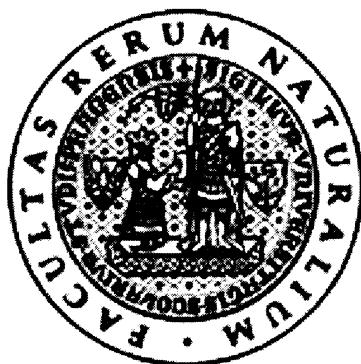


BAKALÁRSKA PRÁCA ODBORU EKOLOGICKÁ A EVOLUČNÁ BIOLÓGIA

Katedra Ekológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Karlovej v Prahe



Využitie pohlavných revertantov pri štúdiu proximálnej kontroly pohlavného dimorfizmu

Use of sex-reverted animals in studies of proximate control of sexual
dimorphism

Autor: **Lucia Tóthová**

Školiteľ: Mgr. Lukáš Kratochvíl, PhD.

Praha 2009

ABSTRAKT

Pohlavné revertované organizmy sú jedince s fenotypom gonády, ktorý nezodpovedá ich genotypu, respektíve u druhov s ESD, nezodpovedá očakávateľnému fenotypu za daných podmienok prostredia. Vznikajú spontánne (napríklad mutáciou v géne determinujúcom pohlavie), ich vznik však môžeme indukovať aj využitím metód ako sú hormonálne manipulácie, manipulácie s inkubačnou teplotou (u druhov s ESD, alebo GSD s enviromentálnym vplyvom), gonadektomizácie a transplantácie gonád v kombinácii s hormonálnymi manipuláciami, alebo genetické metódy. Rôzne metódy majú za výsledok rôzne fenotypy revertantov. Môžu spôsobiť len o reverziu gonád, alebo aj reverziu celého fenotypu (vrátane sekundárnych pohlavných znakov, takže sa jedinec vyvinie s úplným samčím, či samičím fenotypom, ktorý sa však nezhoduje s jeho genotypom). V závislosti na metóde, ktorú použijeme, môžme odlišiť proximálne mechanizmy, ktoré diferenciáciu konkrétnych pohlavné dimorfických znakov u daného druhu podmieňujú a kontrolujú.

Kľúčové slová: pohlavná reverzia, pohlavný dimorfizmus, pohlavná diferenciácia, pohlavný chromozóm, pohlavné-špecifické gény, pohlavné-špecifická génová expresia, pohlavné hormóny, organizačné a aktivačné účinky

ABSTRACT

Sex-reversed animals are individuals, that possess the gonadal phenotype, which does not coincide with their genotype. However, in species with ESD (environmental sex determination), the phenotype of sex-reversed animal is not the one, that could be expected within the same environmental conditions. Sex-reversed animals are produced either spontaneously (e.g. after mutation in sex-determining gene), or we can induce the sex reversal by hormonal treatment, manipulating incubation temperature (species with ESD, or GSD with environmental effect), using gonadectomizations and transplantations of gonads combined with hormonal treatment, or using genetic methods. Different methods of sex-reversal have different outcomes on phenotypes of sex-reversed animals. We can induce differentiation of sex-reversed gonad only or we can induce complete reversal of individual's phenotype (including the secondary sex characteristics, so that the sex-reversed individual possess perfect male or female phenotype which, however, does not correspond with its genotype). Depending up on the method we use, we can distinguish different proximate mechanisms that are responsible for the differentiation and control of the sexually dimorphic traits in the species.

Key words: sex-reversal, sexual dimorphism, sexual differentiation, sex chromosome, sex-specific genes, sex-linked gene expression, sex hormones, organizational and activational effects

Pod'akovanie

Ďakujem môjmu školiteľovi a konzultantovi Mgr. Lukášovi Kratochvílovi Phd. za cenné rady vedenie pri vypracovávaní bakalárskej práce. Ďalej by som sa chcela pod'akovat' mojej rodine a blízkym za podporu počas celého štúdia.

OBSAH

Úvod.....	6
1. Pohlavný dimorfizmus.....	7
2. Determinácia pohlavia a evolúcia pohlavných chromozómov u stavovcov... <td>7</td>	7
3. Proximátne mechanizmy kontroly pohlavného dimorfizmu.....	9
4. Pohlavní revertanti a ich využitie.....	10
5. Metódy výskumu pohlavného dimorfizmu.....	12
5.1. Spontánna reverzia.....	12
5.2. Manipulácie v rannej embryogenéze.....	13
5.2.1. Vplyv inkubačnej teploty.....	13
5.2.2. Hormonálna manipulácia.....	14
5.3. Manipulácie v neskorších štádiách ontogenézy.....	17
5.3.1. Gonadektomizácia a hormonálne manipulácie.....	17
5.3.2. Transplantácie gonád a hormonálne manipulácie.....	18
5.4. Genetické manipulácie.....	19
Záver.....	21
Tabuľka 2 - Prehľad výskumu pohlavného dimorfizmu s využitím metódy pohlavných revertantov.....	22
Zoznam použitej literatúry.....	24

Úvod

Pohlavný dimorfizmus zahŕňa primárne aj sekundárne pohlavné znaky, ktorími sa od seba odlišujú samec a samica jedného druhu. Z ultimátneho hľadiska v evolúcii vznikol ako dôsledok sexuálneho rozmnožovania prostredníctvom pohlavného výberu. Proximátne je jeho vnik, vývin a udržiavanie zabezpečené mechanizmami genetickými, epigenetickými aj fenotypovo plastickými.

Výskumom pohlavného dimorfizmu u stavovcov sa zaoberá množstvo odborov, od endokrinológie, neurológie a genetiky, cez zoologiu a ekológiu až po evolučnú biológiu. Jednotlivé odbory pri jeho štúdiu používajú rôzne metódy. Ja sa v mojej práci zameriam predovšetkým na metódy, ktoré prostredníctvom rôznych manipulácií odhaľujú, ktoré pohlavné dimorfné znaky sú kontrolované ktorími proximátnymi mechanizmami. Ako vyplýva z názvu práce, ústrednou metódou bude predovšetkým reverzia pohlavia a vznik pohlavných revertantov, ktorá bola použitá u zástupcov všetkých tried stavovcov.

Metóda vzniku pohlavných revertantov, teda organizmov s gonadálnym fenotypom nezodpovedajúcim ich genotypu (resp. u TSD organizmov, u ktorých sa diferenciácia pohlavia nezhoduje s očakávateľným fenotypom na základe inkubačnej teploty, v ktorej sa vyvíjali) nám umožňuje porovnať normálne jedince, na ktorých vznik pohlavného dimorfizmu pôsobia všetky proximálne mechanizmy tak, ako sa u nich evolučne vyvinuli, s revertovanými jedincami, u ktorých sme niektoré z týchto vplyvov čiastočne či úplne eliminovali, alebo naopak pridali (hormonálna manipulácia, teplotná reverzia, kombinácie gonadektomizácie alebo transplantácie gonád a hormonálnych manipulácií).

Cieľom tejto práce je teda zhrnúť a popísat v súčasnosti používané metódy pri štúdiu proximálnej kontroly pohlavného dimorfizmu u stavovcov, so zameraním na metódy s využitím reverzie pohlavia a pohlavné-špecifických znakov.

1. Pohlavný dimorfizmus

Pojem pohlavný dimorfizmus zahŕňa všetky znaky, ktorými sa od seba navzájom odlišujú jedince rôzneho pohlavia, ale rovnakého druhu. Vznikol ako dôsledok anizogamie selekčnými tlakmi pohlavného výberu a divergencie reprodukčných rolí (recentní review Bonduriansky 2009). Proximátne vzniká na základe rozdielov v samčom a samičom genotype, prostredníctvom rozdielnej expresie autozomálnych génov, epigenetických efektov a fenotypovej plasticity.

Samci a samice sa líšia morfológicky, ontogenetickým vývinom, sfarbením aj správaním (Becker a Berkley 2009). Miera pohlavného dimorfizmu je druhovo špecifická. U niektorých druhov sa vyskytujú rozdiely takmer výlučne v primárnych pohlavných znakoch, naopak v niektorých prípadoch je odlišnosť samca a samice tak vysoká, že boli dokonca donedávna považovaní za odlišné čeľade, ako v prípade rýb Mirapinnidae, Megalomycterinidae a Cetomimidae (Johnson 2009).

2. Determinácia pohlavia a evolúcia pohlavných chromozómov u stavovcov

Stavovce majú dva základné typy určenia pohlavia: 1. genetické určenie pohlavia (genetic/genotypic sex determination GSD) a 2. enviromentálne určenie pohlavia (environmental sex determination ESD) (Valenzuela 2003).

Do skupiny s GSD vo všeobecnosti zaraďujeme druhy, u ktorých je známe, že majú pohlavné chromozómy. V evolúcii sa vyvinuli tak, že po vzniku génu determinujúceho pohlavie sa v jeho blízkosti akumulovali ďalšie gény, ktoré boli výhodné pre dané pohlavie. Výsledkom tejto akumulácie je vznik tzv. supergénu. Nasleduje silný selekčný tlak na zabránenie rekombinácií medzi chromozómom s týmto supergénom, zvýhodňujúcim len jedno pohlavie a jeho párovým chromozómom. Po zabránení rekombinácie (napr. inverziou) dochádza k postupnej, ale relatívne rýchlej degradácii a ubúdaniu génov na chromozóme s pohlavie-determinujúcim génom. Výsledkom tohto procesu je diferenciácia dvoch nerekombinantných heterochromozómov XY alebo ZW (Arnold 2004, Rhen 2007, Wallis a kol. 2008, Bonduriansky 2009, Pokorná a Kratochvíl 2009). Na nich sa hromadia ďalšie

pohlavne antagonistické mutácie, ktoré sa v priebehu evolúcie fixujú. K rekombinácii dochádza len v malých homologických oblastiach PARs (pseudoautosomal regions).

Rôzne vývojové vetvy stavovcov s GSD majú pohlavie-determinujúce gény uložené buď na páre homomorfnych či heteromorfnych pohlavných chromozómov, prípadne na mikrochromozóme (Wallis a kol. 2008). V prípade identifikateľných pohlavných chromozómov rozlišujeme samčiu (XX/XY) a samičiu (ZZ/ZW) heterogamiju. Najčastejším proximátnym mechanizmom pohlavnej diferenciácie u druhov s GSD je prítomnosť pohlavie-determinujúceho génu na heteromorfnom chromozóme. Napríklad gén *Sry* na Y chromozóme u cicavcov podmieňuje diferenciáciu testes, tie produkujú testosterón, ktorý ovplyvňuje pohlavne špecifickú génovú expresiu v tkanivách a spúšťa tým mechanizmus vývinu jedinca so samčím fenotypom (Goodfellow a Lovellbadge 1993, De Vries 2002, McCarthy a Arnold 2008). Ortológy génu *Sry* boli dokázané v oboch recentných vetvach Theria- Metatheria aj Eutheria, nemajú ho niektoré druhy hlodavcov, ktoré ho sekundárne stratili a rád Monotremata (Wallis a kol. 2008).

ESD je najširšie zastúpené u kostnatých rýb a plazov (Wallis a kol. 2008). U druhov s ESD je vznik samčieho alebo samičieho pohlavia podmienený faktormi prostredia a to najčastejšie inkubačnou teplotou (temperature-dependent sex determination TSD). U rýb je známe aj sociálne určenie pohlavia, kde sa pohlavie vyvíja na základe prítomnosti či neprítomnosti iného dominantného jedinca v skupine (Godwin 2009)

Niekteré práce poukazujú na kontinuálny prechod medzi GSD a ESD (Valenzuela a kol. 2003, Shine a kol. 2007, Radder a kol. 2008), v tom prípade by však mechanizmus dlhodobého uchovania pohlavných chromozómov v populácii s ESD bol len ľažko vysvetliteľný (Pokorná a Kratochvíl 2009). Alternatívou k tejto hypotéze je, že okrem GSD a ESD existuje tretia možnosť: GSD s enviromentálnym vplyvom. Podľa tejto hypotézy u niektorých druhov s GSD existuje plasticita, ktorá za určitých podmienok spôsobí reverziu pohlavia, takže sa jedinec vyvinie s iným fenotypom, než na aký ho predurčuje jeho chromozomálny komplement. Túto hypotézu podporuje viacero prác, v ktorých u druhov s GSD bola preukázaná reverzia pohlavia napríklad vplyvom inkubačnej teplote (Ezaz a Quinn 2005, Radder a kol. 2008, Ramsey a Crews 2009).

3. Proximátne mechanizmy kontroly pohlavného dimorfizmu

Hlavnú rolu v pohlavnej diferenciácii a teda aj v kontrole pohlavného dimorfizmu hrajú štyri proximátne mechanizmy: 1.pohlavne-špecifické a pohlavie-determinujúce gény na pohlavných chromozómoch; 2.pohlavne-limitovaná expresia génov kódovaných na autozómoch; 3.epigenetické vplyvy a 4.fenotypová plasticita. (Rhen 2007)

Asi najjednoduchšie vysvetliteľným mechanizmom vzniku pohlavne dimorfných znakov je expresia pohlavne-špecifických génov na pohlavných chromozómoch, ktoré sa prostredníctvom pohlavne antagonistických selekčných tlakov dostali do väzby s génnimi determinujúcimi pohlavie (Rice 1996).

Ďalšou možnosťou vzniku pohlavného dimorfizmu je pohlavne-špecifická expresia autozomálnych génov. Tá môže byť indukovaná dvoma rôznymi mechanizmami. Buď epistatickou interakciou medzi lokusom na pohlavnom chromozóme a autozomálnym lokusom, pri ktorej gén na pohlavnom chromozóme môže slúžiť ako spúštač/inhibítormodifikátor expresie génu na autozóme, alebo prostredníctvom účinkov pohlavných hormónov (Rhen 2007). Práve tieto mechanizmy nám môžu pomôcť odlišiť metóda pohlavných revertantov. Keďže regulácia pohlavnými hormónmi je nezávislá na pohlavných chromozómoch, reverzia pohlavia hormonálnou manipuláciou revertuje práve znaky vznikajúce ich aktivačnými alebo organizačnými účinkami. Naopak znaky podmienené epistatickými interakciami génov autozomálnych s génnimi na pohlavných chromozómoch, ostatné nerevertované.

Okrem genetických vplyvov, sú pohlavne dimorfné znaky ovplyvnené aj epigeneticky, maternálnym a paternálnym genomovým imprintingom (napríklad metyláciou DNA), pohlavne špecifickou rodičovskou alokáciou (Rhen 2007, Bonduriansky 2009) a tiež ďalšími biotickými aj abiotickými vplyvmi prostredia (Rhen 2007, McCarthy a Arnold 2008).

Všetky tieto mechanizmy sa pri tvorbe pohlavne dimorfných znakov vzájomne kombinujú a dopĺňajú, preto aj pri rovnakom genotype, vzniká pohlavne dimorfný fenotyp. Napríklad aj pri genetickej kontrole znaku môže byť daný znak exprimovaný len za určitých podmienok, len v určitej fáze, či prostredí (vonkajšom či vnútornom), alebo len na určitom genetickom pozadí a aj miera jeho prejavu môže byť rôzne geneticky či negeneticky ovplyvnená. Gén môže byť za vznik pohlavne dimorfného znaku zodpovedný priamo, alebo len ako súčasť polygénneho systému (vďaka epistatickým a pleiotropným efektom), takisto je

možná existencia "modifikačných lokusov" na pohlavných chromozómoch, ktoré kontrolujú expresiu génov na autozómoch (Bonduriansky 2009).

Veľmi zaujímavým príkladom rôznych proximátnych mechanizmov vzniku pohlavne dimorfických znakov je prípad spontánnej mutácie u zebričky *Taenioptygia guttata*, pri ktorej je polovica tela jedinca zložená zo ZZ (samčích) buniek a druhá zo ZW (samičích) buniek. Tento tzv. laterálny gynandromorf, má hladiny hormónov v celom organizme rovnaké, napriek tomu každá polovica tela vykazuje iné pohlavne dimorfické znaky. Nielenže má na ZZ polovici úplne diferencované a funkčné testes a na druhej ZW polovici ovárium, ale na oboch má aj pohlavne špecifické sfarbenie zodpovedajúce genotypu buniek (McCarthy a Arnold 2008). Rozdielna je aj štruktúra mozgu, napr. centrum pre spev je diferencované v pravej aj ľavej polovici rozdielne, tak že zodpovedá samčiemu, alebo samičiemu fenotypovému prejavu (Agate 2003). Z týchto výsledkov by sa mohlo zdáť, že všetky vyššie uvedené pohlavne dimorfické znaky, sú podmienené expresiou génov na pohlavných chromozómoch.

Na druhej strane, pri pokusoch s aplikáciou pohlavných hormónov (či už počas inkubácie priamo na vajíčka, alebo ako hormonálne implantáty v skorej ontogenéze) sa dokázalo, že u tohto druha nastáva pri pohlavnej reverzii aj zmena preferencie partnera a u revertovaných samíc čiastočná maskulinizácia samičieho centra pre spev, takže samica spieva, ale tento spev nie je adekvátny spevu normálneho samca. Feminizácia samičieho centra pre spev sa pohlavnou reverziou hormonálnymi manipuláciami dosiahnuť nepodarila (Adkins-Regan a Wade 2001). Z uvedeného vyplýva, že diferenciácia centra pre spev u *Taenioptygia guttata* závisí na expresii pohlavne-špecifických génov na pohlavných chromozómoch, podobne ako pohlavne-špecifické sfarbenie peria a zobáka. Pravý samčí spev sa však vyvinie až pri aktivácii pohlavnými hormónmi v dospelosti. Naopak preferencia partnera v dospelosti je u tohto druha založená na organizačných účinkoch pohlavných hormónov v rannej embryogenéze.

4. Pohlavní revertanti a ich využitie

U druhov s pohlavnými chromozómami sú pohlavne revertované organizmy jedince, ktorých genotyp nezodpovedá ich gonadálnemu fenotypu. Jedinec so samčími pohlavnými chromozómami sa vyvinie so samičím fenotypom a vice versa. Pojem pohlavná reverzia je v literatúre používaný v rôznych významoch. V niektorých prácach označuje len reverziu primárnych pohlavných znakov - gonád, mnohokrát dokonca len čiastočnú (Coveney 2001,

Wade 2001, Adkins-Regan 2008). Neúplná reverzia gonád spôsobí vznik intersexov, ktoré majú aj samičie aj samičie primárne pohlavné znaky (napr. ovotestes u zebričky) a sú reprodukčne sterilní (napríklad *Staurotypus*, *Taeniopygia*, *Mus...*). Iní autori týmto pojmom označujú celkovú reverziu fenotypu, a teda vývin jedinca so všetkými primárnymi aj sekundárnymi pohlavnými znakmi opačného fenotypu, ako je jeho genotyp (Elbrecht a Smith 1992, Selim a Shinomiya 2009).

Popri možnosti pohlavnej reverzie druhov s pohlavnými chromozómami, je možné revertovať aj druhy s ESD. V tomto prípade za revertanta môžme považovať jedinca, ktorý sa vyvinie s fenotypom, nezodpovedajúcim očakávateľnému fenotypu za daných podmienok (napríklad pri danej inkubačnej teplote) (Selim a Shinomiya 2009).

Rôzne výsledné formy reverzie môžu byť indukované zmenou inkubačnej teploty, alebo hormonálnou manipuláciou v ranne embryogenéze (Rhen a Crews 2000, Ramsey a Shoemaker 2007, Shine a Warner 2007, Radder a kol. 2008, Freedberg a kol. 2006); ovplyvnením diferenciácie, odstránením, alebo transplantáciou gonády v kombinácii s hormonálnou manipuláciou (Wade 2001, Malone a Michalak 2008); alebo genetickou manipuláciou (napr. knockout pohlavie-determinujúceho génu na pohlavnom chromozóme) (De Vries a kol. 2002).

Alternatívou k metóde pohlavnej reverzie, sú vo výskume pohlavného dimorfizmu rôzne hormonálne manipulácie a gonadektomizácia až po vyvinutí samčieho či samičieho fenotypu. Pri takýchto metódach však nedochádza k reverzii gonád, často ovplyvňujú len pári pohlavne dimorfných znakov. Tie pohlavne dimorfné znaky, ktoré sa zakladajú v rannej embryogenéze už neovplyvnia vôbec, prípadne len čiastočne alebo dočasne (Wade 2001, Rhen a Crews 2000). Pomáhajú však odhaliť, ktoré pohlavne dimorfné znaky sú podmienené prítomnosťou gonád, ich sekrécií (pohlavné hormóny a ich aktivačné účinky, rastové a transkripčné faktory a pod.)

5. Metódy výskumu proximátnych mechanizmov pohlavného dimorfizmu

5.1 Spontánna reverzia

Spontánna reverzia v prírode bez vonkajšej manipulácie, vzniká buď pri náhodnej mutácii (pozorované napríklad u *Poecilia reticulatta*, *Oryzias latipes*) alebo u druhov s GSD s evironmentálnym vplyvom, pokiaľ sa v termosenzitívnej període počas inkubácie výrazne zmení inkubačná teplota.

Pokusy s krížením inbrédných línii rýb druhu *Poecilia reticulatta* z roku 1999 ukázali, že u týchto rýb prebieha spontánna reverzia pohlavia a s nízkou frekvenciou vznikajú XX samci a XY samice (Nakajima 1999). Genotyp krížencov F1 však neoverovali molekulárno-genetickými metódami, ale určovali ho na základe pomeru pohlaví v F2 a pohlavného dimorfného počtu abdominálnych stavcov. Tento počet sa pohybuje od 14 do 16. Autori najprv skrížili 16 rôznych línii tohto druhu za vzniku F1 generácie s počtom abdominálnych stavcov 14-16. Následne krížili navzájom jedincov F1 s rôznym aj rovnakým počtom stavcov. Pomery pohlaví v F2 pri krížení jedincov z F1 s počtom stavcov 14x15 potvrdili, že sa jednalo o kríženie revertovaného XX samca a XX samice, keďže všetci potomci sa vyvinuli ako samice. Naopak, kríženia 15x16 a 16x16 vyprodukovali pomer pohlaví 1:3, ktorý indikuje kombináciu XY samca a revertovanej XY samice (viz Tabuľka 1).

Nedávno publikovaná štúdia na druhu *Oryzias latipes* potvrdila spontánnu reverziu zapríčinenú mutáciou v pohlavie-determinujúcom géne metódou PCR. V jednej populácii tohto druhu sa vyskytovali dve rôzne mutácie v géne *Dmy*, takže v nej vznikali revertované samice s XY aj YY genotypom. XY aj YY samice boli plne fertilné a vykazovali všetky samičie sekundárne pohlavné znaky. Z týchto výsledkov autori usudzujú, že Y chromozóm s neaktívny *Dmy*, sa správa rovnako ako X chromozóm (Otake a kol. 2008).

Tabuľka 1 - Teoretické pomery pohlaví pri krížení pohlavných revertantov s nerevertovanými jedincami

	XX/XY	ZZ/ZW
Normálni jedinci		
Genotyp	XX x XY ♀ ♂ 1:1	ZW x ZZ ♀ ♂ 1:1
Fenotyp		
Pomer pohlaví		
Revertované homogametické pohlavie		
Genotyp	XX x XXr ♀ ♂ 1:0*	ZZr x ZZ ♀ ♂ 0:1**
Fenotyp		
Pomer pohlaví		
Revertované heterogametické pohlavie		
Genotyp	XYr x XY ♀ ♂ 1:3	ZW x ZWr ♀ ♂ 3:1
Fenotyp		
Pomer pohlaví		

r - označuje pohlavného revertanta

* - 100 % F1 sú samice

** - 100 % F1 sú samci

5.2. Manipulácie v rannej embryogenéze

Úplnú reverziu pohlavia a teda aj vznik príslušného fenotypu sa vo väčšine štúdií podarilo dosiahnuť buď hormonálnou manipuláciou alebo zmenenou inkubačnou teplotou počas včasného ontogenetického vývinu (Shine a Warner 2007, Greenbaum a Carr 2001, Selim a Shinomiya 2009). Fitness revertantov sa líši vzhľadom na druhovo-špecifický typ určenia pohlavia, čas, dĺžku a intenzitu manipulácie, či už teplotnej, alebo hormonálnej. V niektorých prípadoch sú revertanti plne fertilní, v iných buď z dôvodu stabilného GSD typu určenia pohlavia, alebo nedostatočnej zmeny podmienok pri manipulácii, vznikajú jedinci zmiešaného samčieho aj samičieho fenotypu - intersex.

5.2.1. Vplyv inkubačnej teploty

Asi najviac štúdií vplyvu inkubačnej teploty na pohlavie a vývin pohlavného dimorfizmu bolo realizovaných na plazoch, z dôvodu vysokej variability systémov determinácie pohlavia naprieč skupinou. U plazov nájdeme druhy so samčou aj samičou heterogamiou, u korytnačiek a niektorých jašterov druhy s pohlavnými mikrochromozómami, druhy s GSD s možnosťou reverzie vplyvom inkubačnej teploty aj druhy s typickým TSD bez pohlavných chromozómov (Janzen a Paukstis 1991, Crews 2003, Ezaz a kol. 2005, Freedberg a kol. 2006, Radder a kol. 2008, Ramsey a Crews 2009). U plazov s TSD a GSD s

enviromentálnym vplyvom, je spúšťačom diferenciácie samčieho či samičieho pohlavia inkubačná teplota v druhej tretine embryogenézy (Janzen and Paukstis 1991, Crews 2003). Proximátnym mechanizmom sú v tomto prípade pravdepodobne aktivačné a zároveň organizačné účinky steroidných hormónov, pretože termosenzitívna períoda sa zhoduje s hormonálne-senzitívou (Arnold a Breedlove 1985, Crews 2003, Ramsey a Crews 2009).

Vplyv inkubačnej teploty na vývin pohlavné dimorfické fenotypov môžeme odhaliť, tak, že znesené vajíčka rozdelíme do niekoľkých skupín a každú uložíme do inkubátora s rôznou teplotou. Pre TSD určenie pohlavia sú typické posuny v pomeroch pohlaví mláďať. To znamená, že druhovo špecificky, sa pri určitých teplotách liahne viac samcov a pri vyšších či nižších teplotách naopak viac samíc. Pri GSD s enviromentálnym vplyvom, sa pri normálnych teplotách liahnu samci aj samice v pomere 1:1, avšak pri extrémne nízkych, či extrémne vysokých teplotách sa tento pomer posunie v prospech jedného z pohlaví vďaka teplotnej reverzie.

Okrem plazov bola teplotou indukovaná pohlavná reverzia pozorovaná aj u ryb, u druhu so známym pohlavie-determinujúcim génom *Dmy* na Y pohlavnom chromozóme-*Oryzias latipes*. Pri inkubácii ikier vo vysokej teplote vody (32 °C) v senzitívnej període skorej embryogenézy došlo k posunu v pomere pohlaví v F1, zapričinému reverziou jedincov s XX pohlavnými chromozómami. Z týchto jedincov sa vyvinuli samci s funkčnými testes a fertilným fenotypom. Ich genotyp bol potvrdený detekciou pohlavné-špecifického markeru metódou PCR a fenotyp určený pomocou sekundárnych pohlavných znakov. Pohlavní XX revertanti mali samčiu urogenitálnu papilu, análnu plutvu, chrabtovú plutvu aj pohlavné-špecifické samčie sfarbenie (Selim a kol. 2009).

5.2.2. Hormonálna manipulácia

Pre reverziu pohlavia sa hojne využíva aj kombinácia manipulácie inkubačnou teplotou a hormonálnej manipulácie. Prípadne čisto hormonálna reverzia, či už priamym podávaním estrogénov a androgénov, alebo inhibíciou ich vzniku a účinkov.

Úplnú reverziu XY jedincov na samice u *Bassiana duperreyi*, druhu s heteromorfickými pohlavnými chromozómami a teplotne ovplyvniteľným GSD sa podarilo dosiahnuť v oboch prípadoch: aj vplyvom inkubačnej teploty, aj aplikáciou estradiolu na vajíčka. Reverziu potvrdila metóda PCR, ktorá dokázala prítomnosť samčích pohlavných chromozómov u jedincov samičieho fenotypu. Aj keď autori tejto štúdie dokázali úplnú a trvalú reverziu gonád aplikáciou estradiolu, fenotyp pohlavných revertantov bližšie neskúmali, osexovali ich len na základe prítomnosti a histológie samčích či samičích gonád (Radder a kol. 2008). Pre

overenie úspešnosti reverzie, by bolo vhodné pokúsiť sa revertantov skrižiť s nerevertovanými jedincami a sledovať jednak ich fertilitu, fenotypové prejavy a pomer pohlaví u potomkov.

Pre porovnanie, podobný pokus bol prevedený aj u dvoch druhov korytnačiek *Staurotypus salvinii* a *Staurotypus triporcatus*, kde pohlavná reverzia XY jedincov na samice, vplyvom aplikácie estradiolu na vajíčka sice spôsobila, že XY revertanti mali gonády morfologicky neodlísiteľné od gonád normálnych samíc, nevykazovali však samičie sekundárne pohlavné znaky a nikdy pohlavne nedospeli (Freedberg a kol. 2006)

V týchto prácach sa pomocou hormonálnej manipulácie a následným vznikom pohlavných revertantov podarilo dokázať, že estrogén hrá primárnu rolu pri diferenciácii samičích gonád u niektorých plazov. U cicavcov a vtákov však aplikácia estradiolu aj počas rannej embryogenézy gonády vždy plne nerevertovala. Pri štúdiach na zebričke červenozobej *Taeniopygia guttata*, estradiol spôsobil vznik ovotestes (nefunkčných pohlavných orgánov so samčími aj samičími znakmi) (Wade 2001). V inej práci však bol dokázaný vplyv aplikácie estradiolu počas embryogenézy na budúci výber partnera. Samice mali maskulinizované preferencie a vyberali si prednostne samice (Adkins-Regan a Wade 2001). Žiadna hormonálna manipulácia však nespôsobila, aby si samice vyvinuli typický samčí spev (Wade a Arnold 2002).

Estrogénom indukovaná pohlavná reverzia, aj keď len čiastočná, bola pozorovaná u kengury *Macropus eugenii*. Samčím mláďatám bol odo dňa narodenia orálne podávaný estradiol, ktorý spôsobil bud' vznik nefunkčných testes, alebo v dvoch prípadoch úplnú reverziu testes a vznik morfologicky normálnych ovárií (Coveney a kol. 2001). Autori sa nepokúšali revertované jedince ďalej krížiť, takže napriek vzniku ovárií s primárnymi folikulami (Coveney a kol. 2001), je fertilita revertantov otázna, rovnako ako ich sekundárne pohlavné znaky.

Okrem aplikácie estrogénu sa k reverzii pohlavia v rannej embryogenéze používa metóda inhibície aromatázy, ktorá hrá pri vzniku pohlavného dimorfizmu veľmi významnú rolu u väčšiny stavovcov. Aromatáza (cytochróm P450) je zodpovedná za biosyntézu estrogénu a to tak, že aromatizuje androgény za vzniku estrogénov. Podaním inhibitora aromatázy (napr. Fadrozole, Vorozole) zabránime v danom organizme konverzii testosterónu na estradiol a tým znemožníme vývoj všetkých samičích pohlavných znakov kontrolovaných u daného druhu týmto hormónom.

Metóda podania inhibitora aromatázy v rannej embryogenéze bola už použitá na viacerých druchoch plazov a vtákov. Pri pokusoch na *Taeniopygia guttata* aj *Gallus gallus*,

potvrdila významnú rolu aromatázy pri diferenciácii samičích gonád. U *Gallus gallus* inhibícia aromatázy spôsobila úplnú reverziu gonád, takže u všetkých samíc sa po podaní Fadrozolu vyvinuli bilaterálne samčie testes, a to napriek tomu, že u samíc vtákov je známe, že majú len jednu gonádu, druhá počas pohlavnnej diferenciácie degeneruje. Vzniknutí revertovaní samci exprimujú samčie sekundárne pohlavné znaky, ktoré majú však mierne spomalený vývoj a v niektorých prípadoch sa odlišujú od normálneho samčieho fenotypu. Zaujímavé je, že revertovaní samci s funkčnými testes produkujúcimi normálne spermie (aj keď s nižším obsahom spermíí na objemovú jednotku), vykazovali sice pri pokuse o ich spärenie s normálnymi samicami pravé samčie prekopulačné správanie, ale nepodarilo sa im oplodniť ani jedno vajíčko. Je pravda, že testes revertantov boli sice podľa histológie úplne samčie testes, mali však nepravidelnejší tvar a boli o čosi menšie ako testes priemerného samčieho fenotypu. To by bolo možné vysvetliť tak, že aromatáza je sice primárne zodpovedná za diferenciáciu testes v kritickej perióde, avšak ich úplná funkčnosť je podmienená ešte inými faktormi v neskoršom vývoji, napríklad účinkami hormónov. Takisto je možné, že XX revertovaní samci nemajú správne dávky génov na pohlavných chromozómoch. (Elbrecht a Smith 1992)

Ďalším druhom, na ktorom sa podarilo dosiahnuť pohlavnú reverziu metódou inhibície aromatázy je už spomínaná *Taeniopygia guttata*. V tomto prípade malo šesť z ôsmich manipulovaných samíc úplne revertované gonády a dve samice ovotestes. Revertované gonády boli plne funkčné - produkovali spermie aj androgény. Všetci ZW revertanti mali niektoré samčie sekundárne pohlavné znaky, ako napríklad výrazné sfarbenie zobáku, samčie správanie a maskulinizovanú preferenciu partnera (ZW revertanti si vyberali samice). Žiadnen revertant však nemal maskulinizovaný spev (Adkins-Regan a Wade 2001, Adkins-Regan 2008). Kastrácia dospelých samcov naopak redukuje typické samčie reprodukčné správanie a mierne ovplyvňuje aj spev, ale kastrovaní samci spievajú (Wade 2001).

Porovnanie proximátnych mechanizmov kontroly pohlavného dimorfizmu u druhu s GSD s enviromentállym vplyvom a druhu s TSD, tiež umožnila pohlavná reverzia s využitím metódy inhibície aromatázy. U druhu *Bassiana duperreyi* (GSD s enviromentállym vplyvom) je pri väčšine inkubačných teplôt pomer pohlaví 1:1 a zatial nebola zistená teplota, pri ktorej by bol pomer pohlaví posunutý na stranu samic. Pri veľmi nízkych teplotách, sa však pomer pohlaví posúva na stranu samcov (Radder a kol. 2008). Na adruhej strane, u druhu *Amphibolorus muricatus* sú známe jednak termosenzitívne períody, v ktorých dochádza k posunom v pomeroch pohlaví a jednak aj relatívne presné očakávateľné pomery pohlaví produkované v týchto teplotách (Warner 2008). V tomto pokuse inkubovali vajíčka oboch

druhov pri rovnakej teplote 23 °C, pri ktorej sa u *Amphibolorus muricatus*, dá očakávať produkcia čisto samičích mláďat a u *Bassiana duppereyi* 50% samcov. Na vajíčka obidvoch druhov aplikovali rovnaké dávky Fadrozolu v rôznych časoch inkubačnej doby. Z výsledných pomerov pohlaví vyplýva, že inhibícia aromatázy má najväčšie účinky v druhej tretine inkubačnej doby, a teda v rovnakom čase, ako je u väčšiny druhov plazov s TSD alebo GSD s enviromentálnym vplyvom, termosenzitívna períoda. U oboch druhov sa totiž po podaní Fadrozolu v tejto període zmenil pomer pohlaví a všetky mláďatá sa vyvinuli ako samce. Po tejto període už nemala aplikácia Fadrozolu na determináciu pohlavia žiadny vplyv a mláďatá sa rodili v očakávaných pomeroch pohlaví (Shine a kol. 2007).

5.3. Manipulácie v neskorších štádiách ontogenézy

Proximátne mechanizmy pohlavného dimorfizmu môžme študovať aj inými metódami ako je reverzia pohlavia. Tieto metódy využívajú podobné mechanizmy-prostredníctvom hormonálnych manipulácií, gonadektomizácií, prípadne transplantácií gonád pomáhajú u organizmov odlišiť znaky, za ktoré sú zodpovedné aktivačné a organizačné účinky pohlavných hormónov a znaky spôsobené vplyvom diferencovanej gonády.

5.3.1. Gonadektomizácia a hormonálne manipulácie

Gonadektomizácia je operácia, pri ktorej sa samcom odstránia testes a samiciam ováriá. Túto metódu je možné kombinovať s exogénnou či endogénnou aplikáciou hormónov, alebo s ich inhibíciou.

Typickým príkladom využitia tejto metódy pri výskume pohlavného dimorfizmu, je modelový druh *Eublepharis macularius*, u ktorého je pohlavie determinované inkubačnou teplotou (TSD), ale na vývoj jeho dospelého správania vplyvajú oba tieto faktory (inkubačná teplota a pohlavie) zvlášť (Rhen a Crews 2000). Gonadektomizáciou dospelých samcov a samíc pochádzajúcich z rôznych inkubačných teplôt a následnou aplikáciou pohlavných hormónov, dokážeme odlišiť, ktoré druhy správania sú podmienené organizačnými účinkami inkubačnej teploty, prítomnosťou a funkciou gonád a ktoré aktivačnými alebo organizačnými účinkami pohlavných hormónov.

Dospelí samci aj samice pochádzajúci z rôznych inkubačných teplôt, boli gonadektomizovaní a pod kožu im boli implantované hormonálne implantáty, ktoré obsahovali estradiol (E2), dihydrotestosterón (DHT) alebo testosterón (T). Po štyroch týždňoch od operácie boli behaviorálne testovaní na samičie pohlavné špecifické správanie

ako je atraktivita a receptivita a samčie pohlavne špecifické správanie, teda olizovanie samice, značkovanie prekloakálnymi pórmami, uchopenie samice zubami a tiež na agonistické interakcie s nemanipulovanými samcami.

Samice po odstránení ovárií v dospelosti nevykazujú radu behaviorálnych samčích znakov (značkovanie, vibrácia chvostom, samčie prekopulačné správanie), a to ani v prípade, že majú kontrolované hladiny androgénov prostredníctvom T-implantátov. U kastrovaných samcov tie isté hladiny androgénov naopak toto správanie aktivujú napriek absencii gonád. Tieto výsledky naznačujú, že vývin typického samčieho epigamného správania u *Eublepharis macularius* je v embryogenéze spôsobený organizačným účinkom inkubačnej teploty alebo pohlavia jedinca a potom v dospelosti je toto správanie aktivované pohlavnými hormónmi.

5.3.2. Transplantácia gonád a hormonálne manipulácie

Veľmi zaujímavou, ale náročnou metódou pohlavnej reverzie, je transplantácia gonád v kombinácii s hormonálnou manipuláciou. Implantáciou samčích testes boli revertované ZW samice rodu *Xenopus* (Watson a Kelley 1992, podľa Mikamo a Witschi 1963). Reverzia nebola vo všetkých prípadoch úplná, niektoré jedince by sme mohli jednoznačne zaradíť medzi intersexu. Tieto jedince bud' neúplne vyvinuté primárne pohlavné znaky (ovotestes), alebo nevyvinuté sekundárne pohlavné znaky. V niektorých prípadoch mali revertované samice úplný samčí fenotyp, vrátane samčieho spevu (Watson and Kelley 1992).

Podľa tohto vzoru bola táto metóda použitá u hybridov rodu *Xenopus* (kríženci *Xenopus muelleri* a *X. laevis*). Hybridné revertované samice boli vytvorené aplikáciou estradiolu do vody, kde sa žubrienky vyvíjali až do ukončenia metamorfózy. Hybridní revertovaní samci boli vytvorení gonadektomizáciou a následne im boli transplantované testes nerevertovaných samcov *Xenopus laevis*. Tak vznikli genotypy ZLZ_M samca s fenotypom samice a ZLW_M samice so samčím fenotypom. Genotypy krížencov boli potvrdené PCR. Výslední samci v F2 boli sterilní, aj tí normálni, aj revertovaní, kdežto všetky samice, aj tie revertované, boli fertilné. Tieto výsledky odporujú všeobecnému Haldaneovmu pravidlu, že pri hybridizácii má zniženú reprodukčnú schopnosť, najčastejšie heterogametické pohlavie, v tomto prípade, by to mali byť samice (Malone a Michalak 2008).

5.4. Genetické manipulácie

Genetická manipulácia v tomto kontexte, je metóda, pri ktorej genetickými metódami zmeníme genotyp jedinca v niektorom konkrétnom géne, či už jeho inzerciou, deléciou alebo knockoutom. Pri výskume pohlavného dimorfizmu sa táto metóda aplikuje na gény, ktorých expresia podmieňuje vznik pohlavne dimorfných znakov. Známe sú pokusy na laboratórnych myšiach s deletovaným Sry z Y chromozómu a Sry transgénom na autozóme alebo štúdie na myšiach s knockoutovanými estrogénovými receptormi ($\alpha\beta$ ERKO) či knockoutom aromatázy (ArKO).

Na testovanie vplyvu pohlavne-špecifických génov na pohlavných chromozómoch na diferenciáciu pohlavného dimorfizmu, sa používa tzv. De Vriesov model (De Vries a kol. 2002). Tento model je založený na vzniku štyroch rôznych genotypov po manipulácii s pohlavie-determinujúcim génom Sry u myší. Deléciou Sry na Y chromozóme vznikne genotyp XY⁻, ktorý je podľa prítomnosti ovárií identifikovaný, ako samičí fenotyp. Týmto myšiam je následne na autozóme vložený transgén Sry a tým vznikne genotyp XY⁻Sry, so samčím, plne fertilným fenotypom. Následne sú tieto XY⁻Sry samce skrížené s normálnymi XX samicami, za vzniku štyroch genotypov v F1: XX samice, XY⁻ samice, XY⁻Sry samce a XXSry samce. De Vries využil túto metódou pri testovaní hypotézy, že X a Y pohlavne-špecifické gény priamo ovplyvňujú dimorfnú diferenciáciu mozgu nehormonálnymi mechanizmami (Wersinger a Rissman 2000, De Vries a kol. 2002). Podarilo sa mu dokázať efekt chromozomálneho komplementu na hustotu vazopresínových vlákien v laterálnom septe, ktorá je u myší pohlavne špecifická. V týchto testoch boli jedince s XY chromozomálnym komplementom maskulinnejšie ako XX samice a XXSry sameci.

Okrem morfologických rozdielov v mozgu boli skúmané aj behaviorálne fenotypy týchto štyroch genotypov. Pred behaviorálnymi testami boli najskôr podrobene gonadektomizáciu a následnej aplikáciu adekvátnej dávky pohlavných hormónov (samci T-implantáty a samice E2-implantáty a injekovaný progesterón) podľa Rissmanovej metódy (Rissman 1997). Všetky štyri skupiny boli testované na agresivitu, kopulačné správanie a sociálnu exploráciu. Výsledkom bolo, že aj pri behaviorálnych testoch sa preukázal efekt chromozomálneho komplementu, avšak v menšej miere, ako efekt organizačných a aktivačných účinkov pohlavných hormónov (De Vries a kol. 2002, McCarthy a Arnold 2008). Jedinci so samčím fenotypom, boli agresívnejší, vykazovali maskulinizované kopulačné aj exploráčné správanie. Výraznejší efekt chromozomálneho komplementu sa podarilo dokázať

v morfológii gonád: XXSry samci majú menšie testes ako XY-Sry samci. Efekt chromozomálneho komplementu môže byť zapríčinený rôznymi genetickými mechanizmami: 1. pohlavné špecifickými génmi kódovanými na Y chromozóme, ktoré zapríčinujú maskulinizáciu alebo inhibíciu feminizácie znaku; 2. dvojitolou dózou génov kódovaných na X chromozóme u XX jedincov (niektoré X-gény nepodliehajú inaktivácii pri heterochromatinizácii); 3. maternálnym/paternálnym imprintingom (inaktivácia buď paternálneho alebo maternálneho X-chromozómu) (Wersinger a Rissman 2000, De Vries a kol. 2002).

Knockoutom pohlavných hormónov prípadne ich receptorov je možné zistíť, či a do akej miery sú ich účinky zodpovedné za determináciu pohlavia a vývin pohlavného dimorfizmu. Genetickým knockoutom estrogénových receptorov, úplne z ontogenézy vylúčime jeho aktivačné aj organizačné účinky. Okrem modelu $\alpha\beta$ ERKO myší (s knockoutom α , β alebo oboch estrogénových receptorov) je známy model ArKO myší, s knockoutom génu pre aromatázu. Štúdií pohlavného dimorfizmu na ERKO a ArKO myšiach je obrovské množstvo a tátó téma je dostatočne obsiahla pre samostatné review (kterých už niekoľko existuje: Lindzey a Korach 1997, Couse a Korach 1999, alebo najnovšie review Hill a Boon 2009).

Záver

Pohlavný dimorfizmus z proximátneho hľadiska je kontrolovaný rôznymi mechanizmami. Počnúc organizačnými a aktivačnými účinkami pohlavných hormónov, cez organizačný efekt inkubačnej teploty v senzitívnej període až po efekt chromozomálneho komplementu.

Štúdium pohlavného dimorfizmu a proximátnych mechanizmov jeho vzniku sa nezaobíde bez využitia metód, ktoré tieto rôzne mechanizmy filtrovajú a umožňujú tak pochopiť, ktoré pohlavné dimorfné znaky sú podmienené ktorými proximátnymi mechanizmami. Medzi tieto metódy patria rôzne hormonálne manipulácie a manipulácie s inkubačnou teplotou v skorej embryogenéze, ktoré v mnohých prípadoch spôsobujú úplnú pohlavnú reverziu, aj keď nie vždy spôsobia aj reverziu fenotypu. Ďalej sú to rôzne operácie a manipulácie s pohlavnými gonádami v kombinácii s hormonálnymi manipuláciami a genetické manipulácie. Výnimočným prípadom sú spontánne mutácie v génoch determinujúcich pohlavie alebo génoch priamo či nepriamo kontrolujúcich pohlavné dimorfné znaky, ktorých vznik nie je sice indukovaný zámerne experimentátorom, ale sú zdrojom cenných poznatkov o genetickej kontrole pohlavného dimorfizmu.

Cieľom tejto práce bolo zhrnúť v súčasnosti používané metódy pri výskume proximátnych mechanizmov kontroly pohlavné dimorfné znakov so zameraním na metódy využívajúce vznik pohlavných revertantov, ktoré využijem aj v mojej diplomovej práci pri štúdiu kontroly pohlavného dimorfizmu u *Coleonyx elegans*. Súčasťou tejto práce je prehľadná tabuľka druhov (viz Tabuľka 2), u ktorých boli pri štúdiu pohlavného dimorfizmu metódy popisované v práci úspešne využité.

Tabuľka 2 - Prehľad výskumu pohlavného dimorfizmu s využitím metód pohlavnej reverzie

Trieda	Druh	Určenie pohlavia	Manipulácia	Výsledok manipulácie
Osteichthyes				
	<i>Poecilia reticulata</i>	XX/XY	spontánna reverzia	rozdiel v počte abdominálnych stavcov, XX samci so samičím počtom (14/15) a XY samice so samčím (15/16)
	<i>Oryzias laticeps</i>	XX/XY, TSD	spontánna reverzia, mutácia <i>Dmy</i>	úplná reverzia XY a YY na samice; fertilné so samičím fenotypom
	<i>Oryzias laticeps</i>	XX/XY, TSD	inkubačná teplota	úplná reverzia samice na XX samca; fertilní so samčím fenotypom
Amphibia				
	<i>Xenopus muelleri</i>	ZZ/ZW	transplantácia gonád a hormonálna manipulácia	ZW samci sterilní, ZZ samice fertilné (rovnako ako u nerevertovaných hybridov)
	<i>Xenopus laevis</i>	ZZ/ZW		
Reptilia				
	<i>Staurotypus salvinii a triporcatus</i>	XX/XY, GSD	estradiol	len samice, 2 intersexys s ovotestes
	<i>Trachemys scripta</i>	TSD	estradiol v rôznej inkub. teplote, inhibícia aromatázy	reverzia gonád v niektorých prípadoch, do rôznej miery revertované intersexys
	<i>Apalone spinifera</i>	bez heterochromozómov, GSD	inkubačná teplota	úplná reverzia, normálne gonády
	<i>Amphibolorus muricatus</i>	TSD	inhibícia aromatázy	XX samci so samčím fenotypom
	<i>Bassiana duppereyi</i>	XX/XY, GSD	inhibícia aromatázy	XX samci so samčím fenotypom
	<i>Bassiana duppereyi</i>	XX/XY, GSD	inkubačná teplota + estradiol	XX samci-everzia hemipenisov, ďalšie znaky?

	<i>Eublepharis macularius</i>	TSD	inkubačná teplota	teplotní revertanti
	<i>Eublepharis macularius</i>	TSD	gonadektomizácia + hormonálna manipulácia	čiastočná maskulinizácia/feminizácia správania
	<i>Coleonyx elegans</i>	XX/XY	inhibícia aromatázy, estradiol	*
Aves				
	<i>Taeniopygia guttata</i>	ZZ/ZW, GSD	estradiol	ZZ samci so samičím behaviorálnym fenotypom
	<i>Taeniopygia guttata</i>	ZZ/ZW, GSD	inhibícia aromatázy	ZW s testes/ovotestes, funkčné spermie, samčie pohl. dimorf. sfarbenie aj preferencia partnera, ale nie spev
	<i>Gallus gallus domesticus</i>	ZZ/ZW, GSD	inhibícia aromatázy	ZW samice so samčím fenotypom (úplná aj čiastočná reverzia)
Mammalia				
	<i>Mus musculus</i>	XX/XY, GSD	genetická manipulácia, knockout ER alpha a ER beta receptorov	intersexy, neúplná reverzia
	<i>Mus musculus</i>	XX/XY, GSD	genetická manipulácia (knockout Sry a pripojenie Sry na autozóm)	4 genotypy: XY- (samice); XY-Sry (fertilní samci), XX (normálna samica); XXSry (samci);
	<i>Tammar wallabi</i>	XX/XY, GSD	estrogén	intersexy, neúplná reverzia

* Tento druh zatiaľ neboli revertovaný, plánovaný pokus v rámci mojej diplomovej práce.

Zoznam použitej literatúry

- Adkins-Regan, E. a J. Wade** (2001). "Masculinized sexual partner preference in female zebra finches with sex-reversed gonads." Hormones and Behavior **39**(1): 22-28.
- Adkins-Regan, E.** (2008). "Do hormonal control systems produce evolutionary inertia?" Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **363**(1497): 1599-1609.
- Agate, R. J. a Grisham W., a kol.** (2003). "Neural, not gonadal, origin of brain sex differences in a gynandromorphic finch." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(8): 4873-4878.
- Arnold, A. P. a Breedlove S.M.** (1985). "Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior - A reanalysis." Hormones and Behavior **19**(4): 469-498.
- Arnold, A. P.** (2004). "Sex chromosomes and brain gender." Nature Reviews Neuroscience **5**(9): 701-708.
- Becker, J. B. a Berkley K. J., N. G., Elizabeth Hampson, James P. Herman, Elizabeth A. Young, Ed.** (2008). Sex differences in the brain: from genes to behavior. Sex differences in the brain: What's old and what's new? Oxford, Oxford University Press, Inc.
- Bonduriansky, R. a Chenoweth, S. F.** (2009). "Intralocus sexual conflict." Trends in Ecology & Evolution **24**(5): 280-288.
- Couse, J. F. a Korach, K. S.** (1999). "Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us?" Endocrine Reviews **20**(3): 358-417.
- Coveney, D. a Shaw, G. a kol.** (2001). "Estrogen-induced gonadal sex reversal in the tammar wallaby." Biology of Reproduction **65**(2): 613-621.
- Crews, D.** (2003). "Sex determination: where environment and genetics meet." Evolution & Development **5**(1): 50-55.
- De Vries, G. J. a Rissman, E. F. a kol.** (2002). "A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits." Journal of Neuroscience **22**(20): 9005-9014.
- Elbrecht, A. a Smith, R. G.** (1992). "Aromatase enzyme-activity and sex determination in chickens." Science **255**(5043): 467-470.
- Ezaz, T., a Quinn, A. E. a kol.** (2005). "The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes." Chromosome Research **13**(8): 763-776.
- Freedberg, S. R., Ewert, M. A. a Nelson, C. E.** (2006). "Long-term sex reversal by oestradiol in amniotes with heteromorphic sex chromosomes."?
- Godwin, J.** (2009). "Social determination of sex in reef fishes." Seminars in Cell & Developmental Biology **20**(3): 264-270.
- Goodfellow, P. N. a LovellBadge, R.** (1993). "Sry and sex determination in mammals." Annual Review of Genetics **27**: 71-92.

- Greenbaum, E. a Carr, J. L.** (2001). "Sexual differentiation in the spiny softshell turtle (*Apalone spinifera*), a species with genetic sex determination." Journal of Experimental Zoology **290**(2): 190-200.
- Hill, R. A. a Boon, W. C.** (2009). "Estrogens, Brain, and Behavior: Lessons from Knockout Mouse Models." Seminars in Reproductive Medicine **27**(3): 218-228.
- Janzen, F. J. a Paukstis, G. L.** (1991). "Environmental sex determination in reptiles - ecology, evolution, and experimental design." Quarterly Review of Biology **66**(2): 149-179.
- Johnson, G. D., Paxton, J. R. a kol.** (2009). "Deep-sea mystery solved: astonishing larval transformations and extreme sexual dimorphism unite three fish families." Biology Letters **5**(2): 235-239.
- Lindzey, J. a Korach, K. S.** (1997). "Developmental and physiological effects of estrogen receptor gene disruption in mice." Trends in Endocrinology and Metabolism **8**(4): 137-145.
- Malone, J. H. a Michalak, P.** (2008). "Physiological sex predicts hybrid sterility regardless of genotype." Science **319**(5859): 59-59.
- Mikamo, K. a Witschi, E.** (1963). "Functional sex-reversal in genetic females of *Xenopus laevis*, induced by implanted testes." Genetics **48**(10): 1411-1416.
- Nakajima, M. a Fujio, Y.** (1999). "Sex dimorphism in the number of abdominal vertebra in the guppy *Poecilia reticulata*." Tohoku Journal of Agricultural Research **49**(3-4): 87-92.
- Otake, H., Hayashi, Y. a kol.** (2008). "The Y chromosome that lost the male-determining function behaves as an X chromosome in the medaka fish, *Oryzias latipes*." Genetics **179**(4): 2157-2162.
- Pokorná, M. a Kratochvíl, L.** (2009). "Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap?" Zoological Journal of the Linnean Society **156**(1): 168-183.
- Radder, R. S., Quinn, A. E. a kol.** (2008). "Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard." Biology Letters **4**(2): 176-178.
- Ramsey, M., Shoemaker, C. a kol.** (2007). "Gonadal expression of Sf1 and aromatase during sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*), a reptile with temperature-dependent sex determination." Differentiation **75**(10): 978-991.
- Ramsey, M. a Crews, D.** (2009). "Steroid signaling and temperature-dependent sex determination - Reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles." Seminars in Cell & Developmental Biology **20**(3): 283-292.
- Rissman, E. F., Early, A. H. a kol.** (1997). "Estrogen receptors are essential for female sexual receptivity." Endocrinology **138**(1): 507-510.
- Rhen, T. a Crews, D.** (2000). "Organization and activation of sexual and agonistic behavior in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*." Neuroendocrinology **71**(4): 252-261.

- Selim, K. M., Shinomiya, A. a kol.** (2009). "Effects of high temperature on sex differentiation and germ cell population in medaka, *Oryzias latipes*." Aquaculture **289**(3-4): 340-349.
- Shine, R., Warner, D. A. a kol.** (2007). "Windows of embryonic sexual lability in two lizard species with environmental sex determination." Ecology **88**(7): 1781-1788.
- Valenzuela, N., Adams, D. C. a kol.** (2003). "Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined?" American Naturalist **161**(4): 676-683.
- Wade, J.** (2001). "Zebra finch sexual differentiation: The aromatization hypothesis revisited." Microscopy Research and Technique **54**(6): 354-363.
- Wade, J. a Arnold, A. P.** (2002). Sexual differentiation of the zebra finch song system. Conference on Behavioral Neurobiology of Birdsong, New York, NY, New York Acad Sciences.
- Wallis, M. C., Waters, P. D. a kol.** (2008). "Sex determination in mammals - Before and after the evolution of SRY." Cellular and Molecular Life Sciences **65**(20): 3182-3195.
- Warner, D. A., Lovern, M. B. a kol.** (2008). "Maternal influences on offspring phenotypes and sex ratios in a multi-clutching lizard with environmental sex determination." Biological Journal of the Linnean Society **95**(2): 256-266.
- Watson, J. T. a Kelley, D. B.** (1992). "Testicular masculinization of vocal behavior in juvenile female *Xenopus laevis* reveals sensitive periods for song duration, rate, and frequency-spectra." Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology **171**(3): 343-350.
- Wersinger, S. R. a Rissman, E. F.** (2000). "Dopamine activates masculine sexual behavior independent of the estrogen receptor alpha." Journal of Neuroscience **20**(11): 4248-4254.