

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Ekologie



Mgr. Tereza Schořálková

Hormonální kontrola pohlavně-dimorfních znaků ještěřů

Hormonal control of sexually dimorphic traits in lizards

Disertační práce

Školitel: prof. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Školitel-konzultant: RNDr. Lukáš Kubička, Ph.D.

Praha, 2017

Podíl autora na výsledcích zařazených do disertace

Kapitola I: Schořálková T., Kratochvíl L., Kubička L. (2017). Temporal organization: A novel mechanism of hormonal control of male-typical behavior in vertebrates. *Physiology and Behavior* 170: 151-156. IF₂₀₁₆ 2,34. *Korespondenční autor: Lukáš Kratochvíl*

Příspěvek autorky: Péče o experimentální zvířata, provedení hormonálních manipulací, příprava a provedení behaviorálních experimentů, vyhodnocování dat, spolupráce při odběrech krve, příprava obrázků do rukopisu, podíl na přípravě rukopisu

Kapitola II: Schořálková T., Kratochvíl L., Kubička L. Love or war? Hormonal control of sex recognition, male sexual behavior and aggression in the gecko lizard. Rukopis zaslaný k recenzi. *Korespondenční autor: Lukáš Kratochvíl*

Příspěvek autorky: Asistence při operacích, provedení hormonálních manipulací, příprava a provedení behaviorálních experimentů, vyhodnocování dat, příprava obrázků do rukopisu, podíl na přípravě rukopisu

Kapitola III: Schořálková T., Kratochvíl L., Kubička L. Are lizards paedophile? Sex recognition and female sexual attractiveness in the gecko. Rukopis zaslaný k recenzi.

Korespondenční autor: Lukáš Kratochvíl

Příspěvek autorky: Péče o experimentální zvířata, provedení hormonálních manipulací, příprava a provedení behaviorálních experimentů, vyhodnocování dat, spolupráce při odběrech krve, příprava obrázků do rukopisu, podíl na přípravě rukopisu

Kapitola IV: Kubička L., Schořálková T., Kratochvíl L. (2017). Ovarian control of growth and sexual size dimorphism in a male-larger gecko. *Journal of Experimental Biology* 220: 787-795.

IF₂₀₁₆ 3,32. *Korespondenční autor: Lukáš Kubička*

Příspěvek autorky: Asistence při operacích, provedení hormonálních manipulací, asistence při získávání morfologických dat, podíl na přípravě rukopisu

Prohlašujeme, že příspěvky Terezy Schořálkové k jednotlivým rukopisům, jak jsou zde uvedeny, jsou pravdivé a míru jejího zapojení do výzkumu odráží taktéž pořadí autorů.

V Praze 27. července 2017

Školitel: prof. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Školitel-konzultant: RNDr. Lukáš Kubička, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27. července 2017

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Lukáši Kratochvílovi a konzultantovi Lukáši Kubičkovi za jejich věcné rady při plánování a průběhu experimentů, prezentování výsledků a psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat Honzovi Červenkovvi za to, jak se stará o gekoní chovy (a nejen o ně), bez něj by to prostě nefungovalo. Velmi si toho všeho vážím.

Dále bych chtěla vyjádřit vděk své rodině a přátelům za jejich podporu, i když po většinu času určitě vůbec nechápali, o čem mluvím a proč to dělám. A můj největší dík patří osudu, který mi umožnil být tam, kde jsem, a ačkoliv to pro mě často nebylo vůbec jednoduché, tak věřím, že to všechno mělo nějaký účel.

Obsah	
Abstrakt.....	5
Abstract	6
Úvod	7

Hormonální kontrola pohlavně-dimorfních znaků ještěřů
Hormonal control of sexually dimorphic traits in lizards

Kapitola I.	26
-------------------------	-----------

Temporal organization: A novel mechanism of hormonal control of male-typical sexual behavior in vertebrates.

Tereza Schořálková, Lukáš Kratochvíl, Lukáš Kubička

Physiology and Behavior 170 (2017) 151-156

Kapitola II.	35
--------------------------	-----------

Love or war? Hormonal control of sex recognition, male sexual behavior and aggression in the gecko lizard

Tereza Schořálková, Lukáš Kratochvíl, Lukáš Kubička

Rukopis odeslaný k recenzi

Kapitola III.	66
---------------------------	-----------

Are lizards paedophile? Sex recognition and female sexual attractiveness in the gecko

Tereza Schořálková, Lukáš Kratochvíl, Lukáš Kubička

Rukopis odeslaný k recenzi

Kapitola IV.	85
--------------------------	-----------

Ovarian control of growth and sexual size dimorphism in a male-larger gecko

Lukáš Kubička, Tereza Schořálková, Jan Červenka, Lukáš Kratochvíl

Journal of Experimental Biology 220 (2017), 787-795

Závěr	98
--------------------	-----------

ABSTRAKT

Disertační práce se zabývá hormonální kontrolou pohlavního dimorfismu u ještěřů a je tvořena čtyřmi příspěvky. Pohlavní hormony jsou důležité pro vývoj a regulaci pohlavního dimorfismu, jednotlivé znaky jsou však ovlivňovány různými mechanismy. Samčí sexuální chování gekona *Eublepharis macularius* je regulováno testosteronem a lze jej úspěšně indukovat také u samic, jen náběh a vyhasínání jednotlivých prvků chování trvá déle než u samců. Nástup a vyhasínání znaků nejsou ani u jednoho pohlaví okamžité, s čímž je nutné v experimentech využívajících hormonální manipulace počítat, což se v předchozím výzkumu nedělo. U dalšího druhu gekona *Paroedura picta* stimuluje expresi samčího sexuálního chování u samic testosteron i dihydrotestosteron. Samčí ofenzivní agrese se však u samic objevuje pouze po dodání testosteronu, který tím, že je v mozku aromatizován na biologicky aktivní estradiol, patrně stimuluje ofenzivní chování jen nepřímo. Oba androgeny také u samic stimulují růst samčích kopulačních orgánů. Se sexuálním chováním obou druhů gekonů je spojené i rozpoznání pohlaví, které umožňují znaky vyvolané působením gonadálních androgenů u samců, kdežto pro rozpoznání jedince jako samice není nutný specifický samčí feromon kontrolovaný ovariálními hormony. Pohlavní rozdíly ve velikosti těla gekonů vznikají působením samičích ovariálních hormonů, kdežto samčí gonadální androgeny ani snížená reprodukční zátěž samic se na něm vůbec nepodílí a samci jsou v tomto ohledu spíše neutrálním pohlavím. Předkládaná disertační práce, která je zaměřená na dva modelové druhy významné skupiny šupinatých plazů – gekonů, do značné míry naborává obecné vžitě představy o endogenních mechanismech kontroly jednotlivých znaků pohlavního dimorfismu šupinatých plazů i obratlovců jako celku a přispívá tak k jejich hlubšímu poznání.

ABSTRACT

This Ph.D. thesis is focused on hormonal control of sexual dimorphism in lizards and is composed of four contributions. Sex steroid hormones are important for development and regulation of sexual dimorphism in reptiles, but particular traits are controlled by different endogenous mechanisms. Male sexual behaviour of the gecko *E. macularius* is controlled by testosterone and can be successfully induced in females, only the onset and cessation of the behaviour take longer than in males. The onset and cessation of particular traits are not immediate for both sexes, and this time component has to be taken into account in future experiments using hormonal manipulations. In other species of the gecko, *P. picta*, testosterone and dihydrotestosterone stimulates the expression of male sexual behaviour in females as well. Male offensive aggression occurs only in testosterone-treated females, probably due to its conversion to biologically active estradiol in the brain, testosterone thus stimulates offensive behaviour probably only indirectly. Both androgens also stimulate the growth of the male copulatory organs, hemipenes, in females, but in different way than the size of penis in male mammals. Sexual behaviour of both gecko species is associated with sex recognition, which is allowed by androgen-triggered cues in males, whereas female attractiveness pheromone controlled by ovarian hormones is not required for identification of an individual female as a sexually attractive female. Sexual size dimorphism in geckos is caused by growth feminization by ovarian hormones in females, whereas male gonadal androgens and female reproductive costs are not involved - males thus are rather neutral sex in the respect of growth control by gonadal hormones. This Ph.D. thesis, focused on two model gecko species, provides new insights into the current knowledge of endogenous mechanisms controlling particular components of sexual dimorphism in squamate reptiles and vertebrates as a whole.

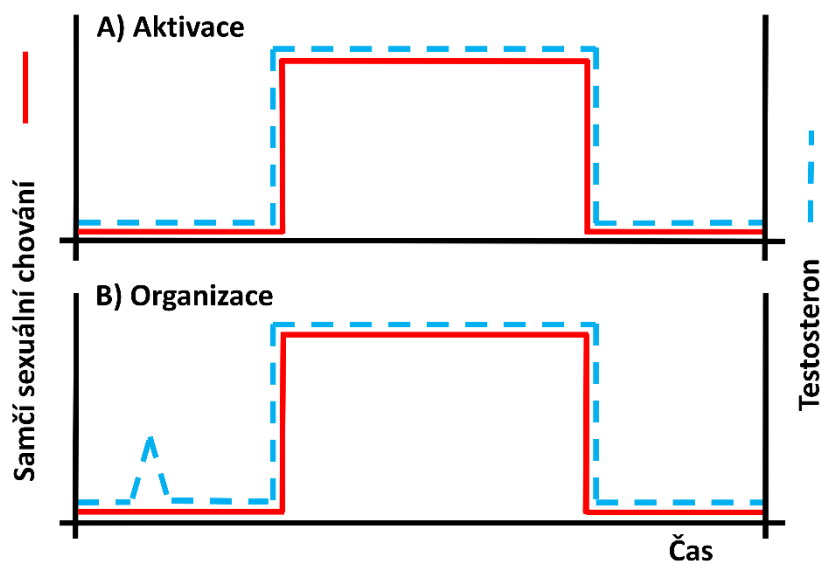
ÚVOD

Pohlavní dimorfismus se v určitých podobách vyskytuje u většiny živočichů. Kromě primárních pohlavních znaků (gonády) jsou pohlavně dimorfní i velikost a tvar těla (včetně různých výrůstků a zbarvení), a dále v širším kontextu pohlavně specifické sociální chování, pach či rychlost metabolismu (Greenberg, 1943; Cox a kol., 2005; Garland a Else, 1987). Pro plazy jsou některé pohlavně dimorfní znaky (zejména pach, zbarvení, či ritualizované pohyby) důležité také pro rozpoznávání pohlaví (například Crews 1975; López a Martín, 2001; pro hady shrnuto v Mason a Parker, 2010). Ačkoliv byly tyto znaky v minulosti hojně studovány, endogenní mechanismy jejich kontroly nejsou ještě dostatečně probádány, což přináší značný potenciál pro další zkoumání. Předkládaná disertační práce je proto zaměřena na endogenní regulaci exprese pohlavně dimorfních znaků gekonů (kteří jsou významnou skupinou šupinatých plazů) pomocí pohlavních steroidních hormonů, především androgenů a estrogenů. Ve snaze přinést odpovědi na základní otázky spojené s hormonální regulací plně využívá možností experimentální manipulace s hladinami vybraných hormonů a následným zhodnocením jejich vlivu na behaviorální a morfologické znaky, kterými se samci a samice liší. Cílem práce je přispět k objasnění proximálních mechanismů kontroly v klíčových znacích pohlavního dimorfismu šupinatých plazů.

Skupina gekoni *sensu lato* (Gekkota) zahrnuje přibližně jednu šestinu z více než 10 000 do dnešní doby popsanych druhů šupinatých plazů (Uetz a kol., 2017). Gekoni jsou významnou a různorodou skupinou s obrovským areálem rozšíření, u které můžeme často pozorovat výrazné projevy pohlavního dimorfismu. Mezi nejvýznamnější dimorfní znaky patří délka těla: mezi gekony se nacházejí druhy jak druhy s většími samci než samicemi, druhy monomorfní, tak i druhy kde jsou naopak samci menší pohlaví (Kratochvíl a Frynta, 2002; Kubička a kol., 2013; Starostová a kol., 2010). Dalším často studovaným pohlavně-dimorfním znakem je přítomnost samčího sexuálního a agonistického chování, které se obvykle skládá z několika poměrně jasně definovatelných stereotypních prvků (Golinski a kol., 2011, 2014, 2015; Rhen a Crews, 1999, 2000; Rhen a kol., 1999); dále to je pohlavně specifická produkce pachů sloužící k rozpoznávání pohlaví (Cooper a Steele, 1997; Mason a Gutzke, 1990; Mason a kol., 1987) a v neposlední řadě sem také patří subbuněčné vlastnosti jako pohlavní chromozomy určující pohlaví u druhů s genotypově určeným pohlavím (Koubová a kol., 2014; Pokorná a kol., 2010). Některé druhy gekonů však mají teplotně určené pohlaví (Pokorná a kol., 2010; Viets a kol., 1993), kdy obě pohlaví sdílejí

stejný genotyp (Flores a kol., 1994; Gutzke a Crews, 1988; Rhen a Crews, 1999). Pro všechny gekony je také typická tzv. invariantní snůška, kdy většina druhů klade pouze dvě vejce (vždy pouze jedno z každého ovaria) v rámci jedné snůšky (shrnuje v Kratochvíl a Frynta, 2006; Shine a Greer, 1991). Právě pro všechny tyto vlastnosti jsou gekoni velmi vhodnou skupinou pro studium komplexních projevů pohlavního dimorfismu a jeho endogenních mechanismů z proximálního i ultimálního hlediska. Zjištěné poznatky společně s poznatky u jiných skupin šupinatých plazů pak umožňují nastínit trendy v evoluci endogenní kontroly pohlavního dimorfismu v rámci celé této významné skupiny obratlovců.

Pohlavně dimorfní znaky jsou často dávány do souvislosti s pohlavními hormony. Platí to zejména u druhů s environmentálně určeným pohlavím, kde se obě pohlaví liší pouze ve fenotypu, ne v genotypu. Ale i pro druhy s genotypově určeným pohlavím, kde jsou geny pro pohlavně dimorfní znaky navázané na autozomy, jsou pohlavně specifické hladiny gonadálních steroidů pro expresi těchto znaků také zásadní (například Crews a kol., 1978; Wilson a kol., 1981). Podle klasické, tzv. „aktivační“ hypotézy mají pohlavně specifické hormony na expresi určitých znaků okamžitý (tj. aktivující) účinek (Obr. 1A). Pro vyvolání těchto znaků stačí pouze zvýšení aktuálních hladin příslušných hormonů v organismu, při jejich případném poklesu (často sezónním) dochází k vymizení znaků (Arnold a Breedlove, 1985); experimentálně lze tyto znaky aktivovat u jedinců obou pohlaví zvýšením hladin příslušných hormonů cirkulujících v krvi. Podle druhé klasické, tzv. „organizační“ hypotézy je však pro expresi dalších znaků v dospělosti jedince, kromě aktuálně zvýšených hladin příslušných hormonů, potřeba i jejich zvýšení během senzitivního období (například někdy během rané ontogeneze či během puberty, Obr. 1B), což má dlouhodobý organizující účinek (Phoenix a kol., 1959). Podle této hypotézy jedinci, kteří neměli v tomto senzitivním období zvýšené hladiny hormonů (typicky se to týká toho pohlaví, které má hladiny příslušného hormonu nízké – např. androgeny u samic), v dospělosti nereagují na experimentální zvýšení hladin hormonů, protože nemají „naorganizované“ příslušné endogenní dráhy vedoucí k expresi sledovaného znaku.

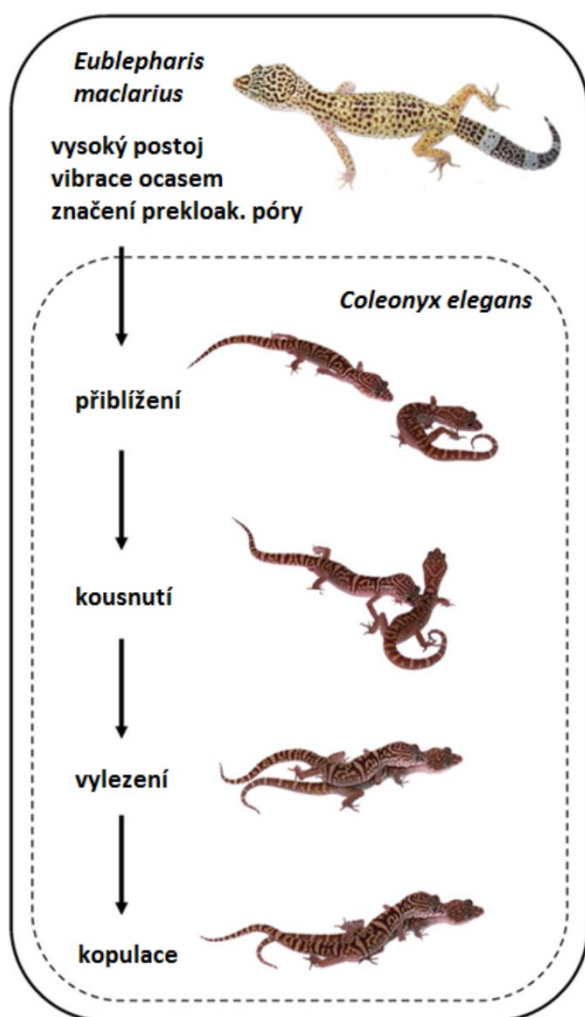


Obr. 1 Schéma účinků testosteronu na samčí sexuální chování podle hypotézy aktivace a organizace.

Modifikováno ze Schořálková a kol., 2017.

Hypotézy aktivace a organizace, které byly postulovány na základě savčích behaviorálních studií, byly v nedávné době testovány také u šupinatých plazů, a to i v rámci naší pracovní skupiny. Bylo překvapující, jak se blízké příbuzné druhy gekonů liší v tom, zda u nich samčí sexuální chování podléhá organizaci, nebo jestli jej lze rovnou pomocí experimentálně zvýšených hladin testosteronu (T) aktivovat i u samic (Golinski a kol., 2011, 2014, 2015; Rhen a Crews 1999). Při zpětném pohledu jsme si uvědomili, že se studie lišily délkou působení T a že délka experimentu je úměrná počtu samic s prokazatelně samčím sexuálním chováním. Pro test načasování vlivu T na samčí sexuální chování jsme připravili experiment s hormonálními manipulacemi u gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*), jež představuje první kapitolu této disertační práce. Jedná se o druh, u kterého bylo na základě předchozího experimentu předpokládáno, že samčí sexuální chování je nutné u samic organizovat, protože samice na experimentálně zvýšené hladiny T nereagovaly, dřívější experiment však trval pouze 4 týdny (Rhen a Crews, 1999). Pro náš experiment bylo výhodné, že samci tohoto druhu mají na rozdíl od většiny ostatních testovaných gekonů (například druhy *Paroedura picta*, *Coleonyx elegans*) komplexní

sexuální chování, sestávající se z fáze dvoření a vlastního kopulačního chování (Obr.2, Golinski a kol., 2011).



Obr. 2 Schéma komplexního (*Eublepharis macularius*) a zjednodušeného (*Coleonyx elegans*) samčího sexuálního chování. Modifikováno z Golinski a kol., 2011.

Jednotlivé prvky sexuálního chování jsou poměrně snadno rozlišitelné – např. vibrace ocasu je nezaměnitelný stereotypní prvek chování, který samci tohoto druhu předvádějí pouze v přítomnosti samice. Cílem předložené studie bylo objasnit, jaké prvky samčího sexuálního chování ovlivňuje T a zda je všechny lze úspěšně indukovat u juvenilních samic a prepubertálně kastrovaných samců. Juvenilní samice neprošly během vývoje organizací samčími hormony a prepubertálně kastrování samci byli zvoleni z důvodu minimalizace vlivu samčích pohlavních hormonů, které jsou během puberty produkovány ve zvýšené míře a

mohou tak přispět k naorganizování sexuálního chování. U plazů nebyl dosud řádně zdokumentován vliv hormonů v pubertě, ale například v experimentech, které byly provedeny na modelu křečka syrského, se ukázal významný vliv samčích gonadálních hormonů na pubertální organizaci samčího sexuálního a agonistického chování (Schulz a kol., 2004; Schulz a Sisk, 2006).

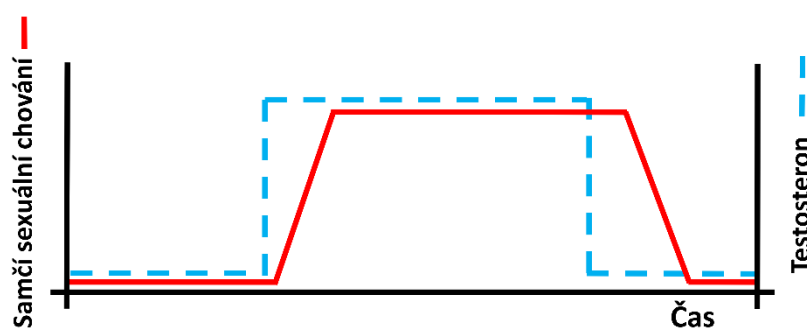
Práce v první kapitole je také unikátní svým designem. Experimentální skupiny dostávaly v pravidelných intervalech takové dávky T, aby hladiny cirkulujících hormonů zůstaly na fyziologické hodnotě dospělých samců. Obecně se dodání exogenních hormonů provádí několika různými metodami. Mezi nejpoužívanější přístupy patří použití injekcí

s rozpuštěnými hormony do různých míst (břišní dutina, specifické oblasti mozku; Mason a Adkins, 1976), hormonálních implantátů pod kůži nebo do břišní dutiny (Crews a kol., 1996; Golinski a kol., 2011, 2014, 2015; Kubička a kol., 2013; Rhen a Crews 1999, 2000; Starostová a kol., 2013), či kožní aplikace hormonů rozpuštěných v nosném médiu (v případě steroidů v oleji), které umožní vstřebání přes pokožku (Meylan a kol., 2003; Trompeter a Langkilde, 2011). Použili jsme poslední jmenovaný způsob aplikace, který je pro plazy nejméně invazivní, oproti ostatním metodám jsou jednotlivé dávky pro organismus po celou dobu experimentu vyrovnané a přizpůsobitelné požadavkům konkrétních úloh. Mezi nejdůležitější výhody patří, že hormonální manipulaci lze snadno ukončit a její účinky jsou z velké části vratné (Meylan a kol., 2003; osobní pozorování).

Oproti předchozím studiím se náš experiment lišil také v délce – zatímco náš trval kolem 10 až 20 měsíců, některé předchozí experimenty byly ukončeny již po 4 až 10 týdnech (Golinski a kol., 2011, 2015; Rhen a Crews, 1999). Díky takto dlouhému trvání našeho experimentu bylo u manipulovaných juvenilních samic a prepubertálních kastrátů možné sledovat postupný nástup jednotlivých prvků samčího sexuálního chování, respektive jejich vyhasínání po přerušení dodávání T. Tento experiment mimo jiné také poukázal na důležitost pečlivého sledování pokusných zvířat po dostatečně dlouhou dobu, což je často velmi odlišné od zažitých experimentálních postupů.

Navrhli jsme další obecnou možnost, jak mohou hormony působit na expresi pohlavně-dimorfních znaků a tou je hypotéza tzv. „dočasné organizace“, která říká, že znaky je možné v dospělosti přechodně organizovat u obou pohlaví dlouhodobým vystavením zvýšeným hladinám hormonů. Nástup znaků není okamžitý, na rozdíl od předpokladů aktivační hypotézy, ale má určité zpoždění. Toto zpoždění je s největší pravděpodobností specifické jak pro různé druhy, tak i v rámci druhu pro jednotlivá pohlaví; může se ale také lišit pro vyvolání jednotlivých znaků. Podobná situace bude následovat po snížení hladin hormonů – nebude se jednat o okamžité vymizení znaku, ale o postupné vyhasínání, jak dochází k degradaci hormonů stimulovaných neurálních drah (Obr. 3). Dočasná organizace má potenciál vysvětlit rozdílný výskyt exprese samčího sexuálního chování v hormonálně manipulačních experimentech u blízce příbuzných druhů gekonů (tj. Golinski a kol., 2011, 2014, 2015, Rhen a Crews, 1999) a to díky rozdílům v designu experimentů, respektive v délce hormonální manipulace před behaviorálním testováním a opakování jednotlivých behaviorálních testů. Dočasná organizace může být ancestrálním stavem a být tak široce rozšířeným regulačním mechanismem i mezi dalšími

obratlovci (například lze tímto mechanismem vysvětlit překvapivé výsledky studie u pěvců: Moore a Kranz, 1983 či žab: Harvey a Propper, 1997), přičemž zpoždění nástupu a vyhasínání znaků oproti hladinám hormonů může být adaptivní a v extrémní podobě může pomoci vzniku takzvané disociované reprodukční strategie. Jedná se o jev, kdy není reprodukční chování doprovázeno aktivitou gonád a zvýšenými hladinami pohlavních hormonů (shrnuje ve Woolley a kol., 2004). Nejstudovanějším zástupcem s touto strategií je severoamerická užovka *Thamnophis sirtalis parietalis* (Crews, 1984). Mechanismus dočasné organizace může pomoci objasnit výsledky kastročních experimentů, provedených před i po zimování, které nezrušily sexuální chování samců, stejně tak pozorování nízkých hladin androgenů a gonád v regresi během období rozmnožování. Nezávislost sexuálního chování na aktuálních hladinách androgenů umožňuje existenci velmi krátkého období rozmnožování v nepříznivém klimatu, kdy je potřeba rychlé reakce po probuzení v zimovištích (např. Crews a kol., 1984; Krohmer, 2004).



Obr. 3 Schéma účinků testosteronu na samčí sexuální chování podle hypotézy dočasné organizace. Modifikováno z Schořálková a kol., 2017.

Někdy lze jen velmi obtížně identifikovat hormon, který kontroluje pohlavně specifické znaky. Pohlavní hormony mohou být v organismu přeměňovány na další produkty. Z tohoto pohledu se může T jevit pouze jako prohormon, který je buď pomocí enzymu aromatázy přeměněn na aktivní formu estradiol (E_2) nebo pomocí alfa-reduktázy na aktivní formu dihydrotestosteron (DHT) (Nelson, 2011). DHT už však nelze aromatizovat na E_2 . Přítomnost typických samčích prvků sociálního chování, ať už se jedná o agresivitu či sexualitu, obvykle bývá přisuzována působení androgenů, zatímco přítomnost samičích typických znaků bývá přisuzována působení estrogenu či progesteronu. Studie zabývající se hormonální kontrolou samčího sexuálního chování často

potvrzují vliv T (Adkins a Schlesinger, 1979; Crews a kol., 1978), jiné ale potvrzují i vliv jeho metabolitů DHT a E₂ (Adkins a Schlesinger, 1979; Crews a Morgentaler, 1979; Tokarz, 1986), ale u dalších se vliv DHT a E₂ nepotvrdil (Crews a kol., 1978; Rosen a Wade, 2000). Pro hormonální kontrolu samčí agresivity jsou navrženy tři možné dráhy působení pohlavních steroidů a podobně by tomu mohlo být s regulací sexuálního chování. První, na androgeny senzitivní dráha, zahrnuje působení T a jeho androgenních metabolitů (jako je DHT), druhá je na estrogény senzitivní dráha zahrnující aromatizaci T na E₂, který teprve je biologicky aktivní v expresi znaku, a třetí dráha propojuje dva předchozí mechanismy působení androgenních i estrogenních metabolitů (Simon a kol., 1996). Podle další studie může expresi samčího sexuálního chování stimulovat samotný T, ne však jeho metabolity (Simon a Masters, 1987), tyto závěry ale byly zjištěny pouze u jediného kmenu laboratorních myši a nepředpokládá se širší výskyt této endogenní dráhy. Právě osvětlením působení jednotlivých gonadálních hormonů na samčí sociální chování se zabývá druhá kapitola disertační práce, která řeší otázku hormonální kontroly samčího sexuálního a agonistického chování u gekona madagaskarského (*Paroedura picta*). Cílem experimentu bylo otestovat vliv dlouhodobě dodávaného T a nearomatizovatelného DHT na expresi typických samčích prvků chování u ovariektomizovaných samic. Oba androgeny, T i DHT, vyvolaly u manipulovaných samic samčí sexuální chování. Ovšem ofenzivní agresi u těchto samic stimuloval pouze T. Příčinou podle nás je, že DHT nelze aromatizovat na E₂, který se zdá být u obratlovců, včetně plazů, pro expresi samčí agresivity zásadní (Heimovics a kol., 2015; Huffman a kol., 2013; Schlinger a Callard, 1990; Woodley a Moore, 1999; Wu a kol., 2009). To nejspíš platí i u našeho modelového ještěra, pro kterého se aromatizace T na E₂ pro vyvolání ofenzivního chování zdá být také podmínkou. Zajímavé bylo také sledovat vliv jednotlivých hormonů na vývoj samčích kopulačních orgánů – hemipenisů. Obecně je u obratlovců vývoj samčího kopulačního orgánu spojovaný právě s gonadálními androgeny. Např. u savců je maskulinizace zevního genitálu úzce spjata s hladinami DHT (Wilson a kol., 1981). Hemipenis plazů však není s penisem savců homologický (Porto a kol., 2013). Také u samic některých plazů byly nalezeny základy či zmenšené verze hemipenisů (dokonce i u juvenilních samic stejného druhu; Kubička, 2006) a s nimi asociované svaly a motoneurony (Böhme, 1995; Holmes a kol., 2005). Navíc v experimentech s navýšením hladin T došlo u samic plazů ke zvětšení těchto struktur (Golinski a kol., 2011, 2014, 2015; Holmes a kol., 2005; Kubička a kol., 2013; Rhen a kol., 1999). Tento zvětšený samčí hemipenis je k nerozeznání od samčího a funkční – samice

s ním mohou kopulovat (osobní pozorování). Výsledky této části experimentu jsou rovněž překvapující. T i DHT způsobily u samic zvětšení těchto struktur, ale přesto měly samice s DHT tyto struktury signifikantně menší než samice s T a kontrolní samci, což je v protikladu s kontrolou růstu savčího penisu.

Předmětem této studie však nebylo pouze sledování behaviorálních či morfologických změn u androgeny manipulovaných ovariektomizovaných samic, ale také to, jak jsou tyto samice rozpoznávány nemanipulovanými samci. Sexuální a agonistické chování je totiž úzce propojené se schopností jedinců rozpoznat pohlaví dalších jedinců stejného druhu, se kterými přichází do kontaktu. Pro jedince může nebo nemusí být výhodné nechat se rozpoznat, ovšem schopnost rozpoznat pohlaví druhého jedince je nezbytná pro zvolení správného způsobu reakce a je často otázkou života či smrti. Obecně je více možností, jak rozpoznat pohlaví druhého jedince – často dokumentovaná je schopnost rozpoznání pohlaví na základě optických, olfaktorických či vomeroolfaktorických vjemů (například Bauwens a kol., 1987; Ferkin a Johnston, 1995; Vos, 1995). Dle preferovaného způsobu rozpoznávání se pak odvíjí i vybavenost jedinců odpovídajícími znaky. U plazů byly možnosti rozpoznání pohlaví dosud studovány jen v několika experimentech. U druhů s větší barevnou diverzitou povrchu těla, kde samice a mláďata mají odlišné a často méně výrazné zbarvení než samci (Greenberg a Noble, 1944; López a kol., 2002, 2003; Stuart-Fox a Ord, 2004), se předpokládá větší důležitost vizuálních signálů pro rozpoznávání pohlaví. Zároveň byla u těchto druhů také zdokumentována významnost chemických signálů a chemorecepce, a to hlavně na kratší vzdálenosti (*Podarcis hispanica* López a Martín, 2001). U dalších druhů pravděpodobně převažuje chemorecepce (například *Coleonyx variegatus* Greenberg, 1943; *Eublepharis macularius* Cooper a Steele, 1997; *Vipera berus* Andrén, 1982; *Thamnophis sirtalis parietalis* Kubie a kol., 1978; Noble, 1937). V této oblasti je dobře prozkoumaným organismem severoamerická užovka *Thamnophis sirtalis parietalis*. Na základě hormonálních experimentů došli autoři k názoru, že u tohoto druhu rozpoznávání pohlaví probíhá pomocí detekce specifických semiochemikálií a samice mají speciální feromon atraktivity asociovaný s lipidy v pokožce a některých dalších tělních strukturách (Garstka a Crews, 1981). Samci reagují na tuto semiochemikálii dvořením (Mason a kol., 1989) a byl prokázán pozitivní efekt estrogenů na jeho produkci (Garstka a Crews, 1981; Mendonça a Crews, 1996; Parker a Mason, 2012). Zpočátku bylo chemické složení spojováno s vitelogeninem (Garstka a Crews, 1981), později byly pomocí extrakcí chemických látek

z pokožky objeveny složky, kterými se samci a samice odlišují (Mason a kol., 1987, 1989). Samice mají v pokožce obsažené nasycené a mononenasycené ketony s dlouhými řetězci, samci pravděpodobně látky na způsob skvalenu. V nedávné době se prokázala důležitost samčích hormonů pro rozpoznání pohlaví, přičemž kastrování samci byli atraktivní pro jiné samce (Parker a Mason, 2014). Tito autoři výsledky interpretovali jako doklad inhibičního vlivu samčích gonadálních androgenů na feromon samičí atraktivity. Feromon samičí atraktivity je podle nich stimulován gonadálními estrogeny u samic a naopak inhibován gonadálními androgeny u samců. Podle těchto autorů je navíc tento mechanismus rozpoznávání u šupinatých plazů rozšířený. Podle dalších autorů mohou hormony na vývoj znaků odpovědných za rozpoznávání pohlaví šupinatých plazů působit v základě dvěma způsoby. Prvním je možnost, že androgeny a estrogeny působí opačně na feromon samičí atraktivity, druhým je, že estrogeny mají vliv na samičí semiochemikálie a androgeny na samčí (Rhen a Crews, 2000). Právě v rámci druhé kapitoly jsme chtěli v neposlední řadě také prozkoumat existenci feromonu samičí atraktivity u gekona *P. picta* pomocí testování atraktivity ovariektomizovaných samic a dále zhodnotit maskulinizující vliv samčích androgenů T a DHT na znaky odpovědné za rozpoznávání pohlaví. Potřebu feromonu samičí atraktivity jsme nepotvrdili, ve skutečnosti byly ovariektomizované samice stejně atraktivní jako rozmnožující se kontrolní samice. Naopak skupiny s dodanými androgeny byly převážně napadány, a to hlavně samice s T, které byly agresivní vůči samcům. Samice s DHT byly z části napadány a z části pářeny, domníváme se, že byly nejspíš také rozpoznány jako samci, ale pravděpodobně díky jejich pasivitě, patrně způsobené nemožností aromatizovat DHT na E₂, docházelo i k jejich páření. Pro některé druhy obratlovců je typickým znakem dominantního samce páření submisivního samce (Adkins-Regan, 2014; Bailey a Zuk, 2014) a páření mezi samci bylo pozorováno i u kontrolních testů v rámci této studie. Problematika vlivu dominance a pasivity v sexuálním a agonistickém chování ještěřů je však dosud jen málo studovaná a je ji proto potřeba dále experimentálně testovat.

Třetí kapitola této práce pak obsahuje detailní test hormonální kontroly znaků umožňujících rozpoznávání pohlaví u gekončíka *E. macularius*. V minulosti bylo na základě výsledků u tohoto druhu navrženo, že samci reagují primárně agresivně na jedince, u kterých nedokáží rozpoznat pohlaví, přičemž pro rozpoznání jedince jako samice je nutný feromon samičí atraktivity (Mason a Gutzke, 1990). To je v rozporu s naším zjištěním

z druhé kapitoly, kde se u druhu *P. picta* nepotvrdila existence tohoto feromonu a ukázalo se, že samci útočí pouze na jedince maskulinizované androgeny, a to především T, přičemž na ostatní jedince reagují spíše sexuálním chováním. Mason a Gutzke (1990) testovali reakce samců na samice, které se nacházely těsně před obdobím svlékání kůže a porovnávali je s reakcemi pozorovanými minimálně pět dní před svlékáním a jeden den po svlékání. V tomto testu bylo ve všech případech pozorováno napadení samice, která byla těsně před obdobím svlékání pokožky, tj. vrchní vrstva její pokožky měla šedavé či mléčné zabarvení, ale byla stále ještě celistvá. Před tímto obdobím a po něm samci reagovali na samice dvořením. Autoři vysvětlovali tuto situaci tak, že odloučená vrstva pokožky zabraňuje uvolňování feromonu samičí atraktivitu do okolí a samice není rozpoznána jako samice a proto napadena. Strategie napadání jedinců pouze na základě nerozpoznání jako samic by ovšem byla evolučně nevýhodná. U tohoto druhu nejsou dosud známy detailní informace o způsobu života a sociální struktuře v přirozeném prostředí, ale v zajetí je *E. macularius* teritoriální druh a samci, pokud jsou spolu, reagují silně ofenzivně (Kratochvíl a Frynta, 2002; vlastní pozorování). V přírodních podmínkách by bylo krajně nevýhodné, pokud by samec odháněl svlékající samici ze svého teritoria kvůli tomu, že ji správně nerozpoznal. Výhodnější by naopak bylo, pokud by rozpoznání pohlaví obecně fungovalo na principu detekce samotných androgenů nebo sloučenin či znaků, které androgeny ovlivňují, a útočit pouze na jedince, kteří jsou tímto způsobem vyhodnoceni jako samci a s ostatními se pokusit kopulovat (jako je tomu v případě naší studie u *P. picta* v druhé kapitole předkládané práce). U mnoha druhů šupinatých plazů včetně *E. macularius* byla pozorována úschova spermií v těle samice po delší časové období, povětšinou v řádu týdnů a měsíců (LaDage a kol., 2008; Sever a Hamlett, 2002). Proto se zdá být obecně výhodnější strategií páření s jedincem, který nevykazuje znaky závislé na androgenech, tj. není rozpoznán jako samec. Pro zjištění platnosti výše uvedených hypotéz jsme se rozhodli otestovat reakce samců *E. macularius* na právě se svlékající samice a na samice mimo toto období, dále jak budou samci vnímány juvenilní samice (včetně čerstvě vylíhlých mláďat), kastrovaní samci a samice s experimentálně zvýšenými hladinami T a DHT. Předpokladem bylo, že pokud by byla pro rozpoznání jedinců jako samic nutná feminizace znaků samičími hormony, tak budou rozpoznány pouze kontrolní samice mimo období svleku, které budou mít vyšší hladiny samičích hormonů, přičemž ostatní skupiny budou napadány. Nutnost feminizace znaků k tomu, aby byl jedinec rozpoznán jako samice, se ovšem ani u tohoto druhu nepotvrdila. Kastrovaní samci byli pro samce sexuálně atraktivní, i když měli ze

všech skupin nejnižší hladiny E₂. Samci se dvořili také kontrolním i juvenilním samicím včetně čerstvě vylíhlých mláďat. Naopak vůči kontrolním samcům a T i DHT manipulovaným samicím byli agresivní. Zároveň se ukázalo, že svlékání samců ani samic nemá na jejich rozpoznání vliv, samci se k nim v tomto období chovali stejným způsobem jako mimo toto období. Mechanismus rozpoznávání pohlaví je tak u *E. macularius* obdobně jednoduchý jako u *P. picta* – samec k libovolnému konspecifickému jedinci přistupuje jako k samici, pokud jej díky androgeny maskulinizovaným znakům nerozpozná jako samce.

Poslední kapitola mé disertační práce se zabývá endogenní kontrolou pohlavního dimorfismu ve velikosti těla. Jak už bylo zmíněno, mezi plazy nacházíme jak druhy s většími samci, tak s většími samicemi, či druhy monomorfní (shrnutí v Cox a kol., 2009). Mláďata obou pohlaví se líhnou s vyrovnanou velikostí, ale v dospělosti se svojí délkou těla a hmotností často odlišují (Frynta a kol., 2010; Kratochvíl a Frynta, 2002; Kubička a kol., 2013; Starostová a kol., 2010, 2013). Z ultimátního hlediska se samci a samice liší proto, že zastávají rozdílné reprodukční nebo ekologické role (Fairbain a kol., 2007). Obecně předpokládaný mechanismus vzniku pohlavního dimorfismu ve velikosti těla je na proximální úrovni spojován s pohlavně rozdílnou investicí do růstu, nebo jiným endogenním mechanismem ovlivňující přímo růst. Rozdílná investice do růstu může být způsobena rozdílnou alokací energie do reprodukce, protože dostupná energie může být vložena do rozmnožování, ale na úkor růstu. To pohlaví, které více investuje do rozmnožování, nemůže vkládat tolik energie do růstu jako pohlaví druhé, příkladem mohou být samci, kteří bojují o samice a obhajují teritoria, či samice, které musí více investovat do péče o potomky. Souhrnně se tímto jevem zabývá tzv. „hypotéza investice do reprodukce“ (Cox a John-Alder 2005, Cox a Calsbeek 2010). V experimentech, které testovaly vliv reprodukce na růst samic a jejich finální velikost (Cox a Calsbeek, 2010; Starostová a kol., 2013), ovariektomizované samice druhů s většími samci dorostly větších rozměrů než rozmnožující se samice. Avšak samice, kterým byla zabráněna reprodukce tím, že byly drženy celý život v izolaci a jejich investici do reprodukce tak byla nulová, dorostly stejných rozměrů jako pravidelně se rozmnožující samice s enormní reprodukční zátěží (Starostová a kol., 2013). Navíc se u druhu *P. picta* zjistilo, že samice investují dostupné zdroje energie nejprve do růstu a až poté do reprodukce. Pokud jim to ještě dostupnost zdrojů umožní, tak až úplně nakonec investují zbylou energii do tukových zásob (Kubička a Kratochvíl, 2009). Je tedy zřejmé, že minimálně u některých plazů nelze rozdíly

ve velikosti těla mezi pohlavími spolehlivě vysvětlit pomocí vlivu zvýšené investice do reprodukce.

Na délku těla má vliv i přítomnost hormonů. V manipulativních experimentech u leguánů rodu *Sceloporus* měl T pozitivní vliv na růst samců u druhu s většími samci, a naopak negativní u druhu s většími samicemi (Cox a John-Alder, 2005). Cox a John-Alder (2005) na základě těchto výsledků vyslovili „hypotézu dvojího vlivu T“ na růst samců s tím, že T může působit buď přímo (např. vlivem na produkci růstového hormonu, či somatomedinů jako je insulin-like growth factor-1), nebo nepřímo (ovlivněním chování či fyziologie, což může mít dopad na získávání energie a následné možnosti investice do růstu). V následujících experimentech se potvrdil vliv androgenů i na růst samic, přičemž zvýšení hladin T stimulovalo růst samic u druhů s většími samci dosažení větší velikosti (*P.picta*: Starostová a kol., 2013, *Anolis sagrei*: Cox a kol. 2014) a zase naopak u druhu s většími samicemi mělo za následek zpomalení růstu (*Aeluroscalabotes felinus* Kubička a kol., 2013). Překvapivě však nebyl u žádného z těchto druhů pozorován vliv kastrace na růst samců – kastráti i kontrolní samci dorůstali vždy shodných rozměrů (Cox a kol., 2009; Kubička a kol., 2013; Starostová a kol., 2013). Stejně výsledky přinesl také experiment, kde byly sledovány a kontrolovány i nepřímé efekty T na růst samců, mezi které patří vliv na termoregulaci, rychlost metabolismu a chování (Kubička a kol., 2015). Přitom dle hypotézy vlivu T by kastrace měla mít na samce výrazný demaskulinizační vliv a měli by se v projevech pohlavního dimorfismu od kontrolních samců lišit. Jediným podstatným rozdílem v morfologii však bylo podstatné zmenšení hemipenisů u kastrovaných samců (Golinski a kol., 2014, Kubička a kol., 2013, 2015). Zároveň se zjistilo, že T způsobuje výraznou regresi ovarii, což má nepochybně vliv na jejich normální funkci (Starostová a kol., 2013). Autoři prací Kubička a kol. (2013) a Starostová a kol. (2013) se proto domnívají, že pozorovaný vliv T na růst samic nemusí být přímý, ale nepřímý přes předpokládanou omezenou produkci ovariálních hormonů ze zakrnělých gonád.

Doposud však byla tato hypotéza testována jen nepřímo, proto jsme se v rámci čtvrté kapitoly předkládané disertační práce rozhodli otestovat přímý vliv ovariálních hormonů na samičí růst. Experimentální skupiny druhu *P. picta* byly zvoleny s ohledem na přechodí experimenty. Pro test hypotézy investice do reprodukce byla jedné skupině samic odstraněna pouze jedna gonáda, přičemž druhé ovarium zůstalo funkční, což mělo za následek sníženou investici do potomků, avšak přirozeně cyklující hladiny ovariálních hormonů zůstaly zachovány. Tady se projevuje výhoda gekonů, protože neumí

manipulovat s počtem vajec v rámci jedné snůšky (např. Kubička a Kratochvíl 2009), nedochází u nich po odstranění jednoho ovaria ke zvýšené kompenzační ovulaci folikulů v rámci zachovaného ovaria, jak se tomu děje u druhů s variabilním počtem vajec ve snůšce (např. Jones a kol., 1977). Pro rozlišení, zda je růst samic pomocí exogenního T maskulinizován nebo defeminizován, bylo důležité srovnání finální velikosti těla mezi ovariektomizovanými samicemi a ovariektomizovanými samicemi s experimentálně zvýšenými hladinami T. Pro test, zda není pro růst nutná aromatizace T na estrogény, byla další skupině ovariektomizovaných samic uměle zvýšena hladina DHT. Pro testování přímého vlivu ovarialních hormonů na růst samic byly použity ovariektomizované samice s experimentálně zvýšenou hladinou E₂. Pro odfiltrování případného vlivu ovarialních hormonů v pubertě byla jedna skupina samic ovariektomizována v nižším věku než ostatní ovariektomizované skupiny. V neposlední řadě skupina nemanipulovaných samců a rozmnožujících se samic sloužila jako kontrola. Dle našich výsledků je patrné, že androgeny nemají u zkoumaného druhu přímý vliv na pohlavní dimorfismus ve velikosti těla. Ovariektomizované samice se zvýšenými hladinami androgenů (T i DHT) dorostly do srovnatelné velikosti jako obě skupiny samic, které byly pouze ovariektomizované, přičemž délka jejich těla byla srovnatelná i s délkou kontrolních samců. Menší délky těla než předchozí skupiny dosáhly kontrolní samice a samice s jednostrannou ovariektomií, které se pravidelně rozmnožovaly a měly srovnatelné hormonální profily. Jednostranně ovariektomizované samice však měly přibližně o polovinu sníženou investici do potomků, přesto dorostly stejných rozměrů jako kontrolní samice, které investovaly do svých potomků daleko více. Neprokázal se ani vliv snížené investice do reprodukce na růst samic. Tyto dvě skupiny se kromě velikosti od ostatních odlišovaly také shodně zvýšenými hladinami progesteronu, který je v tomto případě, protože se jedná o množící se samice, ovarialního původu. Skupinou s nejmenšími jedinci byly ovariektomizované samice s experimentálně zvýšenými hladinami E₂, tento hormon tedy jako jediný výrazně zpomalil růst manipulovaných jedinců. E₂ ale také může mít výrazné negativní účinky na zdravotní stav pokusných jedinců, jak jsme se přesvědčili v našem předběžném experimentu. A i když manipulované samice před ukončením této části experimentu ještě nevykazovaly výrazné zdravotní potíže, nelze přesto bezpečně odlišit, jestli se jedná o přímý vliv E₂ na velikost těla samic nebo zda jde o vliv nepřímý přes jejich možný zhoršený zdravotní stav. Celkově je ale patrné, že jediná hypotéza, která vysvětlí rozdíl ve velikosti těla mezi samci a

samicemi gekona *P. Picta*, je hypotéza ovariálních hormonů - at' už se jedná o efekt E₂, progesteronu, či jiného ovariálního hormonu.

Použitá literatura

- Adkins-Regan E. (2014) Male-male sexual behavior in Japanese quail: Being "on top" reduces mating and fertilization with females. *Behavioural processes* 108: 71-79.
- Adkins E., Schlesinger, L. (1979) Androgens and the social behavior of male and female lizards (*Anolis carolinensis*). *Hormones and Behavior* 13: 139-152.
- Andrén C. (1982) The role of the vomeronasal organs in the reproductive behavior of the adder *Vipera berus*. *Copeia* 1982: 148-157.
- Arnold A.P., Breedlove S.M. (1985) Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior - A reanalysis. *Hormones and Behavior* 19: 469-498.
- Bailey N.W., Zuk M. (2009) Same-sex sexual behavior and evolution. *Trends in ecology & evolution* 24: 439-446.
- Bauwens D., Nuijten K., van Wezel H., Verheyen R.F. (1987) Sex recognition by males of the lizard *Lacerta vivipara*: An introductory study. *Amphibia-Reptilia* 8: 49-57.
- Böhme W. (1995) Hemictitoris discovered: a fully differentiated erectile structure in female monitor lizards (*Varanus* spp.) (Reptilia: Varanidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 33: 129-132.
- Cooper W.E., Steele L.J. (1997) Pheromonal discrimination of sex by male and female leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Journal of Chemical Ecology* 23: 2967-2977.
- Cox R.M., John-Alder H.B. (2005) Testosterone has opposite effects on male growth in lizards (*Sceloporus* spp.) with opposite patterns of sexual size dimorphism. *Journal of experimental biology* 208: 4679-4687.
- Cox R.M., Skelly S.L., Leo A., John-Alder H.B. (2005) Testosterone regulates sexually dimorphic coloration in the eastern fence lizard, *Sceloporus undulatus*. *Copeia* 2005: 597-608.
- Cox R.M., Stenquist D.S., Calsbeek R. (2009) Testosterone, growth and the evolution of sexual size dimorphism. *Journal of evolutionary biology* 22: 1586-1598.
- Cox R.M., Calsbeek R. (2010) Severe costs of reproduction persist in *Anolis* lizards despite the evolution of a single-egg clutch. *Evolution* 64: 1321-1330.
- Cox R.M., Lovern M.B., Calsbeek R. (2014) Experimentally decoupling reproductive investment from energy storage to test the functional basis of a life-history trade-off. *The Journal of animal ecology* 83: 888-898.
- Crews D. (1975) Psychobiology of reptilian reproduction. *Science New Series* 189: 1059-1065.
- Crews D. (1984) Gamete production, sex-hormone secretion, and mating behavior uncoupled. *Hormones and Behavior* 18: 22-28.
- Crews D., Traina V., Wetzel F.T., Muller C., (1978) Hormonal control of male reproductive behavior in lizard, *Anolis carolinensis* - Role of testosterone, dihydrotestosterone, and estradiol. *Endocrinology* 103: 1814-1821.

- Crews D., Morgentaler A. (1979) Effects of intracranial implantation of oestradiol and dihydrotestosterone on the sexual behaviour of the lizard *Anolis carolinensis*. *The Journal of endocrinology*. 8: 373-381.
- Crews D., Camazine B., Diamond M., Mason R., Tokarz R.R., Garstka W.R. (1984) Hormonal independence of courtship behavior in the male garter snake. *Hormones and Behavior* 18: 29-41.
- Crews D., Coomber P., Baldwin R., Azad N., Gonzalez-Lima F. (1996) Brain organization in a reptile lacking sex chromosomes: Effects of gonadectomy and exogenous testosterone. *Hormones and Behavior* 30: 474-486.
- Fairbairn D., Blackenhorn W., Székely T. (2007) *Sex, size and gender roles: Evolutionary Studies of sexual size dimorphism*, Oxford University Press, Oxford.
- Ferkin M.H., Johnston R.E. (1995) Meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*, use multiple sources of scent for sex recognition. *Animal Behaviour* 49: Pages 37-44.
- Flores D., Tousignant A., Crews D. (1994) Incubation temperature affects the behavior of adult leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Physiology & Behavior* 55:1067-1072.
- Frynta D., Frýdlová P., Hnízdo J., Šimková O., Cikánová V., Velenský P. (2010) Ontogeny of sexual size dimorphism in monitor lizards: males grow for a longer period, but not at a faster rate. *Zoological science* 27: 917-923.
- Garland Jr T., Else P.L. (1987) Seasonal, sexual, and individual variation in endurance and activity metabolism in lizards. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 252: 439-449.
- Garstka W.R., Crews D. (1981) Female sex pheromone in the skin and circulation of a garter snake. *Science* 214: 681-683.
- Golinski A., John-Alder H., Kratochvíl L. (2011) Male sexual behavior does not require elevated testosterone in a lizard (*Coleonyx elegans*, Eublepharidae). *Hormones and Behavior* 59: 144-50.
- Golinski A., Kubička L., John-Alder H., Kratochvíl L. (2014) Elevated testosterone is required for male copulatory behavior and aggression in Madagascar ground gecko (*Paroedura picta*). *General and comparative endocrinology* 205: 133-141.
- Golinski A., Kubička L., John-Alder H., Kratochvíl L. (2015) Androgenic control of male-typical behavior, morphology and sex recognition is independent of the mode of sex determination: a case study on Lichtenfelder's gecko (Eublepharidae: *Goniurosaurus lichtenfelderi*). *Hormones and Behavior* 72: 49-59.
- Greenberg B. (1943) Social behavior of the western banded gecko, *Coleonyx variegatus*. *Baird Physiological Zoology* 16: 110-122.
- Greenberg B., Noble G.K. (1944) Social behavior of the American chameleon (*Anolis carolinensis* Voigt). *Physiological Zoology* 17: 392-439.
- Gutzke W.H.N., Crews D. (1988) Embryonic temperature determines adult sexuality in a reptile. *Nature* 332: 832-834.
- Harvey L.A., Propper C.R. (1997) Effects of androgens on male sexual behavior and secondary sex characters in the explosively breeding spadefoot toad, *Scaphiopus couchii*. *Hormones and Behavior* 31: 89-96.
- Heimovics S.A., Trainor B.C., Soma K.K. (2015) Rapid effects of estradiol on aggression in birds and mice: The fast and the furious. *Integrative and Comparative Biology* 55: 281-293.
- Huffman L.S., O'Connell L.A., Hofmann H.A. (2013) Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *Physiology & Behavior* 112: 77-83.

- Holmes M.M., Putz O., Crews D., Wade J. (2005) Normally occurring intersexuality and testosterone induced plasticity in the copulatory system of adult leopard geckos. *Hormones and Behavior* 47: 439-445.
- Jones R.E., Fitzgerald K.T., Tokarz R.R. (1977) Endocrine control of clutch size in reptiles: VII. Compensatory ovarian hypertrophy following unilateral ovariectomy in *Sceloporus occidentalis*. *General and comparative endocrinology* 31: 157-160.
- Koubová M., Johnson Pokorná M., Rovatsos M., Farkačová K., Altmanová M., Kratochvíl L. (2014) Sex determination in madagascar geckos of the genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae): are differentiated sex chromosomes indeed so evolutionary stable? *Chromosome Research* 22: 441-452.
- 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. (2006) 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* 44: 217-222.
- Krohmer R.W. (2004) The male red-sided garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*): Reproductive pattern and behavior. *Illar Journal* 45: 65-74.
- Kubička L. (2006) Fenotypová plasticita reprodukční alokace samic madagaskarského gekona *Paroedura picta*: Laboratorní experiment s manipulací příjmu potravy. *Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova*.
- Kubička L., Kratochvíl L. (2009) First grow, then breed and finally get fat: hierarchical allocation to life-history traits in a lizard with invariant clutch size. *Functional ecology* 23: 595-601.
- Kubička L., Golinski A., John-Alder H., Kratochvíl L. (2013) Ontogeny of pronounced female-biased sexual size dimorphism in the Malaysian cat gecko (*Aelurosalabotes felinus*: Squamata: Eublepharidae): A test of the role of testosterone in growth regulation. *General and comparative endocrinology* 188: 183-188.
- Kubička L., Starostová Z., Kratochvíl L. (2015) Endogenous control of sexual size dimorphism: Gonadal androgens have neither direct nor indirect effect on male growth in a Madagascar ground gecko (*Paroedura picta*). *General and comparative endocrinology* 224: 273-277.
- Kubie J.L., Vagvolgyi A., Halpern M. (1978) Roles of vomeronasal and olfactory systems in courtship behavior of male garter snakes. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 92: 627-641.
- LaDage L.D., Gutzke W.H.N., Simmons R.A., Ferkin M.H. (2008) Multiple mating increases fecundity, fertility and relative clutch mass in the female leopard gecko (*Eublepharis macularius*) *Ethology* 114: 512-520.
- López P., Martín J. (2001). Pheromonal recognition of females takes precedence over the chromatic cue in male Iberian wall lizards *Podarcis hispanica*. *Ethology*. 107: 901-912.
- López P., Martín J., Cuadrado M. (2002) Pheromone-mediated intrasexual aggression in male lizards, *Podarcis hispanicus*. *Aggressive behavior* 28: 154-163.
- López P., Aragon P., Martín, J. (2003) Responses of female lizards, *Lacerta monticola*, to males' chemical cues reflect their mating preference for older males. *Behavioral ecology and sociobiology* 55: 73-79.
- Mason P., Adkins E.K. (1976) Hormones and social behavior in lizard, *Anolis carolinensis*. *Hormes and Behavior* 7, 75-86.

- Mason R.T., Chinn J.W., Crews D. (1987) Sex and seasonal differences in the skin lipids of garter snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 87: 999-1003.
- Mason R.T., Fales H.M., Jones T.H., Pannell L.K., Chinn J.W., Crews D. (1989) Sex pheromones in snakes. *Science*. 245: 290-293.
- Mason R.T., Gutzke W.H.N. (1990) Sex recognition in the leopard gecko, *Eublepharis macularius* (Sauria, Gekkonidae). Possible mediation by skin-derived semiochemicals. *Journal of chemical ecology* 16: 27-36.
- Mason R.T., Parker M.R. (2010) Social behavior and pheromonal communication in reptiles. *Journal of comparative physiology A* 196: 729-749
- Meylan S., Dufty A.M., Clobert J. (2003) The effect of transdermal corticosterone application on plasma corticosterone levels in pregnant *Lacerta vivipara*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 134: 497-503.
- Mendonça M.T., Crews D. (1996) Effects of ovariectomy and estrogen replacement on attractivity and receptivity in the red-sided garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*) *Journal of comparative physiology A* 178: 373-381.
- Moore M.C., Kranz R. (1983) Evidence for androgen independence of male mounting behavior in white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Hormones and Behavior* 17: 414-423.
- Nelson J.K. (2011) *An Introduction to Behavioral Endocrinology*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Noble G.K. (1937) The sense organs involved in the courtship of *Storeria*, *Thamnophis* and other snakes. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 73: 673-725.
- Parker M.R., Mason R.T. (2012) How to make a sexy snake: estrogen activation of female sex pheromone in male red-sided garter snakes. *Journal of experimental biology* 215: 723-730.
- Parker M.R., Mason R.T. (2014) A novel mechanism regulating a sexual signal: The testosterone-based inhibition of female sex pheromone expression in garter snakes. *Hormones and Behavior* 66: 509-516.
- Porto M., de Oliveira M.A., Pissinatti L., Rodrigues R.L., Rojas-Moscoco J.A., Cogo J.C., Metze K., Antunes E., Nahoum C., Monica F.Z., De Nucci G. (2013) The evolutionary implications of hemipenial morphology of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Laurent, 1768) (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *Plos One*. 8
- Phoenix C.H., Goy R.W., Gerall A.A., Young W.C. (1959) Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65: 369-382.
- Pokorná M., Rábová M., Ráb P., Ferguson-Smith M.A., Rens W., Kratochvíl L. (2010) Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination. *Chromosome Research* 18: 809-820.
- Rhen T., Crews D. (1999) Embryonic temperature and gonadal sex organize male-typical sexual and aggressive behavior in a lizard with temperature-dependent sex determination. *Endocrinology* 140: 4501-4508.
- Rhen T., Ross J., Crews D. (1999) Effects of testosterone on sexual behavior and morphology in adult female leopard geckos, *Eublepharis macularius*. *Hormones and Behavior* 36: 119-128.
- Rhen T., Crews D. (2000) Organization and activation of sexual and agonistic behavior in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Neuroendocrinology* 71: 252-261.

- Rosen G.J., Wade J. (2000) The role of 5 alpha-reductase activity in sexual behaviors of the green anole lizard. *Physiology & behavior* 69: 487-498.
- Sever D.M., Hamlett W.C. (2002) Female sperm storage in reptiles. *Journal of Experimental zoology* 292:187-199
- Shine R., Greer A.E. (1991) Why are clutch sizes more variable in some species than in others? *Evolution* 45: 1696-1706
- Schlinger B.A., Callard G.V. (1990) Aromatization mediates aggressive behavior in quail. *General and Comparative Endocrinology* 79: 39-53.
- Schulz K.M., Richardson H.N., Zehr J.L., Osetek A.J., Menard T.A., Sisk C.L. (2004) Gonadal hormones masculinize and defeminize reproductive behaviors during puberty in the male Syrian hamster. *Hormones and Behavior* 45: 242-249.
- Schulz K.M., Sisk C.L. (2006) Pubertal hormones, the adolescent brain, and the maturation of social behaviors: Lessons from the Syrian hamster. *Molecular and Cellular Endocrinology* 254-255: 120-126.
- Simon N.G., Masters D.B. (1987) Activation of male-typical aggression by testosterone but not its metabolites in c57bl/6j female mice. *Physiology & behavior* 41: 405-407.
- Simon N.G., McKenna S.E., Lu S.F., Cologer-Clifford A. (1996) Development and expression of hormonal systems regulating aggression. *Annals of the New York Academy of Sciences* 794: 8-17.
- Starostová Z., Kubička L., Kratochvíl L. (2010) Macroevolutionary pattern of sexual size dimorphism in geckos corresponds to intraspecific temperature-induced variation. *Journal of evolutionary biology* 23: 670-677.
- Starostová Z., Kubička L., Golinski A., Kratochvíl L. (2013) Neither male gonadal androgens nor female reproductive costs drive development of sexual size dimorphism in lizards. *Journal of experimental biology* 216: 1872-1880.
- Stuart-Fox D.M., Ord T.J. (2004) Sexual selection, natural selection and the evolution of dimorphic coloration and ornamentation in agamid lizards. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 271: 2249-2255.
- Tokarz R.R. (1986) Hormonal regulation of male reproductive behavior in the lizard *Anolis sagrei* - A test of the aromatization hypothesis. *Hormones and Behavior* 20: 364-377.
- Trompeter W.P., Langkilde T. (2011) Invader danger: lizards faced with novel predators exhibit an altered behavioral response to stress. *Hormones and Behavior* 60: 152-158.
- Uetz P., Freed P., Hošek J. eds. (2017), The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, accessed 10 July 2017
- Viets B.E., Tousignant A., Ewert M.A., Nelson C.E., Crews D. (1993) Temperature dependent sex determination in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Journal of Experimental Zoology* 265): 79-83.
- Vos D.R. (1995) The role of sexual imprinting for sex recognition in zebra finches: a difference between males and females. *Animal Behaviour* 50: 645-653.
- Wilson J.D., George F.W., Griffin J.E. (1981) The hormonal control of sexual development. *Science* 211: 1278-1284.
- Woodley S.K., Moore M.C. (1999) Ovarian hormones influence territorial aggression in free-living female mountain spiny lizards *Hormones and Behavior* 35: 205-214.

Woolley S.C., Sakata J.T., Crews D. (2004) Evolutionary insights into the regulation of courtship behavior in male amphibians and reptiles. *Physiology & Behavior* 83: 347-360.

Wu M.V., Manoli D.S., Fraser E.J., Coats J.K., Tollkuhn J., Honda S.I., Harada N., Shah N.M. (2009) Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. *Cell* 139: 61-72.

Kapitola I.

Temporal organization: A novel mechanism of hormonal control of male-typical sexual behavior in vertebrates.

Tereza Schořálková, Lukáš Kratochvíl, Lukáš Kubička

Physiology & Behavior 170 (2017) 151-156

Tato publikace je součástí neveřejné přílohy disertační práce z důvodu autorských práv.

Kapitola II.

Love or war? Hormonal control of sex recognition, male sexual behavior and aggression in the gecko lizard

Tereza Schořálková, Lukáš Kratochvíl, Lukáš Kubička

Rukopis odeslaný k recenzi

Tato publikace je součástí neveřejné přílohy disertační práce z důvodu autorských práv.

Kapitola III.

Are lizards paedophile? Sex recognition and female sexual attractiveness in the gecko

Tereza Schořálková, Lukáš Kratochvíl, Lukáš Kubička

Rukopis odeslaný k recenzi

Tato publikace je součástí neveřejné přílohy disertační práce z důvodu autorských práv.

Kapitola IV.

Ovarian control of growth and sexual size dimorphism in a male-larger gecko

Lukáš Kubička, Tereza Schořálková, Jan Červenka, Lukáš Kratochvíl

Journal of Experimental Biology 220 (2017), 787-795

Tato publikace je součástí neveřejné přílohy disertační práce z důvodu autorských práv.

ZÁVĚR

Svoji rozmanitostí jsou gekoni vhodnou modelovou skupinou pro studium endogenní kontroly pohlavního dimorfismu významné skupiny obratlovců – šupinatých plazů. Toho využívá tato disertační práce, ve které jsem se soustředila na vliv steroidních hormonů na významné pohlavně dimorfní znaky zástupců dvou čeledí gekonů. Studium této problematiky je komplikováno řadou věcí – hormony často působí nepřímo, v organismu může dojít k jejich přeměně na jiný produkt, či jejich účinek na sledované znaky nebývá okamžitý. Při plánování experimentů je nutné brát tato úskalí v potaz a přizpůsobit jim design práce. Samčí sexuální chování plazů sestává z často ritualizovaných prvků chování, které byly v minulosti spojovány s rozdílnými mechanismy hormonálního působení, od plné vazby jednotlivých prvků chování na aktuální hladiny androgenů až po jejich nezávislost. Podle závěrů mé práce je patrné, že samčí sexuální chování reaguje na aktuální hladiny testosteronu v krvi se zpožděním, pravděpodobně kvůli času nutnému pro propojení nebo vývinu příslušných nervových drah. Testosteron navozuje všechny součásti typického samčího sexuálního chování jak u samců, tak i u samic obou zkoumaných druhů gekonů, jen je třeba delších hormonálních manipulací, než bylo dříve zvykem. Míra tohoto zpoždění se zdá být rozdílná pro samce a samice, pro jednotlivé prvky chování a pravděpodobně bude odlišná i pro různé druhy. Zároveň je možné, že rozsah zpoždění je do jisté míry adaptivní a pro některé druhy může být i výhodný. Dále je z výsledků mé práce patrné, že testosteron má u samic gekonů, na rozdíl od dihydrotestosteronu, schopnost spouštět ofenzivní agresi vůči dalším jedincům, tento rozdíl je patrně dán nutností jeho přeměny v mozku na v tomto ohledu biologicky aktivní estradiol, které není dihydrotestosteron schopen. Naopak samčí sexuální chování, stejně jako přítomnost samčích kopulačních orgánů hemipenisů, mají schopnost u samic vyvolat oba tyto androgeny. Pro použití adekvátního typu chování je pro jedince důležitá schopnost rozpoznání pohlaví a té napomáhají jednotlivé znaky, které bývají u plazů často detekovány vizuálně či chemosenzoricky. Naše studie však nepotvrdily u samic obou druhů přítomnost feromonu atraktivity kontrolovaného estrogenu nutného pro jejich rozpoznávání, jak se dříve myslelo, ale ukázalo se, že pro rozpoznání pohlaví jsou podstatné androgeny u samců. Jedinci, kteří nemají typicky samčí hladiny androgenů, jsou vnímáni jako samice a jsou pro samce sexuálně atraktivní (platí i pro kastráty, juvenilní jedince a čerstvě vylíhlá mláďata). Svlékání pokožky navíc nemá vliv na rozpoznávání pohlaví, samci reagují na samce i samice stejně ve všech fázích svlékání i mimo něj. Pro samce druhů, u kterých mají samice

schopnost uchovávat spermie po delší dobu, tak může být výhodnou strategií snažit se o kopulaci se všemi jedinci, kteří nejsou samci, a zajistit si tak co nejvyšší počet možných potomků. Dalším neméně důležitým zjištěním vyplývajícím ze předkládané práce je, že pohlavní rozdíly ve velikosti těla modelového druhu *P. picta*, a pravděpodobně i u ostatních gekonů/šupinatých plazů, vznikají působením samičích ovariálních hormonů, kdežto samčí gonadální androgeny ani investice samic do reprodukce se na něm vůbec nepodílí a samci jsou v tomto ohledu spíše neutrálním pohlavím.

Moje disertační práce přispívá mnoha novými poznatky k osvětlení problematiky endogenní kontroly pohlavně dimorfních znaků šupinatých plazů. Do jaké míry je jejich platnost u obratlovců všeobecná, ukáží další výzkumy této problematiky v budoucnosti.