tedy dost nepřesný způsob výpočtu případné plochy bakula, který funguje u hrabošovitých nejlépe pro velmi mladé jedince, kteří ještě mají bakulum pouze ve tvaru jednoduché tyčinky. Pokud by ale odchylka stoupala lineárně a u starších jedinců by byla víceméně na stejné hladině, výsledný rozdíl by tolik nevadil, což však moje výsledky příliš nenaznačují (viz tab. č. 3). Bakulární index by se stále snad mohl uplatnit u skupin, které mají bakulum pouze tyčinkovitěho tvaru (např. myšovití nebo křečkovití hlodavci (např. *Neotoma*, *Peromyscus*) nebo u řady šelem (viz např. Burt, 1960). S ohledem k jednoduchosti měření skutečné plochy to snad ani není nutné.

Na základě výsledků lze říci, že bakulum je do určité míry využitelné pro určování věku. Podle stupně osifikace barvené kosti je možné pouhým pohledem určit věk jedince

jen velmi přibližně a dá se zařadit jen do některé výše zmíněné věkové kategorie. Změření bakula je mnohem přesnějším způsobem, jak samotná délka, tak hlavně přesná plocha bakula a lze zřejmě odhadnout věk s větší přesností, zvláště u mladších jedinců. V dospělosti bakulum výrazně zpomalí a zastavuje svůj růst a proto je pak nutné použít jinou metodu. U bakulárního indexu, který se využíval v minulosti, dochází k velkému zkreslení výsledků. Zvláště u starších jedinců bi nezohledňuje nárůst celkové plochy, hlavně v bázi kosti. Proto je tato metoda nevhodná.

5.1.3. Vliv doby narození na růst bakula

Přestože Zejda & Hrabě (1973) zaznamenali zpožděný růst bakula u jedinců podzimní a některých jedinců letní kohorty u norníka rudého, já jsem u hraboše polního na nic podobného nenarazila, i když se mi 3 ze 30 vzorků neobarvily. Ve dvou případech šlo o jedince narozené koncem jara (kterým by tedy mělo podle Zejda & Hrabě (1973) bakulum růst rychleji), třetí patřil k jedincům narozeným v létě. Pro všechny tři vzorků jsem měla navíc měla i další věkově stejné jednice, jejichž bakula se bez problémů obarvila. To, že se tyto tři vzorky neobarvily, mohlo být způsobeno dlouhým procesem projasňování nebo vyšší koncentrací KOH, protože jsem v některých případech musela postup projasňování opakovat. Že jsem nezaznamenala zpomalení nebo zastavení růstu bakula u jedinců narozených v podobném období jako Zejda & Hrabě (1973), mohlo být ovlivněno prostředím, ve kterém vyrůstali, tedy v laboratorních podmínkách, kde se mohou rozmnožovat bez problémů celý rok a neovlivňují je faktory jako nutnost vyhledávání potravy či ochrana před predátorem. Výsledky určitě mohl také ovlivnit malý počet vzorků, protože Zejda & Hrabě (1973) získali 563 samců, takže nemohu s jistotou potvrdit, že vývoj bakula hraboše polního neovlivňuje období jeho narození.

5.2. *Os clitoridis*

5.2.1. Výskyt *os clitoridis* u hrabošovitých

Os clitoridis je většinou jednoduchá kůstka, která bývá uložena nad močovou tubicí v klitorisu některých savců. U hrabošovitých se vyskytuje v distální části klitorisu (Arata et al., 1965) v místech distálního výběžku bakula a u veverkovitých leží více proximálně a plně (tvarem, velikostí) odpovídá bakulu (Callery, 1951; Layne, 1954).

Snažila jsem se najít kost nebo alespoň chrupavku pomocí diferenciálního barvení u hrabošovitých (hraboš mokřadní - *Microtus agrestis*, hraboš polní - *M. arvalis* a norník

rudý - *Myodes glareolus*) i myšovitých (myšice rodu *Apodemus*) druhů běžně se vyskytujících v naší fauně. To se mi nepodařilo, ale přikládala jsem to nepatrné velikosti této kosti i možnému poškození při projasňování.

Proto jsem použila histologické řezy, které jsou jemnější a umožňují detailnější pohled na tkáň u obou zkoumaných druhů hrabošů (hraboš polní a syslí) pocházejících z laboratorních chovů. Protože přítomnost této kosti nebývá u některých skupin závislá na věku (Zeigler, 1960), snažila jsem se do skupiny vzorků zahrnout různé aspekty, a to samice velmi mladé i dospělé, doposud nepářené, gravidní i po porodu. Bohužel se mi ani v jednom případě nepodařilo *os clitoridis* najít, i když jsem u dvou z nich objevila modrou neohrazenou tkáň v místě přibližného výskytu této kosti. Alciánová modř však barví i jiné látky, jako jsou např. kyselé mukopolysacharidy, což mi objasnila MUDr. Katarina Lukáčová, se kterou jsem výsledky konzultovala a která na řezech také nenašla známky chrupavky nebo kosti. Mohlo to být způsobeno použitou metodikou, ale to je nepravděpodobné, protože Arata et al. (1965) použili stejné barvicí látky (koncentrace neuvedena). Ve většině případů, kdy byla nalezena *os clitoridis*, bylo použito pouze diferenciálního barvení podobného postupu jaký jsem využívala já. Lišil se pouze ve způsobu projasňování, což může být teoretickou příčinou, protože větší koncentrace KOH poškozuje kosti. Důvodem však bude spíše sporadický výskyt *os clitoridis*, která je zřejmě nestále se vyskytující strukturu objevující se jen v určitých případech.

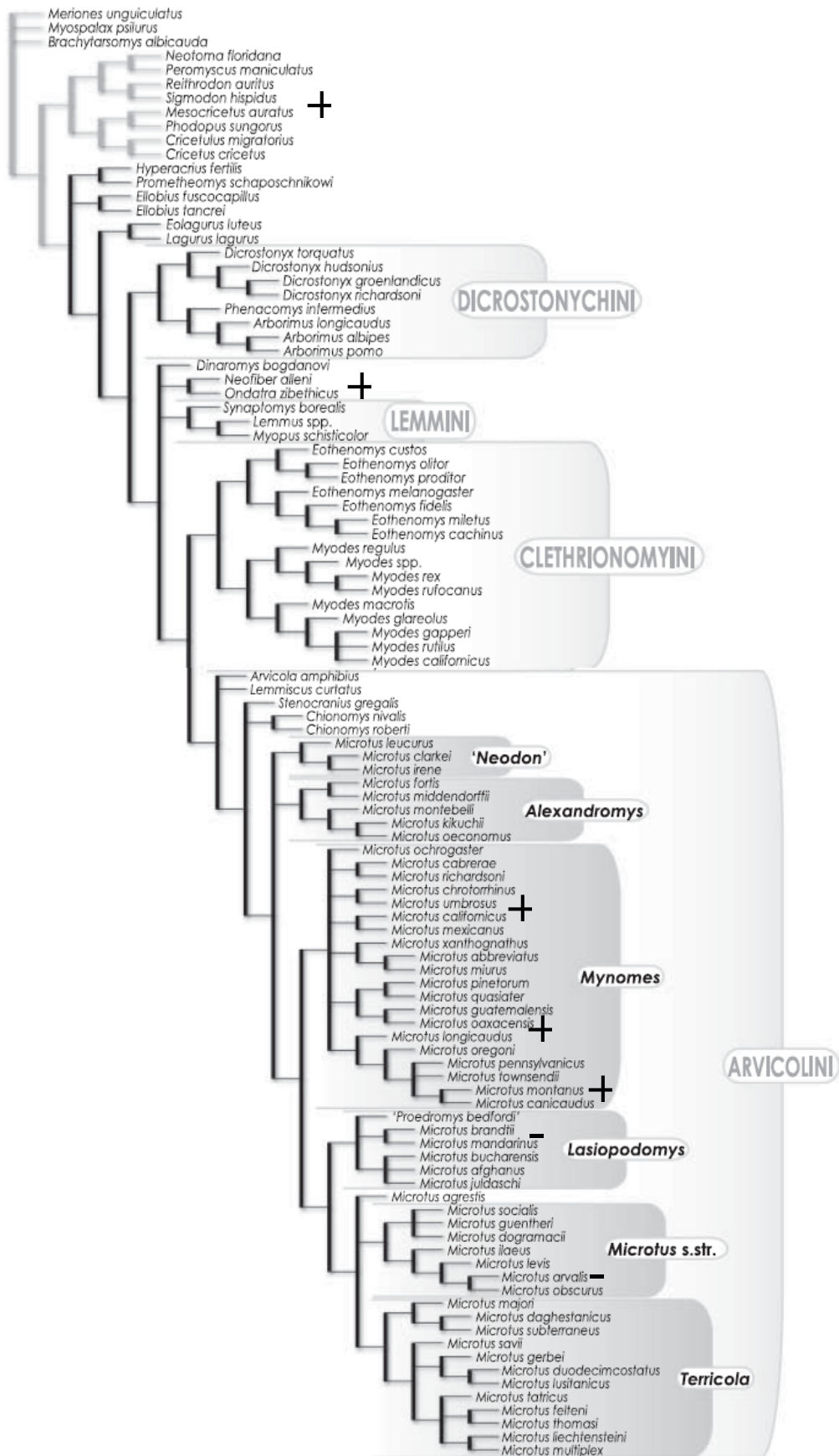
U hrabošovitých byla *os clitoridis* nalezena pouze u čtyř severoamerických druhů. Dvě kosti u 20 jedinců v laboratoři odchovaných hrabošů kalifornských (*Microtus californicus*) a jedna kost u dvou hrabošů *M. longicaudus* chycených ve volné přírodě (Zeigler, 1960). Jedním z hrabošů kalifornských bylo pouze 15-ti denní mládě s poměrně velkou a dobře vyvinutou kostí. Druhá byla 56-denní samice s pouze fragmentární kostí. *M. longicaudus* měl kost prutovitou, osifikovanou z poloviny. Dalším druhem hraboše, u kterého byla zjišťována přítomnost *os clitoridis*, byl hraboš horský (*M. montanus*) (Arata et al., 1965; Zeigler, 1960). Zeigler měl k dispozici 4 samice, ale nenašel žádnou kost ani chrupavku. Arata et al. (1965) získali 21 vzorků a podařilo se jim (neuvedeno u kolika) samic různého věku od 212 dne života objevit vláknitou chrupavku jednoduchého podlouhlého tvaru ve středním laloku klitorisu, ale bez známek osifikace. Zvířata byla v tomto případě odchována v zajetí. Dalším druhem se zjištěnou přítomností *os clitoridis* byla ondatra pižmová (*Ondatra zibethicus*) (neuveden počet ani věk jedinců). Její *os clitoridis* byla nalezena na stejném místě a byla podobného tvaru jako u ostatních hrabošovitých a u všech velkých jedinců osifikovala (Arata et al., 1965). Sporadický

výskyt *os clitoridis* je podobný také u čikarí červeného (*Tamiasciurus hudsonicus*), což popsal Layne (1952). Našel kost pouze u 4 ze 13 vzorků. Zdá se, že přítomnost *os clitoridis* není závislá ani na věku zvířete, protože větší kost se může vyskytnout u mladšího jedince (Rinker, 1944; Zeigler, 1960).

Co se fylogenetických souvislostí *os clitoridis* u hrabošovitých týče, pak lze konstatovat toto: Tato kůstka je známá u některých křečkovitých hlodavců (např. křečík zlatý), dále z hrabošovitých u ondatry, a pak u třech druhů rodu *Microtus*. Je vlastně zajímavé, že všechny tyto tři druhy patří do jedné skupiny (podrod *Mynomes*). Moje práce neprokázala výskyt *os clitoridis* u sesterské skupiny k *Mynomes* (pokud přijmeme fylogenetické schéma fig. 5 z práce Robovský et al., 2008), tj. konkrétně u skupiny *Lasiopodomys* (neprokázáno u *Microtus brandtii*), *Microtus sensu stricto* (neprokázáno u *M. arvalis*) a dále u *M. agrestis*. Z bazálnějších skupin jsem neprokázala výskyt u normíků (*Myodes glareolus*). Zdá se tedy, že u odvozených hrabošů je její výskyt patrně vázán jen na americké odvozené (a vzájemně relativně příbuzné) hraboše. Při snaze najít nějaké pojitko výskytu *os clitoridis* jsem se také zaměřila na sociální uspořádání těchto hrabošů a v zásadě jsme nenašli žádné pojitko (např. na základě matice znaků pro publikovanou fylogenezi hrabošovitých Robovský et al., 2008) (viz obr. č. 15).

Kvůli proměnlivému výskytu *os clitoridis* u hrabošovitých je zřejmé, že tento znak není perspektivní, co se fylogenetických a taxonomických závěrů týče. Pro odhalení přesné evoluce této struktury u hrabošovitých by bylo třeba mít od každého druhu velký počet jedinců, což je požadavek dosti nepraktický. Další taxonomické zahušťování zde patrně nemá cenu (kalkulace časová investice a robustnost výchozích závěrů).

V každém případě je *os clitoridis* nestálou strukturou objevující se u všech těchto sociálních hrabošovitých jen v určitých případech, což naznačuje, že tato kůstka nemá ani žádný velký individuální význam.



Obr. č. 15. Výskyt *os clitoridis* u hrabošovitých (fylogenetické schéma Robovský et al., 2007)

5.2.2. *Os clitoridis* veverkovitých

U některých hlodavců, zvláště veverkovitých, je *os clitoridis* malá zřetelně homologická verze bakula, která je obvykle osifikovaná. Tato kost byla popsána u mnoha severoamerických druhů, kde se vyskytuje pravidelně u všech jedinců a má stálý tvar a velikost. Jedinou výjimkou je čikarí červený (*Tamiasciurus hudsonicus*), který má *os clitoridis* velmi nepatrnou, navíc nebyla nalezena u všech jedinců a kromě tohoto druhu nebyli v tomto ohledu zkoumáni žádní jeho blízcí příbuzní. Klitorisové kosti veverkovitých jsou vzhledově velice podobné bakulu daného druhu, ať už přítomností výběžků na distálním konci nebo výraznějším konkávním zakončením báze. Velikost *os clitoridis* je přibližně úměrná velikosti bakula daných samců, ale zřejmě zde není korelace mezi velikostí zvířete a relativního vývoje klitoridální nebo penisové kosti (Layne, 1954). Tato relativní stabilita výskytu a tvaru *os clitoridis* je v kontrastu s jinými skupinami, u kterých byla tato kost také nalezena, např. u mývala (Rinker, 1944), lachtana (Scheffer, 1949), i hrabošů (Zeigler, 1960). V těchto případech bývá totiž kost dobře vyvinutá jen u některých samic a je rudimentární nebo úplně chybí u jiných, často bez ohledu na věk jedince.

U samice veverky obecné jsem našla plně osifikovanou kost, která svou délkou i šířkou odpovídá veverce liščí (*Sciurus niger*), přestože je veverka liščí výrazně větší a těžší (velikost těla 260-370 mm u v. liščí oproti 200-270 mm u v. obecné, délka ocasu 205-330 mm u v. liščí oproti 145-202 mm u v. obecné, váha 500-1350 g u v. liščí oproti 211-407 g u v. obecné, údaje z Anděra & Horáček, 1982; Reid, 2006). Tvarem se od veverky liščí odlišuje jen mírně. Protože si tyto dvě veverky nejsou bezprostředně příbuzné (Herron et al., 2004), *os clitoridis* téměř identického tvaru tedy zřejmě vznikla náhodně. Ostatní veverky rodu *Sciurus* mají totiž kost už na první pohled robustnější a také delší a v distální části širší (Layne, 1954).

Přestože mám pouze jediný vzorek, tak s ohledem k pravidelnému výskytu kostí u veverek se dá očekávat, že jde o stejně stabilní kost jako bakulum a bude se u samic vyskytovat. Protože se kosti mezi všemi dosud popsanými veverkami i tímto druhem liší nejen tvarem, ale i velikostí, je tedy možné použít je, alespoň teoreticky, jako taxonomický i fylogenetický nástroj na úrovni druhů.

5.3. Penis a bakulum rypošů

Soliterní hlodavci jako rypoš kapský a rypoš prasečí se vyznačují indukovanou ovulací a sezónním rozmnožováním (Bennett & al., 2000; van Sandwyk & Bennett, 2005). Se soliterním chováním bývá spojena také zvýšená složitost penisové morfologie, zvláště povrchových struktur penisu, a relativní velikosti bakula. Obojí může fungovat jako efektivní samičí stimulant k indukování ovulace (Altuna & Lessa, 1985; Larivière & Ferguson, 2002).

Rypoš stříbřitý, který je také soliterní s náznaky sezónní reprodukce (Sumbera & al., 2003), má rovněž složitě ornamentovaný penis. Epidermální trny na jeho penisu jsou delší než u rypoše prasečího (o 0,06 – 0,08 mm), ale nepokrývají penis tak hustě. Rypoš stříbřitý tedy zřejmě také využívá ornamentace penisu k vyvolání ovulace u samičky, což je důležité pro soliterní zvířata, která mají pouze příležitostné období páření. Stimulace trny může zvýšit šance na včasné přijetí spermií (Parag & al., 2006). Důsledkem sezónního chování obou pohlaví a příležitostného páření je indukovaná ovulace selektivní výhodou, k čemuž se rypošům hodí právě komplikovanější povrchová ornamentice.

Bakulum se mi obarvilo pouze u tří vzorků z 12 dospělých jedinců rypoše stříbřitého, což mohlo být způsobeno příliš silnou koncentrací KOH, přestože všechny vzorky byly barveny naprosto stejně. Rypoši byli po usmrcení také úplně stejně fixováni (osobní sdělení Radima Šumbery). Společným znakem všech tří jedinců je, že byli odchyceni v období rozmnožování, i když na různých lokalitách. U rypošů dochází mimo období rozmnožování k úbytku vápníku v některých kostech (osobní sdělení Radima Šumbery), což by mohla být jedna z příčin, ale mezi jedinci s neobarveným bakulem byli čtyři chyceni také v době rozmnožování.

Bakulum tohoto druhu má stejnou velikost jako u rypoše kapského (měřeno podle Paraga & al. (2006) – průměrná délka bakula (mm) korigována s průměrnou tělesnou hmotností (g)), což jen potvrzuje výsledky Paraga & al. (2006), že velké bakulum nemusí být spojeno se složitě ornamentovaným penisem. Je ovšem těžké určit adaptivní funkci bakula u rypošů bez dalšího výzkumu v této oblasti.

Na základě výsledků lze říci, že soliterní rypoš stříbřitý plně odpovídá předpokladům Paraga & al. (2006) co se týče celkové peniální morfologie, tedy ornamentace *glans penis* a velikosti bakula. K indukované ovulaci využívají soliterní rypoši složitě ornamentovaný penis, který nemusí být spojen s velkým bakulem.

6. Závěry

Popsala jsem průběh osifikace bakula hraboše polního.

Rozdělila jsem jednotlivá růstová stádia bakula na věkové kategorie.

Zjistila jsem, že bakulární index má příliš vysokou odchylku od skutečné plochy a není tudíž nejvhodnější metodou pro popis růstu bakula u hrabošovitých.

Nezjistila jsem žádný vliv období narození na růst bakula.

U samic hraboše polního a hraboše syslího jsem nenašla žádnou známku přítomnosti *os clitoridis* pravděpodobně v důsledku pouze sporadického výskytu této kosti.

Popsala jsem *os clitoridis* u veverka obecné.

U rypoše stříbříteho jsem popsala bakulum i vnější morfologii *glans penis*.

7. Literatura

- Altuna, C. A. & Lessa, E., 1985: Penial morphology in Uruguayan species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 66(3): 483-488.
- Anděra, M. & Horáček, I., 1982: *Poznáváme naše savce*. Mladá fronta, Praha 256 pp.
- Anderson, S., 1960: The baculum in microtine rodents. *University of Kansas Publications Museum of Natural History* 12(3): 181-213.
- Arata, A. A., Negus, N. C. & Downs, M. S., 1965: Histology, development and individual variation of complex muroid bacula. *Tulane Studies in Zoology* 12(3): 51-64.
- Baryshnikov, G. F., Vinoda-Emonds, O. R. P. & Abramov, A. V., 2003: Morphological variability and evolution of the baculum (*os penis*) in Mustelidae (Carnivora). *Journal of Mammalogy* 84(2): 673-690.
- Bennett, N. C., Faulknes, C. G. & Molteno, A. J., 2000: Reproduction in subterranean rodents. In *Life underground, the biology of subterranean rodents*: 145-177. Cameron, G. N., Lacey, E. A. & Patton, J. (Eds). Chicago: University of Chicago press.
- Bolk, L., Göppert, E., Kallius, E. & Lubosch, W., 1933: *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere*. Band VI. Berlin und Wien, 854 pp.
- Breed, W. G., 1986: Comparative morphology and evolution of the male reproductive tract in the Australian hydromyine rodents (Muridae). *Journal of Zoology (London)* 209: 607-629.
- Burt, W. H., 1960: Bacula of North American mammals. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan* 113: 1-77 + 1-31.
- Callery, R., 1951: Development of the *os genitale* in the golden hamster, *Mesocricetus (Cricetus) auratus*. *Journal of Mammalogy* 32(2): 204-207.
- Dearden, L. C., 1958: The baculum in *Lagurus* and related microtines. *Journal of Mammalogy* 39(4): 541-553
- Deveci, E., Nergiz, Y., Inalöz, S., Ketani, M. A. & Ersay, A. R., 1998: The effect of tamoxifen on the neonatal development of rat penis. *Turkish Journal of Medical Sciences* 28: 375-382.
- Dixson, A. F., 1987: Observations on the evolution of the genitalia and copulatory behaviour in male primates. *Journal of Zoology (London)* 213: 423-443.
- Dixson, A. F., 1995: Baculum length and copulatory behaviour in carnivores and pinnipeds (grand order Ferae). *Journal of Zoology (London)* 235: 67-76.

- Dyck, M. G., Bourgeois, M. J. & Miller, E. H., 2004: Growth and variation in the bacula of polar bears (*Ursus maritimus*) in the Canadian Arctic. *Journal of Zoology* (London) 264: 105-110.
- Elder, W. H. & Shanks, C. E., 1961: Age changes in tooth wear and morphology of the baculum in muskrats. *Journal of Mammalogy*, 43(2): 144-150.
- Geissmann, T. & Lim, K. K. P., 1994: Extraction of bacula from tanned gibbon skins. *Raffles Bulletin of Zoology* 42(4): 775-780.
- Gilbert, T., 1892: Das *Os priapi* der Säugethiere. *Morphologisches Jahrbuch* 18: 805-831.
- Glucksmann, A., Ooka-Souda, S., Miura-Yasugi, E. & Mizuno, T., 1976: The effect of neonatal treatment of male mice with antiandrogens and of females with androgens on the development of the *os penis* and *os clitoridis*. *Journal of Anatomy* 121(2): 363-370.
- Hayssen, V., van Tienhoven, A. & van Tienhoven, A., 1993: Asdell's patterns of mammalian reproduction. A compendium of species-specific data. Ithaca, London: Cornell University Press, 1023 pp.
- Herron, M. D., Castoe, T. A. & L. Parkinson, C. L., 2004: Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1015–1030.
- Hobday, A. J., 2000: Where is the human baculum? *Mankind Quarterly* 41(1): 43-58.
- Hooper, E.T. & Hart, B. S., 1962: A synopsis of recent North American Microtine rodents. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan* 120: 1-68.
- Hosken, D. J., Jones, K. E. & Chipperfield, K., 2001: Is the bat *os penis* sexually selected? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50: 450-460.
- Hosken, D. J. & Stockley, P., 2003: Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 19(2): 87-93.
- Hrabě, V., 1972: The bacula of *Pitymys tatricus* Kratochvíl, 1952, and *P. subterraneus* (de Sélys-Longchamps, 1836) from the High Tatra Mts. *Zoologické listy* 21(2): 145-155.
- Jellison, W. B., 1945: A suggested homolog of the *os penis* or baculum of mammals. *Journal of Mammalogy* 26: 146-147.

- Kaudern, W., 1910: Studien über die männlichen Geschlechtsorgane von Insectivoren und Lemuriden. Zoologische Jahrbucher Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere: 1-106.
- Kelly, D. A., 2000: Anatomy of the baculum-*corpus cavernosum* interface in the norway rat (*Rattus norvegicus*), and implications for force transfer during copulation. Journal of Morphology 244: 69-77.
- Larivière, S. & Ferguson, S. H., 2002: On the evolution of the mammalian baculum: vaginal friction, prolonged intromission or induced ovulation? Mammal review 32: 283-294.
- Layne, J.N., 1952: The *os genitale* of the red squirrel, *Tamiasciurus*. Journal of Mammalogy 33(4): 457-459.
- Layne, J.N., 1954: The *os clitoridis* of some North American Sciuridae. Journal of Mammalogy 35(3): 357-366.
- Lidicker, W.Z., 1968: A phylogeny of New Guinea rodent genera based on phallic morphology. Journal of Mammalogy 49(4): 609-643.
- Lönnerberg, E., 1902: On the female genital organs of *Cryptoprocta*. Bihang till Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar 28(4): 11 pp.
- Lüpold, S., Mceligott, A G. & Hosken, D. J., 2004: Bat genitalia: allometry, variation and good genes. Biological Journal of the Linnean Society 83: 497-507.
- Miller, E. H., Pitcher, K. W. & Loughlin, K. W., 2000: Bacular size, growth, and allometry in the largest extant otariid, the Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*). Journal of Mammalogy 81(1): 134-144.
- Morris, P., 1972: A review of mammalian age determination methods. Zoology Department, Royal Holloway Colege, Egham, Surrey 2(3): 69-104.
- Murakami, R. & Mizuno, T., 1984: Histogenesis of the *os penis* and *os clitoridis* in rats. Development, Growth & Differentiation 26(5): 419-426.
- Murakami, R., 1986: Development of the *os penis* in genital tubercles cultured beneath the renal capsule of adult rats. Journal of Anatomy 149: 11-20.
- Oosthuizen, W. H., 2000: Bacular and testicular growth and allometry in the Cape fur seal *Arctocephalus p. pusillus* (Otariidae). Marine Mammal Science 16(1): 124-140.
- Parag, A., Bennet, N. C., Faulkes, C. G. & Bateman, P. W., 2006: Penile morphology African mole rats (Bathyergidae): structural modification in relation to mode of ovulation and degree of sociality. Journal of Zoology (London) 270: 323-329.

- Patterson, B. D. & Thaeler, C. S., 1982: The mammalian baculum: hypotheses on the nature of bacular variability. *Journal of Mammalogy* 63(1): 1-15.
- Reid F. A., 2006: A field guide to mammals of North America North of Mexico. Fourth Edition, Houghton Mifflin Company, Boston and New York 580 pp.
- Rinker, G. C., 1944: *Os clitoridis* from the raccoon. *Journal of Mammalogy* 25: 91-92.
- Robovský, J., Řičánková, V. & Zrzavý, J., 2008: Phylogeny of Arvicolinae (Mammalia, Cricetidae): utility of morphological and molecular data sets in a recently radiating clade. *Zoologica Scripta* 37(6): 571-590.
- van Sandwyk, J. H. d. T. & Bennett, N. C., 2005: Do solitary, seismic signalling Cape mole-rats, *Georchus capensis* demonstrate spontaneous or induced ovulation? *Journal of Zoology (London)* 267: 1-6.
- Scheffer, V. B., 1942: An *os clitoridis* from *Aplodontia*. *Journal of Mammalogy* 23: 443.
- Scheffer, V. B., 1949: The clitoris bone in two pinnipeds. *Journal of Mammalogy* 30: 269-270.
- Simokawa, S., 1938: Einige Bemerkungen über den Clitorisknochen. *Keiso Journal of Medicine* 9: 273-282.
- Simson, S., Lavie, B. & Nevo, E., 1993: Penial differentiation in speciation of subterranean mole rats *Spalax ehrenbergi* in Israel. *Journal of Zoology (London)* 229: 493-503.
- Smirnov, D. G. & Tsytsulina, K., 2003: The ontogeny of the baculum in *Nyctalus noctula* and *Vespertilio murinus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Acta Chiropterologica* 5(1): 117-123.
- Sovová, J., 2006: Popis morfologie bakula a *os clitoridis* u našich hlodavců (Rodentia). Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity. Bakalářská práce 1-47.
- Starck, D., 1995: Lehrbuch der Speziellen Zoologie, Band II. Wirbeltiere, 5. Teil: Säugetiere. Gustav Fischer Verlag, Jena – Stuttgart – New York, 1241 pp.
- Sumbera, R., Burda, H. & Chitaukali, N., 2003: Reproductive biology of a solitary subterranean bathyergid rodent, the silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*). *Journal of Mammalogy* 84(1): 278-287.
- Turner, W., 1913: The right whale of the North Atlantic, *Balaena biscayensis*: its skeleton described and compared with that of the Greenland right whale, *Balaena mysticetus*. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 4(33): 889-922 + 3 plates.

- Walton, K. C., 1968: The baculum as an age indicator in the polecat *Putorius putorius*.
Journal of Zoology (London) 156: 533-536.
- Wassersug, R. J., 1976: A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin fixed vertebrates. Stain Technology 51(2): 131-134.
- Wilcox, D., Dove, B., McDavid, D. & Greer, D., 1995-2002:ImageTool for Windows, Version 3.00 The University of Texas Health Science Center in San Antonio.
- Zeigler, A. C., 1960: Occurrence of *os clitoridis* in *Microtus*. Journal of Mammalogy 42(1): 101-103.
- Zejda, J. & Hrabě, V., 1973: The baculum and the duration of the period of reproductive activity in *Clethrionomys glareolus*. Zoologické listy 22(3):201-212.