

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Ekologie  
Zaměření: Terestrická Ekologie



Bc. Klára Farkačová

**Proximální kontrola pohlavního dimorfismu  
u živorodky *Poecilia wingei***

**Proximate control of sexual dimorphism in livebearer  
*Poecilia wingei***

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Praha, 2013



**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, 14. 8. 2013

Podpis



# Obsah

Obsah .....	5
Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
1 Úvod.....	9
1.1 Určení pohlaví .....	9
1.1.1 Gonochoristé .....	11
1.1.1.1 GSD .....	11
1.1.1.1.1 Pohlavní chromosomy .....	11
1.1.1.1.2 Geny určující pohlaví.....	12
1.1.1.2 Teplotně ovlivněné GSD .....	13
1.1.1.3 ESD.....	14
1.1.1.3.1 Teplota .....	14
1.1.1.3.2 Densita ryb .....	14
1.1.1.3.3 pH.....	15
1.1.1.3.4 Sociálně.....	15
1.1.1.3.5 Hypoxie.....	15
1.1.2 Hermafrodité .....	16
1.1.2.1 Pohlavní chromosomy a geny určující pohlaví .....	16
1.2 Diferenciace gonád .....	16
1.2.1 Savci.....	16
1.2.1.1 Primární pohlavní znaky.....	17
1.2.1.1.1 Mechanismy primární determinace pohlaví.....	17
1.2.1.2 Sekundární pohlavní znaky .....	18
1.2.1.2.1 Mechanismy sekundární determinace pohlaví.....	19
1.2.1.3 Vývoj gonád .....	19
1.2.1.3.1 Diferenciace varlat .....	19
1.2.1.3.2 Diferenciace vaječníků.....	20
1.2.1.4 Interakce genetické a hormonální regulace vývoje gonád.....	21
1.2.1.4.1 Počáteční fáze endokrinní regulace .....	21
1.2.1.4.2 Aromatáza .....	21
1.2.2 Kostnaté ryby .....	22

1.2.2.1	Gonochoristé.....	22
1.2.2.2	Hermafrodité.....	23
1.2.2.2.1	Protogynie – pyskoun .....	23
1.2.2.2.2	Protandrie – klaun .....	23
1.2.2.2.3	Obousměrná změna u hlaváčovitých (Gobiidae).....	24
1.3	Pohlavní reverze .....	24
1.3.1	Medaka japonská (Beloniformes: Adrianichthyidae) .....	25
1.3.2	Tilapie (Perciformes: Cichlidae) .....	26
1.3.3	Živorodka duhová (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) .....	27
1.3.4	Proximální kontrola pohlavního dimorfismu u živorodky <i>Poecilia wingei</i> .....	29
1.3.4.1	<i>Poecilia wingei</i> .....	29
1.3.4.2	Hypotézy.....	30
1.3.4.3	Predikce .....	30
2	Materiál a metodika.....	30
3	Výsledky .....	32
3.1	1. fáze.....	32
3.2	2. fáze.....	33
4	Diskuze.....	33
4.1	Gonády.....	34
4.2	Pohlavně dimorfní znaky .....	35
4.3	Závěr.....	36
	Použitá literatura .....	37

## Poděkování

Můj dík patří především mému školiteli Lukáši Kratochvílovi za jeho pomoc, ochotu a trpělivost. Ráda bych ale poděkovala i rodině, partnerovi a všem ostatním, kteří mě při psaní této práce ve dne v noci ochotně podporovali.

## Abstrakt

Byl zkoumán efekt  $17\alpha$ -methyltestosteronu a  $17\beta$ -estradiolu na pohlaví živorodých ryb *Poecilia reticulata* a *P. wingei*. Čerstvě narozenému potěru byl první a patnáctý den přidán do akvária roztok 2,5 mg testosteronu. Estrogen byl aplikován do potravy gravidních samic (400 mg/kg). V jednom, dvou a třech měsících věku bylo určeno pohlaví všech jedinců. K reverzi pohlaví nedošlo ani při podávání testosteronu, ani při podávání estrogeneru, v tomto případě se rozmnožovací proces zastavil téměř u všech samic.

**Klíčová slova:** pohlavní chromosomy, reverze pohlaví, *Poecilia reticulata*, *Poecilia wingei*, testosteron, gonády, gonopodium

## **Abstract**

The effect of  $17\alpha$ -methyltestosterone and  $17\beta$ -estradiol on sex of livebearer fish *Poecilia reticulata* and *P. wingei* was studied. Solution of 2.5 mg testosterone was added in the aquarium the first and fifteenth day after delivery of new fry. Estrogen was administered in food to gravid females (400 mg per 1 kg food). Sex of all individuals was determined in one, two and three months. Administration of neither testosterone nor estrogen caused sex reversal; in the second case reproduction of almost all females was stopped.

**Key words:** sex chromosomes, sexual reversal, *Poecilia reticulata*, *Poecilia wingei*, testosterone, gonads, gonopodium



# 1 Úvod

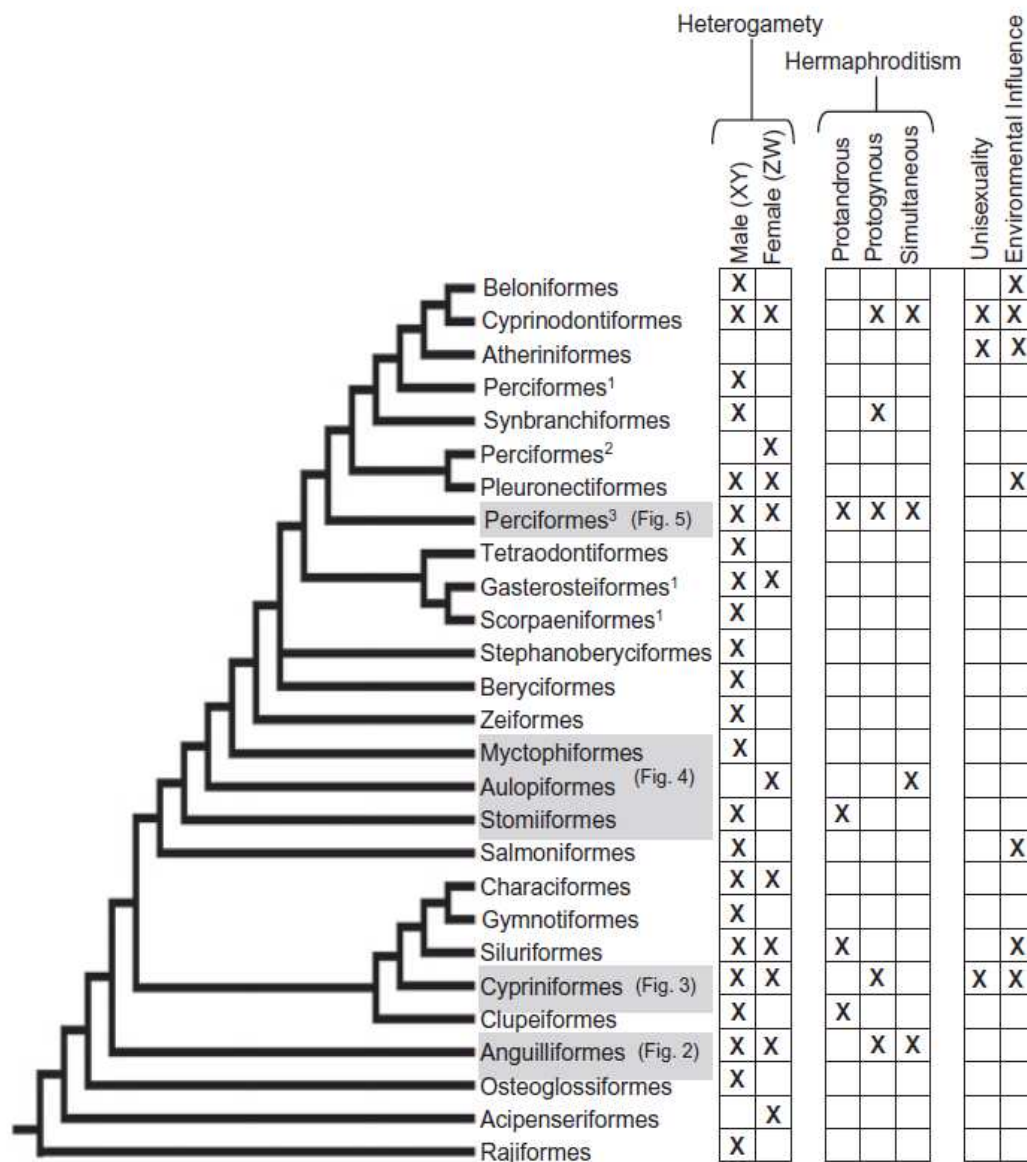
## 1.1 Určení pohlaví

Gonády obratlovců se zakládají jako nediferencovaný orgán schopný vyvinout se ve vaječníky i ve varlata (Francis 1992).

U obratlovců existuje více způsobů určení pohlaví. To může být určeno genotypově (GSD), environmentálně (ESD) anebo přechodnými systémy mezi těmito dvěma typy (Pandian & Koteeswaran 1998; Pandian & Koteeswaran 1999). U GSD je pohlaví určeno na základě přítomných pohlavních chromosomů, které se projeví vždy stejně, a to za jakýchkoliv environmentálních podmínek. U ESD určují pohlaví pouze vnější faktory, neboť tito jedinci žádné pohlavní chromosomy nemají. Nicméně u GSD mohou výsledné pohlaví i přes pohlavní chromosomy ovlivňovat i vnější faktory, zejména teplota, potom hovoříme o teplotní reverzi u GSD. U GSD dále existuje mnoho způsobů, jak mohou chromosomy výsledné pohlaví určovat. U savců určuje pohlaví přítomnost genu *Sry* na Y chromosomu, jestliže je přítomen (XY), je jedinec samec, pokud není přítomen (XX), je jedinec samice. U ptáků je situace opačná, samci mají dva stejné pohlavní chromosomy (ZZ) a samice mají dva odlišné (ZW) (Smith & Sinclair 2001), nicméně zatím není přesně známo, jestli pohlaví určuje jeden konkrétní gen nebo více faktorů.

Na rozdíl od savců a ptáků se u kostnatých ryb nachází mnoho různých mechanismů, které zajišťují určení pohlaví a pohlavní diferenciaci. U gonochoristických druhů byly nalezeny všechny možné způsoby pohlavních chromosomů, od samčí nebo samičí heterogamie až po přítomnost více párů pohlavních chromosomů (Nagahama 2005). U mnoha druhů ryb jsou také do určení pohlaví zahrnuty různé environmentální faktory, které mohou buď jen vést k reverzi pohlaví, pokud je předem určeno pohlavními chromosomy, nebo pohlaví určovat, pokud druh pohlavní chromosomy vůbec nemá (environmental sex determination, ESD). Nejznámější je teplota vody, ale mnohé studie popisují vliv density ryb, pH, nedostatku kyslíku, sociálních vazeb nebo věku na poměr pohlaví u ryb (Baroiller et al. 2009; Baroiller & Guiguen 2001). Navíc jsou kostnaté ryby jedinými obratlovci, u kterých se vyskytuje hermafroditismus jako normální funkční stav a ne jako vývinová porucha.

Ačkoliv je nyní popsáno přes 32 500 druhů ryb (www.fishbase.org k 1.5.2013), zůstávají mechanismy určení pohlaví u většiny z nich nejasné a pravděpodobně jsou kombinací genetických i environmentálních faktorů (Volff et al. 2007).



**Obrázek 1.** Fylogenetický strom ukazuje známé mechanismy určení pohlaví u kostnatých ryb. Pokud je v daném řádku jen jedna značka, znamená to, že všechny zkoumané druhy z toho taxonu vykazují daný reprodukční typ; dvě nebo více značek znamenají, že různé druhy tohoto taxonu vykazují alternativní reprodukční typy. Převzato z Mank et al. (2006).

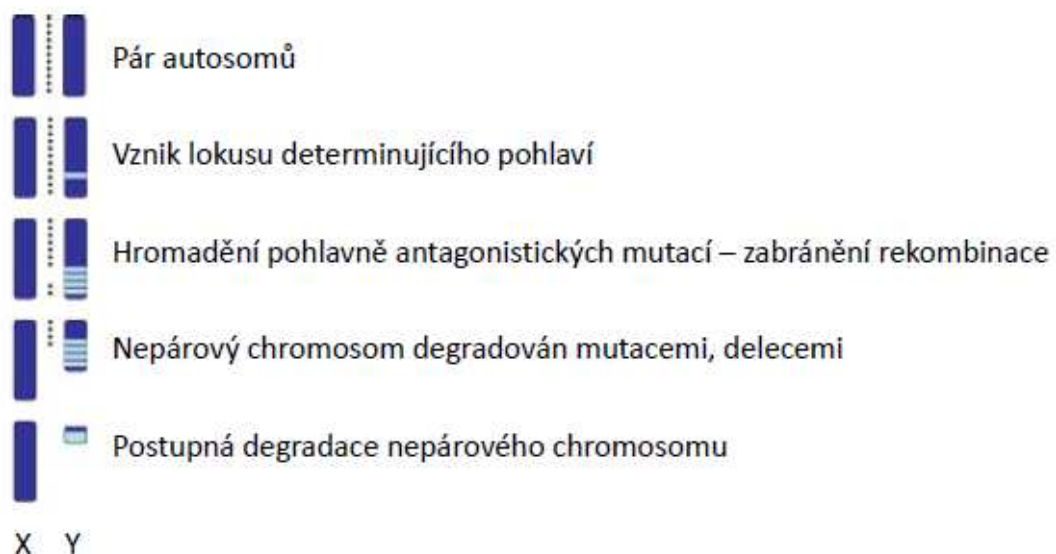
## 1.1.1 Gonochoristé

### 1.1.1.1 GSD

Genotypové určení pohlaví je u kostnatých ryb založeno na systémech XX-XY (Born & Bertollo 2000), XX-X0 (Alves et al. 2006) i WZ-ZZ (Bellafronte et al. 2012; Venere et al. 2004) pohlavních chromosomech.

#### 1.1.1.1.1 Pohlavní chromosomy

Ačkoliv u savců vznikly pohlavní chromosomy jen dvakrát – u předka ptakořitných a u předka živorodých (Veyrunes et al. 2008) – a u ptáků vznikly pohlavní chromosomy jen jednou, u ryb vznikly mnohokrát a to dokonce i v rámci jedné skupiny (např. lososovití; Li et al. 2011). Pohlavní chromosomy byly nalezeny u cca 10 % zkoumaných druhů (Devlin & Nagahama 2002). Výskyt pohlavních chromosomů je však tímto odhadem hodně podhodnocený, neboť málo diferencované pohlavní chromosomy jsou v karyotypu obtížně rozpoznatelné.



**Obrázek 2.** Evoluce pohlavních chromosomů. Podle Graves 2010.

Podle obecně uznávané hypotézy o evoluci pohlavních chromosomů vznikly pohlavní chromosomy z normálního páru autosomů, na kterých se nacházel lokus, který určoval pohlaví (SD lokus), a následně mezi nimi byla potlačena rekombinace (Bergero & Charlesworth 2009). Rekombinace může být potlačena jednak díky inverzi (nebo jiné přestavbě chromosomu), která zahrnuje SD lokus, protože inverze zabraňuje proběhnutí crossing-overu v tomto úseku během meiózy, případně akumulací repetitivních sekvencí. Zabránění rekombinace může být výhodné z hlediska přirozeného výběru, který by tak umožnil rozřešení sexuálního intralokusového konfliktu vazbou pohlavně

antagonistických alel na pohlavně specifické části genomu. Během dlouhé doby bez rekombinace by nerekombinující chromosom akumuloval mutace, které by zvyšovaly jeho odlišnost od druhého chromosomu, a delece, které by jej postupně degradovaly (rev. in Ellegren 2011).

#### **1.1.1.1.2 Geny určující pohlaví**

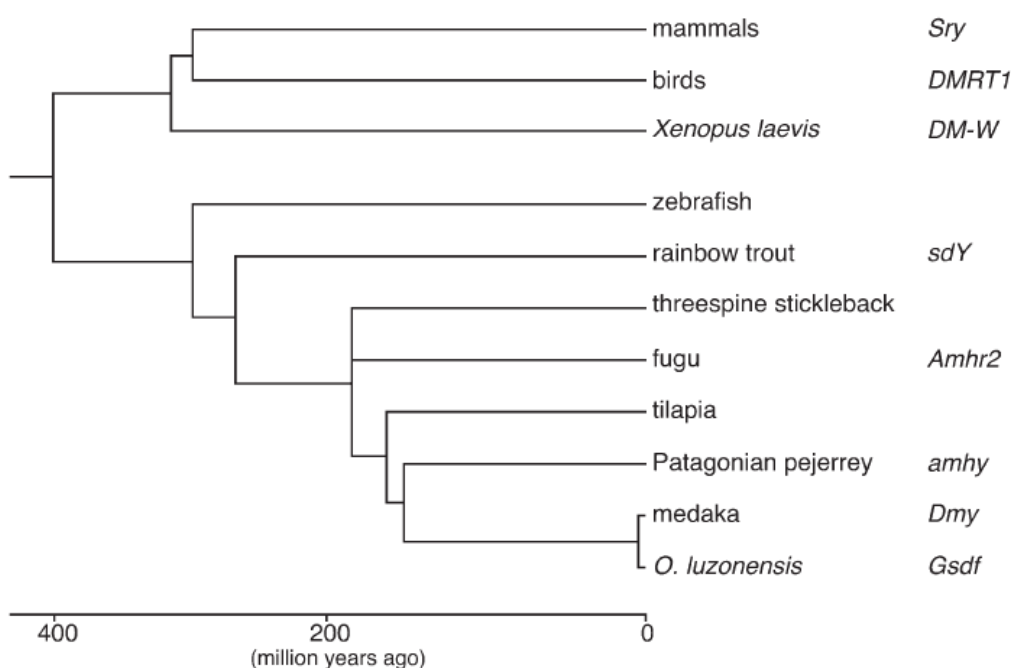
Prvním druhem kostnatých ryb, u kterého byl nalezen gen určující pohlaví na pohlavních chromosomech, byl v roce 2002 *Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel, 1846) (Matsuda et al. 2002) s genem *Dmy*. Tento gen je duplikovanou kopií genu *Dmrt1*, který patří do *Dmrt* rodiny genů, která má DM-doménu. Je exprimován v embryonálních gonádách různých obratlovců (Herpin & Schartl 2011) a ačkoliv není u všech druhů hlavním genem určujícím pohlaví, ukázalo se, že je nezbytný pro diferenciaci varlat u savců, kuřat a medaky (Masuyama et al. 2012; Raymond et al. 2000; Smith et al. 2009).

*Gsdf* (*gonadal soma derived growth factor*) byl nalezen u blízce příbuzného druhu medaky, *Oryzias luzonensis* (Herre & Ablan, 1934). Exprese tohoto genu byla nalezena u samců během diferenciaci gonád a tento gen dokázal způsobit pohlavní reverzi po přidání do genomu XX jedinců. Geneticky manipulovaní jedinci se vyvinuli jako samci, kteří se dokázali úspěšně rozmnožovat (Myosho et al. 2012).

U gavúnovce *Odontesthes hatcheri* (Eigenmann, 1909) byl také nalezen gen specifický pro samce, duplikovaná kopie genu pro anti-mülleriánský hormon. Tento gen, *amhy*, je lokalizován v Sertolliho buňkách během diferenciaci varlat (Hattori et al. 2012). Pokud byl u samců gen *amhy* umlčen, vyvinuly se jim vaječníky (Hattori et al. 2012).

Dalším genem určujícím pohlaví u ryb je *Amhr2* u čtverzubce rudoploutvého *Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel, 1850). Kombinace dvou alel tohoto genu (homozygotní samice a heterozygotní samci) pravděpodobně odpovídá za určení pohlaví. Tyto alely se liší pouze v jedné aminokyselině a kódují receptor pro anti-mülleriánský hormon. *Amhr2* navíc leží v regionu, kde není žádný důkaz, že by zde byla potlačena rekombinace mezi X a Y chromosomy. Čtverzubec je tedy zřejmě neobyčejným příkladem pre-diferenciační fáze pohlavních chromosomů u obratlovců (Kamiya et al. 2012).

Expresí genu *sdY* (*sexually dimorphic on the Y chromosome*) byla zatím nalezena jen v somatických buňkách varlat pstruha duhového, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Cílená inaktivace tohoto genu u samců způsobila diferenciaci vaječníků. Tyto výsledky ukazují, že *sdY* je další gen určující pohlaví u obratlovců (Yano et al. 2012). Později se ukázalo, že *sdY* sekvence je silně konzervovaná u lososovitých ryb a *sdY* je u většiny těchto druhů genem určujícím pohlaví (Yano et al. 2013). U dvou druhů podčeledi Coregoninae byl ale *sdY* nalezen u samců i u samic, což naznačuje, že v této čeledi se vyvinuly i alternativní systémy determinace pohlaví (Yano et al. 2013).



**Obrázek 3.** Známé geny určující pohlaví u tetrapod a kostnatých ryb a fylogeneze druhů, u kterých byly nalezeny. Převzato z Kikuchi & Hamaguchi 2013.

### 1.1.1.2 Teplotně ovlivněné GSD

Některé druhy kostnatých ryb, jako je třeba tilapie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), mají pohlaví určené chromosomy (Harvey et al. 2003), ale to může být později změněno teplotou působící v době vývoje (Schartl 2004).

Teplota může změnit poměr pohlaví různými způsoby: Jednak může způsobovat odlišnou mortalitu samčích a samičích embryí, potom je poměr pohlaví vychýlený a může se zdát, že pohlaví určuje teplota, ta však jen mění sekundární poměr pohlaví. V druhém případě může jít o skutečnou reverzi pohlaví teplotou u druhů s GSD, to znamená, že se jedinci vyvinou jako opačné pohlaví, než mají geneticky dané (Valenzuela et al. 2003).

Ve většině sensitivních druhů narůstá procento samců se vzrůstající teplotou. Naopak ale bylo u některých druhů pozorováno zvýšení počtu samic se vzrůstající teplotou, a to u sumečka tečkovaného (*Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818)) (Patiño et al. 1996) a u lososa nerka (*Oncorhynchus nerka* (Walbaum, 1792)) (Craig et al. 1996).

Vliv teploty na poměr pohlaví byl mimo jiné zjištěn také u druhu *Danio rerio* Fowler, 1934 (Sfakianakis et al. 2012).

### **1.1.1.3 ESD**

U druhů s ESD neexistují žádné genetické rozdíly mezi pohlavími. Nejčasnější ontogenetický rozdíl mezi pohlavími je způsoben vnějším prostředím, které má vliv na pohlaví během sensitivní periody vývoje organismu. Tehdy nevratně určuje fenotypové pohlaví a tím i poměr mezi pohlavími (Valenzuela et al. 2003).

#### **1.1.1.3.1 Teplota**

První důkaz, že u některých ryb může pohlaví ovlivnit i teplota, přinesli Conover & Kynard (1981), kteří studovali gavúna z pobřeží Severní Ameriky, *Menidia menidia* (Linnaeus, 1766). Poté bylo zjištěno u více než 60 druhů z rozličných řádů, že u nich teplota ovlivňuje pohlaví (zrevidováno v Baroiller et al. 2009). Nicméně následně byl tento počet zrevidován podle teplotního průběhu závislosti poměru pohlaví u daných druhů a tento počet byl výrazně snížen. Většina předpokládaných druhů totiž měla GSD s teplotní reverzí (Ospina-Alvarez & Piferrer 2008).

Podle studie Ospina-Alvarez & Piferrer (2008) existují jen čtyři řády kostnatých ryb, kde je určení teploty skutečně založené pouze na teplotě, navíc mezi těmito čeleděmi nejsou žádné blízké vztahy, což naznačuje, že teplotní určení pohlaví je skutečná výjimka v určení pohlaví u ryb a mohlo se vyvinout v evoluci nezávisle na sobě.

Konkrétně byl tento způsob určení pohlaví nalezen například u pancéřníčka *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828), gavúnovců *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) a *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes, 1835), živoroděnky *Poeciliopsis lucida* Miller, 1960 a 33 druhů cichlid rodu *Apistogramma* Regan, 1913 (Ospina-Alvarez & Piferrer 2008).

#### **1.1.1.3.2 Densita ryb**

V divokých populacích dospělých úhořů byly často pozorovány vychýlené poměry pohlaví. Úhoři jsou katadromní druhy, rozmnožují se v mořské vodě a larvy migrují do sladkých vod, kde se vyvíjejí. U úhoře amerického (*Anguilla rostrata* (Le Sueur, 1817)) převládají v populaci samci, a to až třikrát (Krueger & Oliviera 1999).

Hlavním faktorem ovlivňujícím poměr pohlaví je zde nejspíš densita ryb, čím je větší, tím více je v populaci samců (Davey & Jellyman 2005). Sami autoři nicméně přiznávají, že není úplně jisté, zda densita ovlivňuje přímo primární nebo až sekundární/ terciární poměr pohlaví, a také zatím není znám mechanismus, jakým by densita na poměr pohlaví mohla působit. Každopádně u úhoře amerického zatím nebyla potvrzena přítomnost pohlavních chromosomů.

#### **1.1.1.3.3 pH**

Při prvních pokusech o ovlivnění poměru pohlaví pomocí pH se zjistilo, že kyselá voda (pH 6,2) zajišťuje 100% samčí populaci u mečovky *Xiphophorus helleri*, zatímco zásaditá voda (pH 7,8) způsobí, že v populaci jsou téměř jen samice (>98 % samic) (Rubin 1985). Podobných výsledků bylo dosaženo také u pestřence *Pelvicachromis pulcher* (Boulenger, 1901) z čeledi Cichlidae, kde pH 4–5 způsobuje, že v populaci je 90 % samců, zatímco zásaditá voda (pH 6,9) způsobuje 80 % samic (Rubin 1985). *P. pulcher* byl také rozmnožován při neutrálním pH a výsledkem byl poměr pohlaví 1:1 (Rubin 1985). U všech pokusů byla úmrtnost do 5 %, takže signifikantně neovlivnila výsledky. Efekt pH byl zjištěn i u *Apistogramma caetei* Kullander, 1980, kde byl vyrovnaný poměr pohlaví zjištěn při kyselém pH (4,5–5,5), zatímco při téměř neutrálním pH (6,5) byly v populaci skoro samé samice (96 %).

#### **1.1.1.3.4 Sociálně**

Na rozdíl od většiny obratlovců může být u ryb ovlivněn vývoj reprodukčních orgánů abiotickými i sociálními environmentálními faktory (Baroiller et al. 2009). Oldfield (2011) ale sociální faktory určení pohlaví vyvrací, na základě pokusů na kančíkovi citronovém (*Amphilophus citrinellus* (Günther, 1864)) potvrzuje, že je u něj pohlaví určeno genotypově, protože při pitvách gonád nenachází žádné znaky, které by naznačovaly možnost vývoje gonád druhého pohlaví.

#### **1.1.1.3.5 Hypoxie**

Ačkoliv je *Danio rerio* Fowler, 1934 modelovým druhem, stále se neví, jak přesně má určeno pohlaví. Nedávno bylo zjištěno, že dania vystavena hypoxii (0,8 mg O<sub>2</sub>/l na 120 dní) měla v populaci více samců (75 %), zatímco při normální koncentraci kyslíku ve vodě (5,8 mg/l) bylo v populaci 62 % samců (Shang et al. 2006). Později zjištěný fakt, že poměr pohlaví u *Danio rerio* ovlivňuje teplota, nijak nevyvrací vliv hypoxie (Sfakianakis et al. 2012).

## 1.1.2 Hermafrodité

Hermafrodité mají během svého života samčí i samičí gonády, a to buď současně v jednu chvíli, potom jsou to hermafrodité simultánní anebo procházejí přirozenou změnou pohlaví. Přirozená změna může proběhnout jen jedenkrát, potom jsou to hermafrodité sekvenční, nebo vícekrát, potom jsou sérioví. U sekvenčních hermafroditů ještě rozlišujeme, jestli se jedinec mění ze samice na samce (protogynie) nebo ze samce na samici (protandrie) a v mnoha případech je změna pohlaví řízena sociálními podněty, například zmizením samce nebo samice ze skupiny.

Všechny tyto typy se vyskytují u ryb, a to v nezanedbatelném počtu. Funkční hermafroditismus byl prozatím nalezen u 27 čeledí v 94 rodech kostnatých ryb (Sadovy de Mitcheson & Liu 2008). Tento reprodukční systém se vyskytuje napříč kostnatými rybami a vyskytuje se ve skupinách, kde jsou jinak gonochoristické druhy s vyvinutými pohlavními chromosomy. Hermafroditismus je tedy nejspíše polyfyletický a odvozený a zdá se, že neexistují žádné evolučně staré hermafroditické linie (Mank et al. 2006).

### 1.1.2.1 Pohlavní chromosomy a geny určující pohlaví

Ačkoliv je hermafroditismus u ryb velmi zajímavým jevem, existuje zatím velmi málo studií, které by se věnovaly jejich pohlavním chromosomům. Zatím všechny studie vyvracejí, že by se u obligátních hermafroditů vyskytovaly pohlavní chromosomy (Ota et al. 2000; Ruiz-Carus 2002). Stejně tak zatím nebyly nalezeny žádné geny, které by u hermafroditů určovaly pohlaví (Pandian 2012).

U fakultativních hermafroditů, jako je například mečovka *Xiphophorus hellerii* Heckel, 1848, se samozřejmě nacházejí i pohlavní chromosomy (Nanda et al. 1992). U některých jedinců zde může dojít ke zvratu pohlaví, vždy ze samice na samce (Essenberg 1926). Tito jedinci byli schopní před zvratem pohlaví rodit mláďata a po zvratu pohlaví byli schopni oplodnit mladé samice, potomstvo potom mělo poměr pohlaví stejný, jako u normálních párů.

## 1.2 Diferenciace gonád

Pohlavní diferenciace se vztahuje k expresi pohlavně specifického fenotypu. Zatímco vývoj gonády je založen na přítomnosti / absenci genu určujícího pohlaví nebo na environmentálních faktorech, diferenciace gonád je vždy řízena pohlavními hormony, které jsou produkovány gonádou.

### 1.2.1 Savci

Savce zde zmiňuji pro orientaci a definici základních pojmů pro srovnání s diverzifikovanějšími kostnatými rybami, které jsou hlavním předmětem práce.



U savců je pohlaví určeno vždy pouze genotypově. Hlavní roli v determinaci samčí gonády hraje chromosom Y, na němž je lokalizován gen *SRY* (*Sex-determining region Y*) (Goodfellow & Lovell-Badge 1993).

### **1.2.1.1 Primární pohlavní znaky**

Jak je shrnuto v Gilbert (2006), je u savců primární určení pohlaví zajištěno chromosomy a následně typem gonády – vaječníky nebo varlata. Vytvoření gonád je aktivní proces řízený geny. Neexistuje žádné „základní stádium“, oba typy gonád se vyvíjejí z jednoho prekursoru – bipotenciální gonády.

Ve většině případů má samice karyotyp s XX chromosomy, samci mají XY. Každý životaschopný jedinec musí mít alespoň jeden chromosom X. Samice produkuje haploidní vajíčka, která jsou všechna stejná, nesou chromosom X, samci produkují dva typy haploidních spermií, nesoucí chromosomy X nebo Y. Pokud během oplození dodá spermie vajíčku chromosom X, začnou se potomkovi vyvíjet vaječníky a stane se z něj samice, zatímco pokud spermie dodá vajíčku chromosom Y, potomek bude mít varlata, a tedy to bude samec.

Chromosom Y je klíčový pro určení pohlaví u savců, protože se na ně nachází gen určující pohlaví, který nasměruje vývoj gonád směrem k varlatům namísto vaječnicků. Pokud má jedinec chromosom Y, a nezáleží na počtu chromosomů X, vždy to bude samec, zatímco jedinec X0 bude samice (ačkoliv nebude fertilní).

#### **1.2.1.1.1 Mechanismy primární determinace pohlaví**

Jelikož genů z genetické kaskády diferenciaci gonády je mnoho a některé nejsou zatím prozkoumané, zmíním se o několika nejlépe prozkoumaných:

*SRY* (*Sex-determining region of Y chromosome*) je hlavní gen, který se podílí na determinaci pohlaví u většiny savců. Nachází se na krátkém raménku chromosomu Y. Protein SRY působí přímo v základu gonády, kde konvertuje somatické buňky bipotentiální gonády na Sertoliho buňky. Ortology genu *SRY* byly nalezeny u ostatních placentálů i u vačnatců, ale nebyly nalezeny u ptakořitných (Sekido & Lovell-Badge 2013). Transkript genu se u myší objevuje v diferencovaných Sertoliho buňkách 13,5 dní po oplození a je exprimován převážně v dospělých zárodečných buňkách a částečně ve spermatidách (Capel et al. 1993). U některých ostatních placentálů nemusí být exprese *SRY* omezena pouze na embryonální linii Sertoliho buněk. Příkladem je třeba koza, vybraná jako zástupce savců nepříbuzných hlodavců. *SRY* je u kozy exprimován ve všech typech somatických a zárodečných buněk v gonádě během embryonálního stádia a během dospělosti je jeho výskyt omezen na Sertoliho buňky a spermatogonia (Montazer-Torbati et al. 2010).

*SOX9* je autozomální gen, který se účastní několika vývojových procesů ve varlatech. U myši se nevyvinou varlata, pokud *SOX9* chybí, i když je *SRY* přítomen (Barrionuevo et al. 2006). *SOX9* je také nutný k aktivaci anti-mülleriánského genu (Arango et al. 1999). *SOX9* se nachází u většiny obratlovců.

*Fibroblast growth factor 9 (FGF9)* je gen, který způsobuje proliferaci prekurzorů Sertoliho buněk a stimuluje jejich diferenciaci (Schmahl et al. 2004).

*Steroidogenic factor 1 (SF1)* je gen, jehož protein je zahrnut do produkce testosteronu v Leydigových buňkách a je schopný inaktivovat anti-mülleriánský hormon v Sertoliho buňkách.

*DAX1* je gen na chromosomu X, který je nejspíš antagonistický k funkci *SRY* a *SOX9* a reguluje expresi *SF1* (Iyer & McCabe 2004).

*WNT4* je parakrinní faktor, který potlačuje samčí vývoj v samičí gonádě. U lidí, kteří mají XY chromosomy a mají duplikovaný gen *WNT4*, je nadprodukován *DAX1* a gonády se vyvíjejí jako vaječníky (Jordan et al. 2001).

### **1.2.1.2 Sekundární pohlavní znaky**

Sekundární pohlavní znaky jsou všechny ostatní znaky, kterými se pohlaví liší, mimo gonád. To u samců savců znamená především penis a šourek, semenné váčky a prostatu. Samice mají například vaginu, klitoris, pysky, děložní čípek, dělohu, vejcovody a mléčné žlázy. U mnoha druhů se jedinci opačného pohlaví liší také velikostí těla, odlišnou svalnatostí, chováním a mnohými dalšími znaky. Tyto druhotné pohlavní znaky jsou většinou řízeny hormony, které vylučují gonády. Pokud gonády chybí, je často vytvořen samičí fenotyp (Jost 1953).

Pokud v karyotypu chybí chromosom Y, ze zárodečné gonády se vytvoří vaječníky, které produkují estrogen, hormon, který umožní přeměnu Müllerova vývodu na dělohu, vaječníky a horní část vaginy. Pokud je přítomen chromosom Y, vytvoří se varlata, která produkují dva hlavní hormony. Anti-Mülleriánský hormon (AMH) zabraňuje vývoji Müllerových vývodů (Josso et al. 1998; Josso 1986) a testosteron maskulinizuje plod, stimuluje vývoj penisu, šourku a jiných samčích orgánů a stejně tak inhibuje vývoj mléčných žláz a prsou.

Pohlavní fenotyp jedince je určen hormony, které produkují jednotlivé gonády. Tento vývoj má dvě fáze – první, embryonální, během organogeneze a druhou v dospívání.

### **1.2.1.2.1 Mechanismy sekundární determinace pohlaví**

**Testosteron** je steroidní hormon vylučovaný především Leydigovými buňkami. Díky němu se Wolffův vývod diferencuje v nadvarlata, chámovody a semenné vajíčky. Ačkoliv je to jeden ze dvou primárně maskulinizujících hormonů, v některých tkáních plní jeho funkci jeho derivát 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron (DHT), který maskulinizuje močovod, prostatu, penis nebo šourek.

**Antimüllerianský hormon (AMH)** je vylučován Sertoliho buňkami v plodu a způsobuje degeneraci Müllerova vývodu. AMH se váže na mezenchymální buňky, které obklopují Müllerův vývod, a způsobuje, že tyto buňky vylučují parakrinní faktor, který indukuje apoptózu epitelu vývodu. AMH je také vylučován, i když v menším množství, folikulárními buňkami od porodu do konce reprodukčního života. Nijak neovlivňuje určení pohlaví, ale negativně působí na vývoj gonád u obou pohlaví (Josso et al. 1998).

Steroidní hormon **estrogen** je potřeba pro vývoj Müllerových i Wolffových vývodů a stejně tak je nezbytný u samců i samic k tomu, aby byli plodní. U samic je estrogen vylučován z vaječnicků embrya a začíná diferenciaci Müllerových vývodů na dělohu, vejcovody a děložní čípek. U samců estrogen reguluje absorpci vody v buňkách *vas efferens*, která způsobuje silnější koncentraci spermií a zajišťuje jim delší život (Couse 1999).

### **1.2.1.3 Vývoj gonád**

Zatímco ze všech ostatních základů orgánů se vyvíjí vždy jen jeden typ orgánu (ze základů jater se vyvinou vždy jen játra, ze základů střeva se vyvine jen střevo), ze základů gonád se mohou vyvinout i vaječnický i varlata. Tato diferenciaci je založena na genotypu a určuje budoucí sexuální vývoj organismu (Goodfellow & Lovell-Badge 1993). Dřív než ale začne diferenciaci, projdou si savčí gonády indiferentním stádiem, během kterého nenesou samčí ani samičí znaky.

#### **1.2.1.3.1 Diferenciace varlat**

Samčí a samičí embrya jsou v počátku svého vývoje morfologicky nerozlišitelná. U obou pohlaví se z urogenitální lišty vyvíjí bipotentní gonády. V určitém okamžiku vývoje se samčí a samičí dráhy oddělí podle přítomnosti *SRY* genu. Rozhodujícím okamžikem pro samčí pohlavní vývoj je zformování varlat, namísto vaječnicků, z bipotenciální gonády. Přítomnost genu *SRY* tedy vede nejprve k tomu, že se v gonádě vyvíjejí Sertoliho buňky. Ty vylučují AMH, který blokuje vývoj samičích vývodů.

Mezitím se intersticiální mesenchymální buňky varlat diferencují v Leydigovy buňky, které produkují androgeny, zejména testosteron, který maskulinizuje zbytek těla.

Krátce po vytvoření varlat se u embrya objevují fetální Leydigovy buňky v interstitiu a zůstávají zde do doby okolo porodu, kdy jsou nahrazeny dospělými Leydigovými buňkami (Habert et al. 2001).

### 1.2.1.3.2 Diferenciace vaječnicků

Zjištění, že ustanovení varlat u savců je podmíněné přítomností chromosomu Y, poskytlo podporu pro model, kdy je proces diferenciace vaječnicků považován za základní, dokud není usměrněn genem *SRY* na vývoj varlat (Goodfellow & Darling 1988). Následně bylo potvrzeno, že pokud v plodu nefunguje *SRY* nebo *SOX9*, bipotentní gonáda se vyvine jako vaječník (Barrionuevo et al. 2006; Chaboissier et al. 2004; Koopman et al. 1991). Nicméně stále není jasné, jaké jsou přesné genetické mechanismy pohlavního vývoje u samic savců (Tevosian 2013).

Vaječnický mají dvě hlavní role: produkci steroidních hormonů a výrobu zralých oocytů. Funkční jednotkou dospělých vaječnicků jsou folikuly, které se skládají ze zralých oocytů, které jsou obklopeny podpůrnými folikulárními buňkami (samičí protějšek Sertolliho buněk) a thekálními buňkami (samičí protějšek Leydigových buněk). Zatímco folikulární buňky produkují progesteron a estrogény, thekální buňky produkují progesteron a androgeny. Na rozdíl od masivní přestavby samčích gonád nepodstupují samičí orgány dramatické morfologické změny v období narození embrya. Embryonální vaječnický však v žádném případě nezůstávají nečinné. Na molekulární a buněčné úrovni se zapojují do dimorfní aktivity, protože zárodečné buňky vstupují do meiózy (rev. in McLaren & Southee 1997).

Klíčovými regulátory vývoje vaječnicků jsou transkripční faktory z GATA rodiny (GATA vázající proteiny 4 a 6) a jejich kofaktor FOG2.

Transkripční faktor FOXL2 je detekovatelný ve vyvíjející se XX gonádě u myši již 11,5 dne po oplození (Wilhelm et al. 2009). Pokud je v myších vaječnickách umlčen, vyvinou se jako varlata, ačkoliv jsou v nich stále vajíčka (Uhlenhaut et al. 2009).

WNT4 patří do rodiny 19 proteinů, které hrají klíčovou roli během vývoje, tedy v embryonální organogenezi, určování polaritě buněk a buněčné diferenciace u obratlovců. Během bipotentní fáze gonády je *WNT4* exprimován v XX i XY gonádách, ale ve velmi malém množství. Exprese se u myši stává specifickou pro samice 12,5 dne po oplození. Pokud v samičích embryích chybí *WNT4*, vykazují pár významných defektů během pohlavního vývoje. Například tvar gonády je zakulacený a podobá se varlatům, začnou se objevovat buňky produkující androgeny a začnou mizet samičí zárodečné buňky (Vainio et al. 1999). To vedlo k závěrům, že *WNT4* normálně funguje jako supresor vývoje Leydigových buněk (Vainio et al. 1999). Následující analýzy ukázaly,

že WNT4 spíše kontroluje migraci endoteliálních a steroidogenních prekursorů do vaječnicků (Heikkilä et al. 2002).

#### **1.2.1.4 Interakce genetické a hormonální regulace vývoje gonád**

Primárním spouštěčem určení pohlaví je u savců samozřejmě gen *SRY* (Koopman et al. 1991). Následně gonády začnou produkovat steroidní hormony, které vyvolají příslušný fenotyp u tkání mimo gonády, jako jsou genitálie, svaly, mozek atd. Proto je na pohlaví u obratlovců nahlíženo jako na sled více kroků. První krok nastává v gonádách, kde je pohlaví určeno genetickou regulací, zatímco druhý krok nastává i v ostatních tkáních, kde je pohlavní dimorfismus spouštěn a následně i udržován endokrinní regulací (Morohashi et al. 2013).

##### **1.2.1.4.1 Počáteční fáze endokrinní regulace**

Větší produkce estrogenu ve vaječnicích začíná teprve v období puberty, do té doby jsou udržovány jen nízké hladiny. Potlačení produkce steroidů u samic je v silném kontrastu s aktivní produkcí u samců, kde již gonády embrya produkují znatelné množství androgenů. Tomu napovídá například fakt, že přerušení estrogenové signalizace nemá žádný vliv na počáteční vývoj vaječnicků u myši (Toda et al. 2001). V pozdějším stádiu pohlavně zralých vaječnicků se stává aktivita estrogenu zásadní pro jejich fungování (Britt et al. 2004).

Jednou z dominantních funkcí estrogenu by mohlo být zabránění diferenciaci samičích podpůrných buněk na buňky podobné Sertoliho buňkám, neboť se zjistilo, že vede k udržování *SOX9* v transkripčně neaktivním stavu (Pask et al. 2010).

U samců bude spojitost mezi genetickou a endokrinní regulací pravděpodobně obdobná. Ztráta transkripčního faktoru *DMRT1* v Sertoliho buňkách u myši, a to i u dospělých, aktivuje *FOXL2* a přeprogramuje Sertoliho buňky na folikulární buňky (Matson et al. 2011). V tomto prostředí se zformují thekální buňky, začne se produkovat estrogen a zárodečné buňky vypadají jako samičí. Tudíž je *DMRT1* u savců nezbytný k determinaci varlat (Matson et al. 2011).

##### **1.2.1.4.2 Aromatáza**

Aromatáza (estrogen syntetáza; *Cyp19*) je enzym odpovědný za klíčový krok v biosyntéze estrogenu. Patří do nadrodiny cytochrom P450, což jsou monooxidázy, které katalyzují mnoho reakcí steroidogeneze. Konkrétně se podílí na přeměně androgenů na estrogenu. Enzym aromatáza se nachází v mnoha tkáních, včetně gonád, mozku, tukové tkáni, placentě, kůži a kostech. Je také důležitým faktorem v pohlavním vývoji.

Aromatáza je obecně vysoce exprimována během diferenciaci vaječníků (Duffy et al. 2010). Je také citlivá na environmentální faktory, zejména teplotu. U druhů s teplotně závislým určením pohlaví, tedy ne u savců, je exprimována ve větším množství při teplotách, které způsobují samičí potomstvo (Duffy et al. 2010). I přes to, že tato data ukazují, že množství aromatázy je závislé na teplotě, jiné studie ukázaly, že aromatáza může překonat vliv teploty: pokud je organismus vystaven většímu množství aromatázy při teplotě, při které se normálně vyvíjejí samci, organismus se vyvine v samici a naopak (Nakamura 2010).

U organismů, které mají GSD, nemá teplota vliv na expresi a funkci aromatázy, což by mohlo naznačovat, že aromatáza je cílová molekula teploty během teplotně závislého určení teploty (Duffy et al. 2010).

## **1.2.2 Kostnaté ryby**

### **1.2.2.1 Gonochoristé**

U mnoha druhů ryb bylo potvrzeno, že důležitou roli v diferenciaci gonád hrají pohlavní steroidní hormony (Devlin & Nagahama 2002; Guiguen et al. 2010). Nicméně zatím neexistuje žádný důkaz, který by objasňoval, jestli endogenní pohlavní steroidy hrají nezbytnou roli v zahájení diferenciaci gonád u ryb (Kobayashi et al. 2013).

U ryb byly nalezeny dvě isoformy aromatázy (*Cyp19a* a *Cyp19b*). Oba typy jsou exprimovány v mozku, varlatech a vaječnicích, aromatáza *Cyp19a* je navíc exprimována ve slezině, aromatáza *Cyp19b* v játrech. Do regulace vitelogeneze je však zapojena jen aromatáza *Cyp19a*, neboť výskyt transkriptů *Cyp19b* nekoreluje s vývojem vaječníků (Kobayashi et al. 2004). Wang et al. (2007) došli k závěru, že Foxl2 a aromatáza *Cyp19a* jsou u tilapie nezbytné pro vývoj vaječníků. Naopak u samců se steroidogenní enzymy objevují až po diferenciaci varlat, navíc u nich nebyla identifikována exprese aromatázy *Cyp19a*, a to ani po začátku spermatogeneze (Nakamura et al. 1998). Navíc nebyla zaznamenána ani exprese enzymu kritického pro produkci hlavního androgenu u ryb, 11-ketotestosteronu, v XX ani v XY gonádách (Wang et al. 2007). U tilapie je tedy s diferenciací varlat korelována spíše absence estrogenu než přítomnost androgenů (Kobayashi et al. 2013). Co se týče Dmrt1 u tilapie, tak *in vivo* i *in vitro* funkční analýzy ukázaly, že pravděpodobně vyvolává diferenciaci varlat pomocí přímé blokace produkce estrogenu (Wang et al. 2010).

### **1.2.2.2 Hermafrodité**

U hermafroditů nebyly zatím učiněny žádné obecné závěry, studie existují jen u pár druhů. Vzhledem k tomu, že u nich probíhá změna pohlaví v dospělosti, jsou to ideální modely pro výzkum diferenciac gonád u obratlovců.

#### **1.2.2.2.1 Protogynie – pyskoun**

Pyskouni (Labridae) jsou hlavní skupinou, u které se vyskytuje protogynie. Jedinci obvykle dospívají jako samci i samice a za příslušných sociálních podmínek se samci i samice iniciální fáze (initial phase – IP) mění na samce koncové fáze (terminal phase – TP). Zatím co IP samci prodělají pouze změnu sociálního statusu, IP samice prodělají změnu pohlavní orientace i fenotypu gonády. Vaječníky samic, u kterých nebyla nalezená žádná tkáň varlat, jsou během změny pohlaví plně přestavěny na funkční varlata (Hourigan et al. 1991 podle Kobayashi et al. 2013). Během počátku pohlavního zvratu degenerují oocyty a pak jsou vstřebány makrofágy. Tato fáze je doprovázena rychlým poklesem hladiny estradiolu. Naopak hladina 11-ketotestosteronu postupně narůstá, stejně jako přibývá tkáň varlat (Nakamura et al. 1989, podle Kobayashi et al. 2013). Změnu pohlaví tedy spouští spíše rapidně klesající hladina estrogenu než nárůst androgenů.

#### **1.2.2.2.2 Protandrie – klaun**

Klauni rodu *Amphiprion* jsou běžní obyvatelé tropických korálových útesů, kteří se brání predaci tím, že žijí mezi mořskými sasankami, které je chrání. Každá skupina klaunů kolem jedné sasanky sestává z jednoho rozmnožujícího se páru a 0-4 nerozmnožujících se jedinců (Elliott & Mariscal 2001). V každé skupině je největší jedinec rozmnožující se samice a druhý největší rozmnožující se samec, ostatní jsou menší (Hattori 2000). Smrt nebo zmizení samice vede k přeměně samce na samici, který tím získá také dominantní postavení ve skupině (Godwin & Thomas 1993, podle Kobayashi et al. 2013).

Histologické analýzy gonád ukázaly, že samci a ostatní nerozmnožující se jedinci mají bisexuální gonády s vyvinutými samčími a nevyvinutými samičími tkáněmi, zatímco gonády samic obsahují pouze samičí tkáň (Nakamura et al. 1994). Během změny pohlaví se z bisexuální gonády vyvine tkáň vaječnicků a samčí tkáň zanikne. Hlavními regulátory změny pohlaví u klaunů jsou pohlavní steroidy, zvláště estrogen (Kobayashi et al. 2010). Stejně tak aromatáza byla detekována pouze ve folikulech vaječnicků během samičí fáze, zatímco v samčí fázi detekována nebyla. Aromatáza tedy zřejmě bude spojená s oogenezí v samičí fázi, ale ne s bisexuální gonádou v samčí fázi (Kobayashi et al. 2010). Mechanismy kontrolující produkci a aktivitu pohlavních hormonů během změny pohlaví zůstávají stále neznámé.

### **1.2.2.2.3 Obousměrná změna u hlaváčovitých (Gobiidae)**

*Trimma okinawae* (Aoyagi, 1949) je ryba z čeledi hlaváčovitých a je to první známá kostnatá ryba, která je schopná obousměrné změny pohlaví. Tato ryba je polygynní a harém se normálně skládá z jednoho dominantního samce a jedné nebo více samic. Odstranění dominantního samce z harému způsobí, že se největší samice přemění na samce. Pokud se ale dominantní samec vrátí, jedinec, který prodělal protogynii, se změní zpět na samici (Manabe et al. 2008, 2007).

Histologie ukázala, že tento druh má tkáň vaječníků i varlat přítomnou dohromady v jednu dobu (Kobayashi et al. 2005), ale vždy je aktivní jen jedna z nich (Kobayashi et al. 2009). Jedním z kontrolních mechanismů změny pohlaví by mohly být gonadotropní hormony, respektive jejich receptory. Ty jsou aktivní vždy jen v té části gonády, která odpovídá aktuálnímu pohlaví (Kobayashi et al. 2009). Základním stavem gonády u sekvenčních hermafroditů by ale mohly být vaječnky, neboť v pokusech měli všichni nedospělí jedinci hlaváčovitých ryb měnících pohlaví pouze nevyvinuté vaječnky (Kobayashi et al. 2013).

## **1.3 Pohlavní reverze**

Spontánní zvrát pohlaví byl pozorován u ryb i mnoha jiných obratlovců s významnou výjimkou savců. Změnu pohlaví může způsobit aplikace hormonů i různé environmentální faktory (Pandian & Koteeswaran 1999). Zásadní okamžik pro experimentální změnu pohlaví je správné načasování počáteční diferenciace gonád, když se primordiální zárodečné buňky stále ještě mohou vyvinout v oogonia nebo spermatogonia. Tato fáze se liší čeleď od čeledě (Pandian & Sheela 1995). První kompletní funkční zvrát pohlaví byl proveden u *Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel, 1846) (Yamamoto 1959). Pokud byl larvám podán estradiol, vyvinuly se všechny v samice, zatímco po podání methyl-testosteronu vznikla u 100 % jedinců varlata. Dosažená diferenciace byla stabilní a pohlavně revertovaní jedinci byli schopni se dále rozmnožovat.

Steroidní hormony se obvykle přidávají do vody, ve které se vyvíjí potěr nebo do jejich krmení (Pandian et al. 1994, 1999). Částečná změna pohlaví je pozorována často a u mnoha druhů, trvalá změna se také vyskytuje, ale revertovaní jedinci mají potomky pouze s nerevertovanými jedinci stejného genetického pohlaví. Pokud se do krmení pro potěr přidají androgeny (methyltestosteron, androstenedion nebo 11-ketotestosteron), genetické samice jsou kompletně pohlavně revertovány, zatímco po přidání estrogenů (estradiol, estron nebo diethylstibestrol) jsou revertováni genetičtí samci (Pandian & Koteeswaran 1999; Pandian & Sheela 1995).

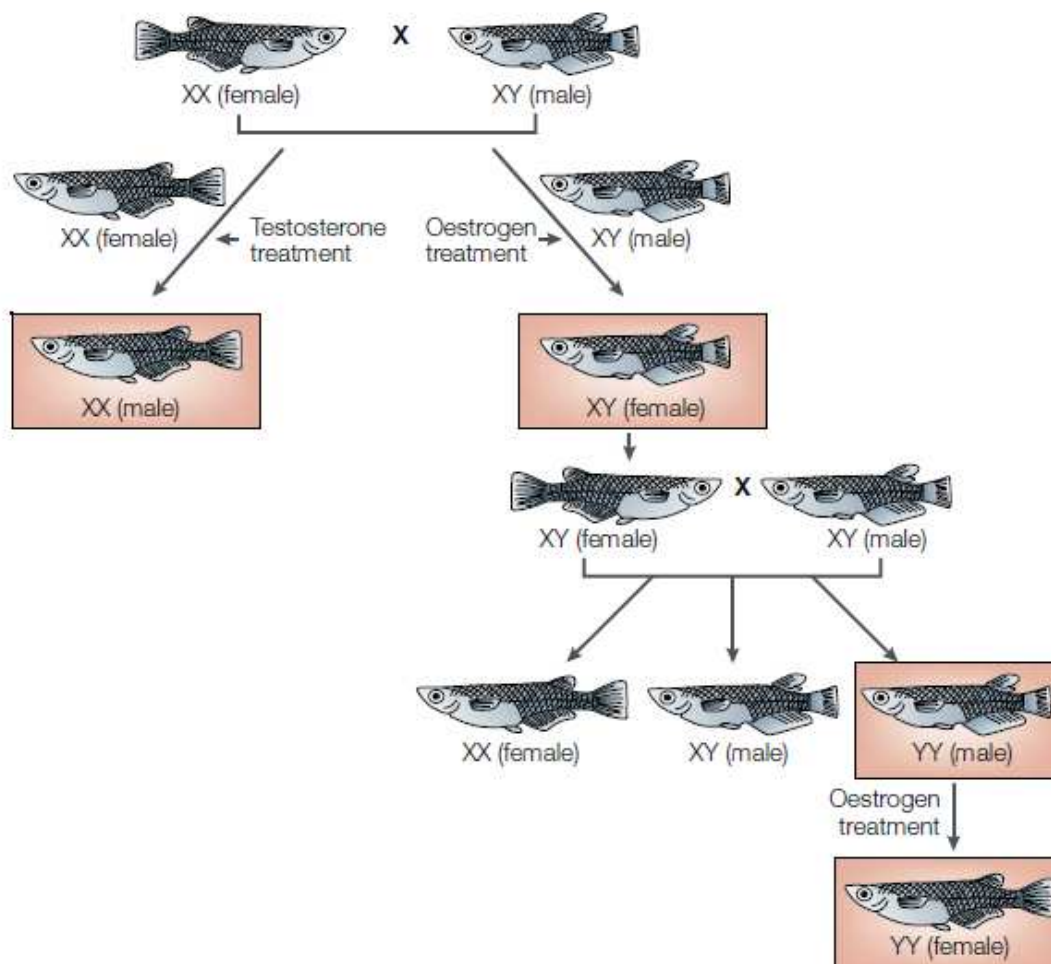


Pro lepší ilustraci pohlavní reverze prováděné steroidními hormony jsem si vybrala pár modelových organismů, u kterých už byla reverze úspěšně provedena a které popíši podrobněji.

### 1.3.1 Medaka japonská (Beloniformes: Adrianichthyidae)

Medaka japonská (*Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel, 1846)) je známý modelový druh, který byl využit hlavně k hledání genu určujícího pohlaví (Nanda et al. 2002). Medaka je malá (3–4 cm) vejcorodá ryba žijící ve sladké vodě. Je to také velmi odolná ryba – dobře snáší široké rozmezí salinity i teploty (10–40 °C). Je snadno chovatelná a vysoce odolná vůči běžným nemocem ryb.

Samci a samice jsou snadno rozlišitelní pomocí výrazně dimorfní hřbetní ploutve. Tření jasně koreluje s denním cyklem, každý den je nakladeno 30-50 jiker, což za celou sezónu dělá až 3 000 jiker. Jikry jsou po nějakou dobu po tření spojeny s tělem samice pomocí vláken, proto jsou reprodukčně aktivní samice snadno identifikovatelné (rev. in Wittbrodt et al. 2002).



**Obrázek 4.** Produkce pohlavně revertované medaky. Převzato z Wittbrodt et al. 2002.

Medaka má XX/XY pohlavní chromosomy. Tyto chromosomy jsou druhým největším párem chromosomů a jsou velmi mladé, co se týče evoluce. Jsou morfologicky nerozlišitelné a crossing-over probíhá po celé délce pohlavních chromosomů (Matsuda et al. 1998).

První úspěšný zvrát pohlaví provedl v roce 1958 Yamamoto. Podávání steroidních hormonů během larvální periody zapříčinilo vznik plodných XX samců a XY samic. Křížením mezi těmito revertovanými XY samicemi a normálními XY samci získal YY samce. Pokud byl těmto YY samčím embryím podáván estrogen, vznikly plodné YY samice. Podobné experimenty odkryly dva důležité fenomény. Zaprvé, pohlaví může být uměle revertováno pouze v době, kdy je gonáda v indiferentním stavu (což je u samice medaky do doby vylíhnutí a u samců ještě dva týdny potom). Zadruhé, jasně dokázaná fertilita XX samců ukazuje na to, že na Y-specifickém regionu Y chromosomu nejsou žádné geny, které jsou nezbytné pro fungování varlat nebo produkci spermií (rev. in Wittbrodt et al. 2002).

### 1.3.2 Tilapie (Perciformes: Cichlidae)

Tilapie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) je dalším modelovým druhem kostnatých ryb, nejvíce je prozkoumaná díky studiím o diferenciaci gonád (Nakamura et al. 1998).

Tilapie je tropický druh, který žije v mělkých vodách. Dokáže žít ve velkém rozmezí teplot, od cca 12 °C do 42 °C, ale preferuje teploty mezi 31 a 36 °C. Pohlavní dospělosti dosahuje ve věku 5–6 měsíců. Rozmnožování začíná, když si samec vytvoří teritorium a vyhloubí si hnízdo. V hnízdě se vytře se samicí, která jikry naklade do hnízda, ale hned v zápětí si je posbírání do tlamy a vzdálí se. Samice inkubuje embrya ve své tlamě, dokud se neabsorbují žloutkový váček. Počet vajíček závisí na velikosti samice. Pokud teplota neklesne pod kritickou hranici, může se samice rozmnožovat neustále. Tilapie může žít déle než 10 let a může dosáhnout hmotnosti až 5 kg (rev. in Gómez-Márquez et al. 2003).

Tilapie má XX/XY pohlavní chromosomy, které jsou pravděpodobně v rané fázi diferenciaci. YY jedinci jsou samci schopní rozmnožování a s XX samicemi tvoří potomstvo samých samců (Carrasco et al. 1999). Genem určujícím pohlaví je nejspíše *tDMRT1* na chromosomu Y, který se zároveň používá jako hlavní marker diferenciaci varlat (Kobayashi et al. 2008).

Revertování pohlaví u tilapie je běžná věc, neboť jde o jeden z hospodářsky nejvýznamnějších druhů a změna pohlaví se využívá hlavně k vyrovnání poměru pohlaví a produkci co nejvíce potomstva. Využívá se roztoku steroidních hormonů o různých koncentracích. K hormonům nejpoužívanějším k maskulinizaci patří zejména

17 $\alpha$ -methyltestosteron, 17 $\alpha$ -methyl Dihydrotestosteron a 17 $\alpha$ -ethynyltestosteron (Wassermann & Afonso 2003). K feminizaci se využívá estrogen, respektive 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (Kobayashi et al. 2003). Kromě steroidních hormonů byla maskulinizace XX jedinců provedena i pomocí nesteroidního inhibitoru aromatázy *Cyp19a* – fadrozolu, tyto jedince šlo následně pomocí estrogenu opět feminizovat. Tyto výsledky naznačují, že endogenní estrogény jsou nezbytné pro diferenciaci vaječnicků (Kobayashi et al. 2003).

Na základě histologických pozorování byly zjištěny tři fáze vývoje gonád (Hines et al. 1999). Během první fáze (0–7 dní po oplození) nemá potěr žádné gonadální struktury. Během druhé fáze (15–29 dní po oplození) jsou vidět indiferentní gonády. Během třetí fáze (36–64 dní po oplození) jsou vidět buď vaječnický, nebo indiferentní gonády – budoucí varlata. Na začátku druhé fáze byly zjištěny vůbec nejnižší hladiny androgenů i estrogenů, následně, těsně před diferenciací vaječnicků, stoupá produkce estrogenu a jeho metabolitů. Během třetí fáze u budoucích samců stoupá produkce testosteronu, zatímco u samic klesá. Tyto výsledky naznačují, že steroidní hormony mohou být příčinou a/nebo následkem diferenciaci gonády (Hines et al. 1999).

### 1.3.3 Živorodka duhová (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)

Živorodka duhová (*Poecilia reticulata* (Peters, 1859)), neboli gupka, je dalším modelovým organismem. Tato drobná živorodá ryba žije ve sladkých a brakických vodách, přirozeně na Trinidadu, Barbadosu, ve Venezuele, Guyaně a severovýchodní Brazílii. Gupky mají jasné pohlavně dimorfní znaky – samci jsou menší než samice a jejich řitní ploutev je přeměněna na pářící orgán, gonopodium. Dospělí samci mají na těle a ploutvích polymorfní skvrny a barevné vzory, zatímco samice nemají na těle žádné výrazné barvy, jsou olivově hnědé a mají průhledné ploutve (Haskins & Haskins 1951).

Pohlaví můžeme u živorodek lehce rozlišit podle samčího pohlavního orgánu – gonopodia, které se vytváří v průběhu dospívání z řitní ploutve. Pomocí něj potom samec samici oplodňuje. Spermie putují do vejcovodu samice, kde se jednotlivě uvolňují. Jelikož vajíčka oplodní jen část spermií, může se samice rozmnožovat později i bez opětovného oplození samečkem, protože může použít uložené spermie (rev. in Dokoupil 1981).

Skoro všechny geny, které jsou zahrnuté do barevné pigmentace a vzorování, jsou pohlavně vázané. Gupky mají 23 párů chromosomů, z toho 22 jsou autosomy a jeden pár pohlavní chromosomy. Samci jsou heterogametičtí (XY) a samice jsou homogametičké (XX). Pohlavní chromosomy jsou ale cytologicky nerozlišitelné. Chromosom Y si zatím zachoval dostatek genů pro to, aby YY samci byli životaschopní a plodní, nicméně rodiče

musí být z různých populací, tzn., že tyto dva chromosomy nesmí být identické (Winge & Ditlevsen 1947). Některé faktory determinující pohlaví jsou autosomální, proto mohou existovat i genetičtí pohlavní revertanti – XX samci a XY samice (Nayudu 1979). Celkem bylo zatím zdokumentováno 26 genů, které jsou na nerekombinující části chromosomu Y, exprese těchto genů zajišťuje právě pohlavně dimorfní znaky u samců (rev. in Lindholm & Breden 2002). Byla také sestavena genetická vazebná mapa (Tripathi et al. 2009).

Morfologické pohlavně dimorfní znaky u samců jsou tedy hlavně velikost, barevnost a umístění skvrn na těle, potom tvar a velikost ploutví a přítomnost gonopodia. Všechny tyto znaky jsou výhodné pro samce, ale pro samice jsou nevýhodné, protože přitahují pozornost predátorů (Endler 1980). Pohlavní atraktivita je u samců dědičná a geneticky korelovaná s ornamentací. Pro samice je výhodné spářit se s atraktivními samci, protože potom mají i atraktivní syny. Tato výhoda je ale v protikladu se silnou negativní genetickou korelací mezi atraktivitou a přežitím samčích i samičích potomků a počtem synů, kteří se dožijí dospělosti (Brooks 2000).

Tak jako u jiných druhů kostnatých ryb může být u gupek změněno pohlaví pomocí pohlavních steroidů (Kavumpurath & Pandian 1992; Pandian & Sheela 1995; Turan et al. 2006). Jednotliví autoři se většinou liší v dávkách hormonů i ve stylu jejich podání – to je možné buď orálně, tedy v potravě, nebo jako roztok nalitý do akvária. V druhém případě je hormonů třeba až 200 až 1 000 krát méně než při podávání hormonů v potravě (Pandian & Kirankumar 2003). Kromě hormonů jde k reverzi na samice použít také inhibitory androgenů nebo aromatázy. Mladí samci krmení inhibitory androgenů měli redukované oranžové zbarvení, inhibovaný vývoj gonopodia a redukovaný počet spermií (Bayley et al. 2002). Aplikace inhibitorů aromatázy na potěr také způsobila reverzi pohlaví na samce, ti navíc měli jasnější barvy (Basavaraja et al. 2012).

Z různých pokusů vyplývají také různé vlivy, které reverze pohlaví měla na další život těchto jedinců. Například Clemens et al. (1966) revertovali pohlaví pomocí testosteronu. Výsledkem bylo cca 90 % samců, z nichž někteří byli schopni dále se rozmnožovat a plodit syny i dcery, tedy to byli původní XY samci. Zbytek samců nebyl schopný mít potomstvo, i když měli dostatek spermií, protože se nedokázali chovat tak, aby mohli oplodnit samice. Z toho by mohlo vyplývat, že část genů pro toto rozmnožovací chování je vázaná na chromosom Y. Naopak revertované samice (XY) jsou schopny mít potomstvo s normálními samci, část potomstva jsou potom YY samci, kteří plodí potomstvo samých synů (Kavumpurath & Pandian 1992).

### 1.3.4 Proximální kontrola pohlavního dimorfismu u živorodky

#### *Poecilia wingei*

Nejběžnějším proximálním mechanismem řídícím pohlavní dimorfismus ve fenotypových znacích je patrně pohlavně-specifická exprese autosomálních genů. U živočichů s GSD je část pohlavně-dimorfních znaků vázána na pohlavní chromozomy. Akumulace pohlavně-antagonistických alel na nově vzniklé pohlavní chromozomy je patrně jedním z nejdůležitějších procesů pro další diferenciaci pohlavních chromozomů. Nově se prokázala možnost evoluce pohlavního dimorfismu díky genomickému imprintingu (Bourc'his & Bestor 2006).

Genomický imprinting je epigenetický proces, který umožňuje odlišnou expresi specifického genu v závislosti na rodiči, od kterého byl zděděn. Byl nalezen u krytosemenných rostlin (Haig & Westoby 1989), savců (Moore & Haig 1991; Morison et al. 2005), ryb (Martin & McGowan 1995), hmyzu (Lloyd 2000) a jiných bezobratlých (Bean et al. 2004). Vyskytuje se zejména na pohlavních chromozomech (např. u vačnatců je u samic imprintingem inaktivován paternální chromozom X (Cooper et al. 1993)).

Pro studium tohoto jevu jsem se rozhodla využít živorodky *Poecilia reticulata* a *P. wingei*, jakožto její nejbližší příbuznou, protože u *P. reticulata* se revertování pohlaví a následné křížení již několikrát povedlo (Kavumpurath & Pandian 1992; Pandian & Sheela 1995; Takahashi 1975; Turan et al. 2006).

#### 1.3.4.1 *Poecilia wingei*

Živorodka *Poecilia wingei* Poeser, Kempkes & Isbrücker, 2005 byla až do roku 2005 považována za geografickou rasu živorodky duhové, se kterou se také kříží (Alexander & Breden 2004). Liší se mimo jiné tím, že její zbarvení není variabilní, to znamená, že samci mají jednotné zbarvení. Na rozdíl od divokých gupek je ale menší a samci jsou mnohem barevnější. Samice jsou nenápadné, jednobarevné. Samci měří kolem 15 mm a samice kolem 20 mm (Poeser et al. 2005). V roce 2009 byla na základě molekulárních dat jednoznačně definována jako samostatný druh, podle molekulárních hodin starý 2,5 – 4,2 milionů let (Schories et al. 2009).

### 1.3.4.2 Hypotézy

Základní otázkou mého výzkumu bylo, jakou roli hraje genomický imprinting a vazba na pohlavní chromosomy v pohlavním dimorfismu. Stanovila jsem si tyto hypotézy:

1. Alespoň část pohlavně dimorfních znaků je vázaná na pohlavně specifickou část pohlavních chromosomů.
2. Alespoň část pohlavně dimorfních znaků je závislá na genomickém imprintingu.

Pro testování těchto hypotéz jsem potřebovala pomocí hormonální reverze připravit samce s pohlavními chromosomy XX a samice XY.

### 1.3.4.3 Predikce

Pro potvrzení první hypotézy by revertovaní samci z první generace měli být odlišní od kontrolních samců, protože XX samců by se nemohly exprimovat znaky, které jsou vázané na pohlavně specifickou část Y chromosomu.

Při následném křížení revertovaného samce (XX) a revertované samice (XY) by měl vzniknout potomek-syn, který od matky zdědil Y chromosom ( $Y^m$ ) a od otce X chromosom ( $X^p$ ). Pro potvrzení druhé hypotézy se by tento potomek ( $X^pY^m$ ) měl fenotypem lišit od normálního samce, protože maternálně zděděný chromosom Y bude jinak naimprintován.

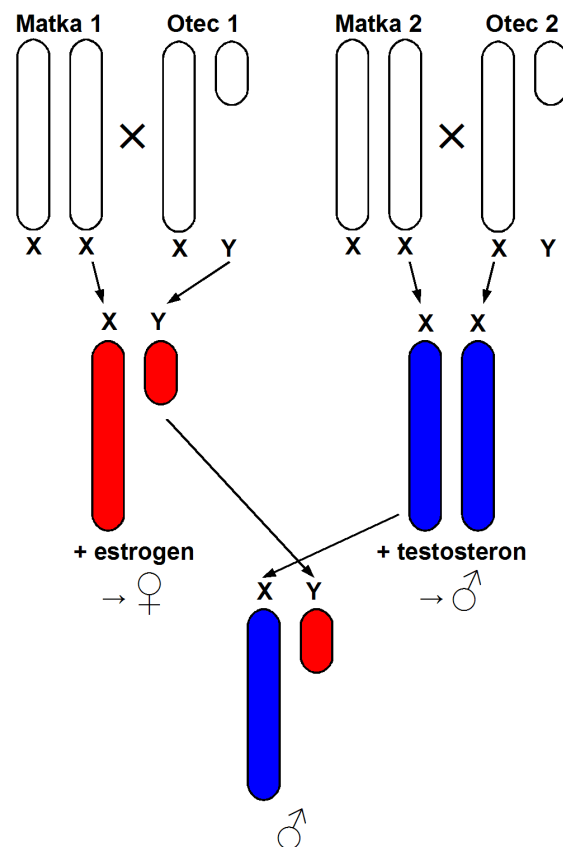
Pokud by revertanti skutečně vznikli (poměr pohlaví by byl signifikantně odlišný od 1:1), znamenalo by to, že i *P. wingei* má gonádu sensitivní k endogenním hormonům. Zásadní otázkou ale je, jestli to u *P. wingei* funguje stejně, jako u *P. reticulata*.

## 2 Materiál a metodika

Pro provedení pokusu jsem použila divokou populaci živorodky *Poecilia wingei*, původně odebranou na lokalitě Puerto La Cruz ve Venezuele (2001) a divokou populaci *P. reticulata* původně odebranou na lokalitě La Playon ve Venezuele (2001), které byly 9 let chované u chovatele p. Tomana v Brně. Tyto živorodky jsem chovala v akváriu Katedry zoologie, v místnosti s konstantní teplotou okolo 28 °C. Tam také probíhal i celý výzkum.

Pomocí hormonálních manipulací jsem se pokusila připravit samčí pohlavní revertanty obou druhů tak, jak se dělaly u *P. reticulata* (Turan et al. 2006). Nově narozený potěr od každé samice byl nechán v akváriu o objemu 5 l. První a patnáctý den po narození byl do akvária přidán roztok  $17\alpha$ -methyltestosteronu (Sigma), kterého bylo použito 2,5 mg na jedno akvárium. Roztok byl připraven přidáním 2,5 mg

17 $\alpha$ -methyltestosteronu do 2 ml 96% ethanolu (Guerrero 1975, podle Kavumpurath & Pandian 1992). Kontrola byla připravena podáváním pouze ethanolu bez testosteronu. Potěr byl krmen jednou denně.



**Obrázek 5.** Schéma křížení, při kterém vznikne samec  $X^pY^m$ . Chromosom X má od otce a chromosom Y od matky.

Po 30 dnech bylo určeno pohlaví na základě viditelných znaků (u samečků přítomnost gonopodia). Ryby byly ponechány v akváriu a dále krmeny. Pohlaví bylo znovu určeno v 2. a 3. měsíci věku ryb.

Samičí pohlavní revertanty jsem se pokusila připravit pomocí hormonů podávaných samicím před porodem v potravě. Každou vybranou samici jsem nechala v samostatném akváriu. 15-20 dní po předešlém porodu jsem ji začala krmit potravou, na kterou byl rozprášen roztok 17 $\beta$ -estradiolu (Sigma), kterého bylo použito 400 mg na 1 kg potravy. Roztok byl připraven z estrogenu a 96% ethanolu v poměru 1 mg na 1 ml ethanolu. Samici jsem touto potravou krmila až do ukončení gravidity.

Odchylku od vyrovnaného poměru pohlaví jsem testovala pomocí  $\chi^2$  testu dobré shody ve statistickém programu R.

### 3 Výsledky

Pokus proběhl ve dvou fázích, v první byly testovány oba druhy živořodek, v druhé fázi byl testován jen druh *P. wingei*.

#### 3.1 1. fáze

V této fázi byly testovány oba druhy živořodek a u obou probíhal pokus o reverzi stejným způsobem.

Měsíc po narození bylo u všech testosteronem ošetřených jedinců vidět nezřetelné gonopodium, ale jiné samčí pohlavní znaky, jako je specifické zbarvení a velikost ploutví, pozorovány nebyly. Při dalším sledování se ale jedinci vyvinuli v samce i samice, takže konečný poměr pohlaví se ustálil na poměru blízkém 1:1. Jedinci byli nadále schopni se spolu rozmnořovat, v potomstvu byli samci i samice.

Oba vzorky *P. reticulata* a jeden *P. wingei* nebyly dostatečně velké, aby mohly být statisticky testovány. Ve všech těchto vzorcích se ale vyskytli samci i samice. Vzorek *P. wingei* ošetřený testosteronem a kontrolní vzorek byly statisticky testovány pomocí  $\chi^2$  testu dobré shody a ani v jednom případě nevyšel signifikantní rozdíl od vyrovnaného poměru. Podrobné výsledky, popsané v tabulce 1, ukazují vyrovnané počty samic a samců v potomstvu testovaných samic.

Při podávání estrogenu gravidním samicím se kromě jedné samice nenarodila žádná mláďata. Jediná samice, která porodila, měla 1 syna a 4 dcery.

**Tabulka 1.** Počty rozmnořujících se samic, aplikované hormony, počty jejich mláďat, úmrtnost mláďat a test odchylky od vyrovnaného poměru pohlaví.

druh	treatment	počet samic	počet mláďat		úmrtnost %	$\chi^2$	p-hodnota
			samci	samice			
<b><i>P. wingei</i></b>	<b>testosteron</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	28,57	0,0344	0,85
<i>P. wingei</i>	kontrola	4	8	5	48	0,3508	0,55
<i>P. wingei</i>	estrogen	1	1	4	0	-	-
<b><i>P. reticulata</i></b>	<b>testosteron</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	88,46	-	-
<i>P. reticulata</i>	kontrola	2	1	1	75	-	-



### 3.2 2. fáze

V druhé fázi byl pokus proveden pouze na *P. wingei* a jen s pomocí testosteronu. Měsíc po narození nebylo u žádných jedinců vidět gonopodium, samčí zbarvení ani rozdíl ve velikosti ploutví. Během dospívání se u poloviny jedinců začalo formovat gonopodium a v dospělosti byl poměr pohlaví kolem 1:1. Statisticky opět nevyšel signifikantní rozdíl od poměru 1:1. Počet samic a mlád'at je uveden v tabulce 2.

**Tabulka 2.** Počet rozmnožujících se samic, aplikované hormony, počty jejich mlád'at, úmrtnost mlád'at a test odchylky od vyrovnaného poměru pohlaví.

druh	treatment	počet samic	počet mlád'at		úmrtnost	$\chi^2$	p-hodnota
			samci	samice	%		
<i>P. wingei</i>	testosteron	7	7	12	39	0,6695	0,41

## 4 Diskuze

Při podávání hormonů v první fázi došlo pouze k přechodnému zvětšení gonopodia, které u samic později vymizelo, ale nebyla pozorována exprese samčí barevnosti ani zvětšení ploutví. V druhé fázi pokusu také nedošlo k reverzi pohlaví, nebyly pozměněny ani pohlavní znaky, jako jsou barvy, tvar a velikost ploutví a gonopodium. Jedinci byli nadále schopní se mezi sebou rozmnožovat.

Za neúspěšnou reverzí pohlaví mohou stát technické problémy. Jednak by mohl být degradovaný testosteron, který jsem použila, toto ale můžeme vyloučit, neboť stejný se používal i v paralelně běžící práci na gekonech, kde byl zcela funkční. Další možností je, že hormony absorboval plast, ze kterého jsou vyrobeny nádržky, nebo vodní mech, který je v nádržkách proto, aby se mlád'ata měla kam schovat a nebyla zbytečně stresována. Tyto důvody nemůžeme vyloučit, přesto ale podávané koncentrace hormonů jsou dostatečně velké a měly by působit i při degradaci hormonu prostředím nádržky.

Co se týče testosteronu, existuje ještě jeden možný důvod, proč na živorodky nepůsobil tak, jak jsme předpokládali. Testosteron je totiž hormon, který se u ryb vyskytuje ve větším množství u samců i u samic. Ryby mají ale i jiné androgeny, jako je 11-ketotestosteron (11-KT) a 11 $\beta$ -hydroxytestosteron, které jsou téměř výlučně nacházeny jen u samců. 11-KT je obecně účinnější než testosteron při simulaci sekundárních sexuálních charakteristik, reprodukčního chování a spermatogeneze (Borg 1994, podle Le Page et al. 2010). To byl také důvod, proč jsme chtěli na druhou část pokusu použít právě 11-KT místo 17 $\alpha$ -methyltestosteronu. Nicméně z legislativních

důvodů nelze tento hormon do ČR objednat, museli jsme tedy opět použít 17 $\alpha$ -methyltestosteron. Předchozí publikace (Pandian & Sheela 1995; Takahashi 1975; Turan et al. 2006) však popisují úspěšnou reverzi pohlaví i 17 $\alpha$ -methyltestosteronem.

Kromě těchto technických důvodů existují i zajímavá teoretická vysvětlení, proč se reverze nezdařila.

#### 4.1 Gonády

Jedním z vysvětlení jsou jevy týkající se gonády. Při původních pokusech mohli autoři sexovat revertovaná mláďata již v nízkém věku a jedinci se poté mohli revertovat zpět. Tomu by odpovídala i první část pokusu, kdy jsme po měsíci od revertování našli u všech jedinců gonopodia, nicméně v době dospělosti byl již poměr pohlaví 1:1. Tento jev není u obratlovců zcela vyloučený, nedávno byla u ptáků popsána buněčně autonomní determinace gonády, tedy proces, při kterém je vývoj gonád a pohlavní fenotyp určen vlastními buňkami a nezáleží na pohlavních hormonech (Zhao et al. 2010).

Podobný jev byl v poslední době také popsán u savců, kde je gen *DMRT1* nezbytný po celou dobu života samce, neboť zajišťuje fungování varlat. Při jeho nepřítomnosti se změně Sertolihovy buňky samců na folikulární buňky, a to i při ztrátě exprese tohoto genu v dospělosti. Vzhledem k tomu, že tento gen patří k evolučně konzervativní kaskádě genů pohlavní diferenciaci, mohl by i u ryb kontrolovat změnu pohlaví v dospělosti (Matson et al. 2011). To by mohlo vysvětlovat i částečnou reverzi pohlaví v první fázi pokusu, kdy byl podán dostatek testosteronu na to, aby se začalo vyvíjet gonopodium u všech jedinců, ale následně se ztratilo, protože mohl být k dalšímu vývoji potřeba *Dmrt1*. Podobným způsobem by navíc mohlo fungovat i určení pohlaví u ptáků, kde je *DMRT1* hlavním kandidátem na gen určující pohlaví. Vyskytuje se na chromosomu Z, nikoliv na W, tedy je přítomen i u samic, ale jen v polovičním množství, neboť u ptáků nefunguje globální kompenzace genové dávky. Redukce exprese *DMRT1* u samčích embryí vede k jejich feminizaci (Smith et al. 2009).

Od té doby, co byla *P. wingei* popsána jako nový druh, neproběhlo moc výzkumů, které by se zabývaly tím, čím vším je odlišná od *P. reticulata*, tedy kromě morfologie, chování a rozšíření (Poeser et al. 2005). Také u ní ještě nikdo nezkoušel revertovat pohlaví. Proto jedním z důvodů neúspěšné reverze může být také to, že by mohla být méně citlivá vůči nízkým hladinám exogenních steroidních hormonů. To by ale nevysvětlovalo, proč se nepodařilo revertovat alespoň *P. reticulata*.

Kupodivu existuje velmi málo studií, které by se zaměřovaly na další vývoj a rozmnožování revertovaných jedinců. Ve většině studií (např. Takahashi 1975; Turan et al. 2006) po určitém čase všechny jedince zabijí a zkoumají gonády histologicky. Už ale nevíme, jestli by byli jedinci schopní se rozmnožovat, kdyby k tomu měli

příležitost. Jedna z mála studií, které se zaměřily i na další rozmnožování, ukazuje, že samci revertovaní ze samic (XX) měli sice dostatek spermií, ale nebyli schopní rozmnožovacího chování, k páření tedy vůbec nedošlo (Clemens et al. 1966). Naopak samice revertované ze samců (XY) nemají s dalším rozmnožováním a fertilitou problém, tímto způsobem lze připravit YY samce, kteří potom mají potomstvo samých synů (Kavumpurath & Pandian 1992). Zajímavé je, že Winge & Ditlevsen (1938, podle Scharf et al. 2011) tvrdí, že na Y chromosomu jsou letální recesivní geny, které v případě YY samců způsobují, že tito nepřežijí. Životoschopní a fertální samci s YY chromosomy mohou vzniknout pouze křížením dvou jedinců z různých populací, kde nejsou Y chromosomy identické. Kavumpurath & Pandian (1992) ale neuvádí, že by křížili více populací.

## **4.2 Pohlavně dimorfní znaky**

Vývin gonopodia se dělí do dvou fází, růstové a diferenciační (Grobstein 1940, podle Kubická 2013). Tyto dvě fáze jsou k sobě antagonistické a spouští se při odlišných koncentracích pohlavních steroidů, které produkují vyvíjející se varlata. Nejdříve při nízkých koncentracích probíhá růstová fáze a potom při vyšších hladinách steroidů fáze diferenciační. Při podání vysokých dávek hormonů již při růstové fázi se tato fáze zastaví a začne fáze diferenciační, a gonopodium, které neprošlo celou růstovou fází, bude zkrácené (Turner 1942).

Z uvedeného vyplývá, že by díky mnou podaným hormonům mohla být zastavena růstová fáze gonopodia. To by ovšem znamenalo, že by se tato fáze měla zastavit u všech jedinců, kterým se vyvíjí gonopodium, tedy i u normálních samců s XY chromosomy. Tito jedinci ale v dospělosti měli normálně vyvinuté gonopodium.

Během pokusu jsem nepozorovala efekt testosteronu na samčí pohlavně dimorfní znaky, jako jsou barevné skvrny a barva a velikost ploutví, i když by měly být kontrolovány androgeny. To například v roce 2009 dokázala v rámci své diplomové práce Barbora Barančíková. Podání testosteronu mláďatům halančků *Nothobranchius furzeri* Jubb, 1971 způsobilo, že jim rychle vyrostly ploutve a měly samčí zbarvení. Velikost ploutví mláďata dokonce natolik omezovala, že nebyla schopna normálně plavat. U tohoto druhu a u *Aphyosemion gardneri* (Boulenger, 1911) byl testosteron aplikován také dospělým samicím, které se následně přebarvily na samce (Barančíková 2009). Přestože se u *P. wingei* samčí zbarvení objevuje při dospívání, zdá se, že není řízeno testosteronem.

### 4.3 Závěr

I přesto, že byla reverze pohlaví pomocí steroidních hormonů na gupkách několikrát úspěšně provedena, netěší se tento druh takové vědecké pozornosti jako medaka japonská. U prvních experimentů se i jasně odkazuje na práce o medace. Vzhledem k tomu, že u ní jsou jedinci velmi snadno revertovatelní a dále se snadno rozmnožují, většina pokusů byla prováděna právě na ní. Když se potom začaly dělat znovu pokusy na gupkách, už byla jen snaha o reverzi a ne o další zkoumání těchto jedinců. Jedním z důvodů, proč reverze u medaky lépe funguje, může být i to, že má méně diferencované pohlavní chromosomy než gupka.

V neposlední řadě také stojí za zamyšlení, jestli by tento výsledek nemohl být běžný, nebo alespoň ne mimořádný. Vezmeme-li v úvahu, že negativní výsledky se většinou nepublikují, mohly by studie, kde se reverze povedla, ukazovat jen částečnou skutečnost, tedy to, že jen některé populace *P. reticulata* jsou sensitivní k endogenním hormonům a po reverzi pohlaví jsou tyto jedinci schopní se dále rozmnožovat.

Podporu předchozímu vysvětlení poskytuje i studie prezentovaná na konferenci behaviorální ekologie ve Švédsku v roce 2012. Gordon et al. (2012) se snažili hormonálně indukovat samčí zbarvení u samic různých populací *P. reticulata* podobným způsobem jako já a zjistili, že u některých populací se samice na samce nepřebarví.

Tento výsledek je pro mne velmi překvapivý, neboť příprava revertantů měla být v mém pokusu jen prvním krokem, u kterého jsme ani nepočítali s variantou, že by se nepovedl. Revertanty jsme chtěli dále křížit a získat tak jedince s Y chromosomem od matky a X chromosomem od otce. U nich jsme chtěli testovat fenotyp a zjistit potenciální vliv genomického imprintingu na pohlavně dimorfní znaky.

Nyní by bylo určitě zajímavé podívat se histologicky na gonády jedinců po podání hormonů a také měřit hladiny hormonů jak v těle těchto jedinců, tak i v akváriích. Jedním z dalších kroků by mělo být také otestování výše navrhnutých technických problémů, abychom je mohli vyloučit.

## Použitá literatura

\* převzaté citace jsou označeny hvězdičkou

- ALEXANDER, H. J., & BREDEN, F. 2004. Sexual isolation and extreme morphological divergence in the Cumaná guppy: a possible case of incipient speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 17: 1238–1254.
- ALVES, A. L., OLIVEIRA, C., NIRCHIO, M., GRANADO, Á., & FORESTI, F. 2006. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica*, 128: 1–9.
- ARANGO, N., LOVELL-BADGE, R., & BEHRINGER, R. 1999. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*, 99: 409–419.
- BARANČÍKOVÁ, B. 2009. *Hormonální kontrola zbarvení halančků (Cyprinodontiformes) a její úloha v evoluci pohlavního dimorfismu*. Univerzita Karlova v Praze.
- BAROILLER, J. F., D’COTTA, H., & SAILLANT, E. 2009. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sexual Development*, 3: 118–135.
- BAROILLER, J. F., & GUIGUEN, Y. 2001. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in gonochoristic fish. *EXS*, 91: 177–201.
- BARRIONUEVO, F., BAGHERI-FAM, S., KLATTIG, J., KIST, R., TAKETO, M. M., ENGLERT, C., & SCHERER, G. 2006. Homozygous inactivation of *Sox9* causes complete XY sex reversal in mice. *Biology of Reproduction*, 74: 195–201.
- BASAVARAJA, N., CHANDRASHEKHARA, B. H., & AHAMAD, R. M. 2012. Production of an all-male population of guppy, *Poecilia reticulata* (Schneider). *Current Science*, 103: 1151–1152.
- BAYLEY, M., JUNGE, M., & BAATRUP, E. 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. *Aquatic Toxicology*, 56: 227–239.
- BEAN, C. J., SCHANER, C. E., & KELLY, W. G. 2004. Meiotic pairing and imprinted X chromatin assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics*, 36: 100–105.
- BELLAFRONTE, E., SCHEMBERGER, M. O., ARTONI, R. F., FILHO, O. M., & VICARI, M. R. 2012. Sex chromosome system ZZ/ZW in *Apareiodon hasemani* Eigenmann, 1916 (Characiformes, Parodontidae) and a derived chromosomal region. *Genetics and Molecular Biology*, 35: 770–776.
- BERGERO, R., & CHARLESWORTH, D. 2009. The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends in Ecology & Evolution*, 24: 94–102.

- \* BORG, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 109: 219–245.
- BORN, G. G., & BERTOLLO, L. A. C. 2000. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Research*, 8: 111–8.
- BOURC'HIS, D., & BESTOR, T. H. 2006. Origins of extreme sexual dimorphism in genomic imprinting. *Cytogenetic and Genome Research*, 113: 36–40.
- BRITT, K., SAUNDERS, P., MCPHERSON, S., MISSO, M., SIMPSON, E., & FINDLAY, J. 2004. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biology of Reproduction*, 71: 1712–1723.
- BROOKS, R. 2000. Negative genetic correlation between male sexual attractiveness and survival. *Nature*, 406: 67–70.
- CAPEL, B., SWAIN, A., NICOLIS, S., HACKER, A., WALTER, M., KOOPMAN, P., GOODFELLOW, P., & LOVELL-BADGE, R. 1993. Circular transcripts of the testis-determining gene *Sry* in adult mouse testis. *Cell*, 73: 1019–1030.
- CARRASCO, L. A. P., PENMAN, D. J., & BROMAGE, N. 1999. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. *Aquaculture*, 173: 207–218.
- CLEMENS, H., MCDERMITT, C., & INSLEE, T. 1966. The effects of feeding methyl testosterone to guppies for sixty days after birth. *Copeia*, 1966: 280–284.
- CONOVER, D. O., & KYNARD, B. E. 1981. Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in fish. *Science*, 213: 577–579.
- COOPER, D. W., JOHNSTON, P. G., WATSON, J. M., & GRAVES, J. A. M. 1993. X-inactivation in marsupials and monotremes. *Developmental Biology*, 4: 117–128.
- COUSE, J. F. 1999. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews*, 20: 358–417.
- CRAIG, J., FOOTE, C., & WOOD, C. 1996. Evidence for temperature-dependent sex determination in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 141–147.
- DAVEY, A. J. H., & JELLYMAN, D. J. 2005. Sex determination in freshwater eels and management options for manipulation of sex. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15: 37–52.
- DEVLIN, R., & NAGAHAMA, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191–364.

- DOKOUPIL, N. 1981. *Živorodky. Technika chovu, biologie druhů, standardy.* (p. 259). Praha: Státní zemědělské nakladatelství.
- DUFFY, T., PICHA, M., WON, E., BORSKI, R., MCELROY, A., & CONOVER, D. 2010. Ontogenesis of gonadal aromatase gene expression in atlantic silverside (*Menidia menidia*) populations with genetic and temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 313A: 421–431.
- ELLEGREN, H. 2011. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nature Reviews. Genetics*, 12: 157–166.
- ELLIOTT, J., & MARISCAL, R. 2001. Coexistence of nine anemonefish species: differential host and habitat utilization, size and recruitment. *Marine Biology*, 138: 23–36.
- ENDLER, J. A. 1980. Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution*, 34: 76–91.
- ESSENBERG, J. M. 1926. Complete sex-reversal in the viviparous teleost *Xiphophorus helleri*. *Biological Bulletin*, 51: 95–111.
- FRANCIS, R. C. 1992. Sexual lability in teleosts: Developmental factors. *The Quarterly Review of Biology*, 67: 1–18.
- GILBERT, S. F. 2006. *Developmental biology* (8th ed., p. 817). Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.
- GODWIN, J. R., & THOMAS, P. 1993. Sex change and steroid profiles in the protandrous anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). *General and Comparative Endocrinology*, 144–157.
- GÓMEZ-MÁRQUEZ, J. L., PEÑA-MENDOZA, B., SALGADO-UGARTE, I. H., & GUZMÁN-ARROYO, M. 2003. Reproductive aspects of *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) at Coatetelco lake, Morelos, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 51: 221–228.
- GOODFELLOW, P., & DARLING, S. 1988. Genetics of sex determination in man and mouse. *Development*, 102: 251–258.
- GOODFELLOW, P. N., & LOVELL-BADGE, R. 1993. *Sry* and sex determination in mammals. *Annual Review of Genetics*, 27: 71–92.
- GORDON, S., LOPEZ SEPULCRE, A., ROUGHTON, A., & REZNICK, D. 2012. Evolution of male coloration in the wild: the role of sex linkage and selection. *14th Congress of the International Society for Behavioral Ecology*. Lund.
- GRAVES, J. A. M. 2010. Review: Sex chromosome evolution and the expression of sex-specific genes in the placenta. *Placenta*, 31: 27–32.

- \* GROBSTEIN, C. 1940. *Endocrine and development studies of gonopod differentiation in certain poeciliid fishes, I. The structure and development of the gonopod in Platypoecilus maculatus.* (p. 21). Berkeley: University of California Press.
- \* GUERRERO, R. D. 1975. Use of androgens for the production of all-male *Tilapia aurea* (Steindachner). *Transactions of the American Fisheries Society*, 104: 342–348.
- GUIGUEN, Y., FOSTIER, A., PIFERRER, F., & CHANG, C. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 352–366.
- HABERT, R., LEJEUNE, H., & SAEZ, J. 2001. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179: 47–74.
- HAIG, D., & WESTOBY, M. 1989. Parent-specific gene expression and the triploid endosperm. *The American Naturalist*, 134: 147.
- HARVEY, S., BOONPHAKDEE, C., CAMPOS-RAMOS, R., EZAZ, M., GRIFFIN, D., BROMAGE, N., & PENMAN, D. 2003. Analysis of repetitive DNA sequences in the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*. *Cytogenetic and Genome Research*, 101: 314–319.
- HASKINS, C. P., & HASKINS, E. F. 1951. The inheritance of certain color patterns in wild populations of *Lebistes reticulatus* in Trinidad. *Evolution*, 5: 216–225.
- HATTORI, A. 2000. Social and mating systems of the protandrous anemonefish *Amphiprion perideraion* under the influence of a larger congener. *Austral Ecology*, 25: 187–192.
- HATTORI, R., MURAI, Y., OURA, M., MASUDA, S., MAJHI, S. K., SAKAMOTO, T., FERNANDINO, J. I., SOMOZA, G. M., YOKOTA, M., & STRÜSSMANN, C. A. 2012. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 2955–2959.
- HEIKKILÄ, M., PELTOKETO, H., LEPPÄLUOTO, J., ILVES, M., VUOLTEENAHO, O., & VAINIO, S. 2002. Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology*, 143: 4358–4365.
- HERPIN, A., & SCHARTL, M. 2011. *Dmrt1* genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS Journal*, 278: 1010–1019.
- HINES, G. A., BOOTS, L. R., WIBBELS, T., & WATTS, S. A. 1999. Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cyprinoidei). *General and Comparative Endocrinology*, 114: 235–248.



- HOIRIGAN, T., NAKAMURA, M., NAGAHAMA, Y., YAMAUCHI, K., & GRAU, E. 1991. Histology, ultrastructure, and in vitro steroidogenesis of the testes of two male phenotypes of the protogynous fish, *Thalassoma duperrey* (Labridae). *General and Comparative Endocrinology*, 83: 193–217.
- CHABOISSIER, M., KOBAYASHI, A., VIDAL, V. I. P., LÜTZKENDORF, S., VAN DE KANT, H. J. G., WEGNER, M., DE ROOIJ, D. G., BEHRINGEN, R. R., & SCHEDL, A. 2004. Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse. *Development*, 131: 1891–1901.
- IYER, A., & MCCABE, E. 2004. Molecular mechanisms of DAX1 action. *Molecular Genetics and Metabolism*, 83: 60–73.
- JORDAN, B. K., MOHAMMED, M., CHING, S. T., DÉLOT, E., CHEN, X. N., DEWING, P., SWAIN, A., RAO, P. N., ELEJALDE, B. R., & VILAIN, E. 2001. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *American Journal of Human Genetics*, 68: 1102–1109.
- JOSSO, N. 1986. Anti-Müllerian hormone. *Clinical Endocrinology*, 25: 331–345.
- JOSSO, N., RACINE, C., DI CLEMENTE, N., REY, R., & XAVIER, F. 1998. The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145: 3–7.
- JOST, A. 1953. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Progress in Hormone Research. Proceedings of the Laurentian Hormone Conference* (pp. 379–418).
- KAMIYA, T., KAI, W., TASUMI, S., OKA, A., MATSUNAGA, T., MIZUNO, N., FUJITA, M., SUETAKE, H., SUZUKI, S., HOSOYA, S., TOHARI, S., BRENNER, S., MIYADAI, T., VENKATESH, B., SUZUKI, Y., & KIKUCHI, K. 2012. A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genetics*, 8: e1002798.
- KAVUMPURATH, S., & PANDIAN, T. J. 1992. Production of YY male in the guppy *Poecilia reticulata* by endocrine sex reversal and progeny testing. *Asian Fisheries Science*, 5: 265–276.
- KIKUCHI, K., & HAMAGUCHI, S. 2013. Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics*, 242: 339–353.
- KOBAYASHI, T., KAJIURA-KOBAYASHI, H., GUAN, G., & NAGAHAMA, Y. 2008. Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Developmental Dynamics*, 237: 297–306.
- KOBAYASHI, T., KAJIURA-KOBAYASHI, H., & NAGAHAMA, Y. 2003. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. *Cytogenetic and Genome Research*, 101: 289–294.

- KOBAYASHI, Y., HORIGUCHI, R., MIURA, S., & NAKAMURA, M. 2010. Sex- and tissue-specific expression of P450 aromatase (*cyp19a1a*) in the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 155: 237–244.
- KOBAYASHI, Y., KOBAYASHI, T., NAKAMURA, M., SUNOBE, T., MORREY, C. E., SUZUKI, N., & NAGAHAMA, Y. 2004. Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*. *Zoological Science*, 21: 417–425.
- KOBAYASHI, Y., NAGAHAMA, Y., & NAKAMURA, M. 2013. Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. *Sexual Development*, 7: 115–125.
- KOBAYASHI, Y., NAKAMURA, M., SUNOBE, T., USAMI, T., KOBAYASHI, T., MANABE, H., PAUL-PRASANTH, B., SUZUKI, N., & NAGAHAMA, Y. 2009. Sex change in the Gobiid fish is mediated through rapid switching of gonadotropin receptors from ovarian to testicular portion or vice versa. *Endocrinology*, 150: 1503–1511.
- KOBAYASHI, Y., SUNOBE, T., KOBAYASHI, T., NAGAHAMA, Y., & NAKAMURA, M. 2005. Gonadal structure of the serial-sex changing gobiid fish *Trimma okinawae*. *Development, Growth and Differentiation*, 47: 7–13.
- KOOPMAN, P., GUBBAY, J., VIVIAN, N., GOODFELLOW, P. N., & LOVELL-BADGE, R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature*, 351: 117–121.
- KRUEGER, W. H., & OLIVIERA, K. 1999. Evidence for environmental sex determination in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Environmental Biology of Fishes*, 55: 381–389.
- KUBICKÁ, L. 2013. *Modifikace ploutví ryb a paryb v pářící orgány*. Univerzita Karlova v Praze.
- LE PAGE, Y., DIOTEL, N., VAILLANT, C., PELLEGRINI, E., ANGLADE, I., MÉROT, Y., & KAH, O. 2010. Aromatase, brain sexualization and plasticity: the fish paradigm. *European Journal of Neuroscience*, 32: 2105–2115.
- LI, J., PHILLIPS, R., HARWOOD, A., KOOP, B. F., & DAVIDSON, W. S. 2011. Identification of the sex chromosomes of brown trout (*Salmo trutta*) and their comparison with the corresponding chromosomes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetic and Genome Research*, 133: 25–33.
- LINDHOLM, A., & BREDEN, F. 2002. Sex chromosomes and sexual selection in Poeciliid fishes. *The American Naturalist*, 160: 214–224.
- LLOYD, V. 2000. Parental imprinting in *Drosophila*. *Genetica*, 109: 35–44.
- MANABE, H., ISHIMURA, M., SHINOMIYA, A., & SUNOBE, T. 2007. Field evidence for bi-directional sex change in the polygynous gobiid fish *Trimma okinawae*. *Journal of Fish Biology*, 70: 600–609.

- MANABE, H., MATSUOKA, M., GOTO, K., DEWA, S., SHINOMIYA, A., SAKURAI, M., & SUNOBE, T. 2008. Bi-directional sex change in the gobiid fish *Trimma* sp.: does size-advantage exist? *Behaviour*, 145: 99–113.
- MANK, J. E., PROMISLOW, D. E. L., & AVISE, J. C. 2006. Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 87: 83–93.
- MARTIN, C. C., & MCGOWAN, R. 1995. Parent-of-origin specific effects on the methylation of a transgene in the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Genetics*, 17: 233–239.
- MASUYAMA, H., YAMADA, M., KAMEI, Y., FUJIWARA-ISHIKAWA, T., TODO, T., NAGAHAMA, Y., & MATSUDA, M. 2012. *Dmrt1* mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by *Dmy* in the medaka. *Chromosome Research*, 20: 163–176.
- MATSON, C., MURPHY, M., SARVER, A., GRISWOLD, M., BARDWELL, V., & ZARKOWER, D. 2011. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, 476: 101–105.
- MATSUDA, M., MATSUDA, C., HAMAGUCHI, S., & SAKAIZUMI, M. 1998. Identification of the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*, by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, 82: 257–262.
- MATSUDA, M., NAGAHAMA, Y., SHINOMIYA, A., SATO, T., MATSUDA, C., KOBAYASHI, T., MORREY, C. E., SHIBATA, N., ASAKAWA, S., SHIMIZU, N., HORI, H., HAMAGUCHI, S., & SAKAIZUMI, M. 2002. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417: 559–563.
- MCLAREN, A., & SOUTHEE, D. 1997. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Developmental Biology*, 187: 107–113.
- MONTAZER-TORBATI, F., KOCER, A., AUGUSTE, A., RENAULT, L., CHARPIGNY, G., PAILHOUX, E., & PANNETIER, M. 2010. A study of goat SRY protein expression suggests putative new roles for this gene in the developing testis of a species with long-lasting *SRY* expression. *Developmental Dynamics*, 239: 3324–3335.
- MOORE, T., & HAIG, D. 1991. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends in Genetics*, 7: 45–49.
- MORISON, I. M., RAMSAY, J. P., & SPENCER, H. G. 2005. A census of mammalian imprinting. *Trends in Genetics*, 21: 457–465.
- MOROHASHI, K., BABA, T., & TANAKA, M. 2013. Steroid hormones and the development of reproductive organs. *Sexual Development*, 7: 61–79.

- MYOSHO, T., OTAKE, H., MASUYAMA, H., MATSUDA, M., KUROKI, Y., FUJIYAMA, A., NARUSE, K., HAMAGUCHI, S., & SAKAIZUMI, M. 2012. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 191: 163–170.
- NAGAHAMA, Y. 2005. Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31: 105–109.
- NAKAMURA, M. 2010. The mechanism of sex determination in vertebrates – are sex steroids the key-factor? *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 313A: 381–398.
- NAKAMURA, M., HOURIGAN, T., YAMAUCHI, K., NAGAHAMA, Y., & GRAU, E. 1989. Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse *Thalassoma duperrey*. *Environmental Biology of Fishes*, 24: 117–136.
- NAKAMURA, M., KOBAYASHI, T., CHANG, X.-T., & NAGAHAMA, Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 281: 362–372.
- NAKAMURA, M., MARIKO, T., & NAGAHAMA, Y. 1994. Ultrastructure and in vitro steroidogenesis of the gonads in the protandrous anemonefish *Amphiprion frenatus*. *Japanese Journal of Ichthyology*, 41: 47–56.
- NANDA, I., KONDO, M., HORNUNG, U., ASAKAWA, S., WINKLER, C., SHIMIZU, A., SHAN, Z., HAAF, T., SHIMIZU, N., SHIMA, A., SCHMID, M., & SCHARTL, M. 2002. A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 99: 11778–11783.
- NANDA, I., SCHARTL, M., FEICHTINGER, W., EPPLER, J. T., & SCHMID, M. 1992. Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. *Chromosoma*, 101: 301–310.
- NAYUDU, P. 1979. Genetic studies of melanic color patterns and atypical sex determination in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Copeia*, 1979: 225–231.
- OLDFIELD, R. G. 2011. Gonad development in Midas cichlids and the evolution of sex change in fishes. *Evolution & Development*, 13: 352–360.
- OSPINA-ALVAREZ, N., & PIFERRER, F. 2008. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PloS ONE*, 3: e2837.
- OTA, K., KOBAYASHI, T., UENO, K., & GOJOBORI, T. 2000. Evolution of heteromorphic sex chromosomes in the order Aulopiformes. *Gene*, 259: 25–30.
- PANDIAN, T. J. 2012. *Genetic sex differentiation in fish*. (1st ed., p. 214). Boca Raton: CRC Press.

- PANDIAN, T. J., & KIRANKUMAR, S. 2003. Recent advances in hormonal induction of sex-reversal in fish. *Journal of Applied Aquaculture*, 13: 205–230.
- PANDIAN, T. J., & KOTEESWARAN, R. 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 384: 167–243.
- PANDIAN, T. J., & KOTEESWARAN, R. 1999. Lability of sex differentiation in fish. *Current Science*, 76: 580–583.
- PANDIAN, T. J., & SHEELA, S. G. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138: 1–22.
- PANDIAN, T. J., SHEELA, S. G., & KAVUMPURATH, S. 1994. Endocrine sex reversal in fishes: Masculinization evokes greater stress and mortality. *Current Science*, 66: 240–243.
- PANDIAN, T. J., VENUGOPAL, T., & KOTEESWARAN, R. 1999. Problems and prospects of hormone, chromosome and gene manipulations in fish. *Current Science*, 76: 369–386.
- PASK, A., CALATAYUD, N., SHAW, G., WOOD, W. M., & RENFREE, M. B. 2010. Oestrogen blocks the nuclear entry of SOX9 in the developing gonad of a marsupial mammal. *BMC Biology*, 8: 113.
- PATIÑO, R., DAVIS, K. B., SCHOORE, J. E., UGUZ, C., STRÜSSMANN, C. A., PARKER, N. C., SIMCO, B. A., & GOUDIE, C. A. 1996. Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. *Journal of Experimental Zoology*, 276: 209–218.
- POESER, F., KEMPKE, M., & ISBRÜCKER, I. 2005. Description of *Poecilia (Acanthophaelus) wingei* n. sp. from the Paría Peninsula, Venezuela, including notes on *Acanthophaelus* Eigenmann, 1907 and other subgenera of *Poecilia* Bloch and Schneider, 1801 (Teleostei, Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Contributions to Zoology*, 74: 97–115.
- RAYMOND, C., MURPHY, M., O’SULLIVAN, G., BARDWELL, V. J., & ZARKOWER, D. 2000. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes & Development*, 14: 2587–2595.
- RUBIN, D. A. 1985. Effect of pH on sex ratio in Cichlids and a Poeciliid (Teleostei). *Copeia*, 1: 233–235.
- RUIZ-CARUS, R. 2002. Chromosome analysis of the sexual phases of the protogynous hermaphrodites *Epinephelus guttatus* and *Thalassoma bifasciatum* (Serranidae and Labridae; Teleostei). *Caribbean Journal of Science*, 38: 44–51.
- SADOVY DE MITCHESON, Y., & LIU, M. 2008. Functional hermaphroditism in teleosts. *Fish and Fisheries*, 9: 1–43.

- SEKIDO, R., & LOVELL-BADGE, R. 2013. Genetic control of testis development. *Sexual Development*, 7: 21–32.
- SFAKIANAKIS, D., LERIS, I., MYLONAS, C. C., & KENTOURI, M. 2012. Temperature during early life determines sex in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 17: 68–73.
- SHANG, E. H. H., YU, R. M. K., & WU, R. S. S. 2006. Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology*, 40: 3118–3122.
- SCHARTL, M. 2004. A comparative view on sex determination in medaka. *Mechanisms of Development*, 121: 639–645.
- SCHARTL, M., GALIANA-ARNOUX, D., SCHULTHEIS, C., BÖHNE, A., & VOLFF, J.-N. 2011. A primer of sex determination. *Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes* (pp. 264–275). Chicago: The University of Chicago Press.
- SCHMAHL, J., KIM, Y., COLVIN, J. S., ORNITZ, D. M., & CAPEL, B. 2004. *Fgf9* induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development*, 131: 3627–3636.
- SCHORIES, S., MEYER, M. K., & SCHARTL, M. 2009. Description of *Poecilia (Acanthocephalus) obscura* n. sp., (Teleostei: Poeciliidae), a new guppy species from western Trinidad, with remarks on *P. wingei* and the status of the “Enderl’s guppy.” *Zootaxa*, 2266: 35–50.
- SMITH, C. A., & SINCLAIR, A. H. 2001. Sex determination in the chicken embryo. *Journal of Experimental Zoology*, 290: 691–699.
- SMITH, C., ROESZLER, K., OHNESORG, T., CUMMINS, D. M., FARLIE, P. G., DORAN, T. J., & SINCLAIR, A. H. 2009. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461: 267–271.
- TAKAHASHI, H. 1975. Process of functional sex reversal of the gonad in the female guppy, *Poecilia reticulata*, treated with androgen before birth. *Development, Growth and Differentiation*, 2: 167–175.
- TEVOSIAN, S. G. 2013. Genetic control of ovarian development. *Sexual Development*, 7: 33–45.
- TODA, K., TAKEDA, K., OKADA, T., SAIBARA, T., KANAME, T., YAMAMURA, K., ONISHI, S., & SHIZUTA, Y. 2001. Targeted disruption of the aromatase P450 gene (*Cyp19*) in mice and their ovarian and uterine responses to 17 $\beta$ -oestradiol. *Journal of Endocrinology*, 170: 99–111.

- TRIPATHI, N., HOFFMANN, M., WILLING, E.-M., LANZ, C., WEIGEL, D., & DREYER, C. 2009. Genetic linkage map of the guppy, *Poecilia reticulata*, and quantitative trait loci analysis of male size and colour variation. *Proceedings of The Royal Society. Biological Sciences*, 276: 2195–2208.
- TURAN, F., CEK, S., & ATIK, E. 2006. Production of monosex male guppy, *Poecilia reticulata*, by 17alpha-methyltestosterone. *Aquaculture Research*, 37: 200–203.
- TURNER, C. L. 1942. A quantitative study of the effects of different concentrations of ethynyl testosterone and methyl testosterone in the production of gonopodia in females of *Gambusia affinis*. *Physiological Zoology*, 15: 263–280.
- UHLENHAUT, N., JAKOB, S., ANLAG, K., EISENBERGER, T., SEKIDO, R., KRESS, J., TREIER, A.-C., KLUGMAN, C., KLASSEN, C., HOLTER, N. I., RIETHMACHER, D., SCHÜTZ, G., COONEY, A. J., LOVELL-BADGE, R., & TREIER, M. 2009. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139: 1130–1142.
- VAINIO, S., HEIKKILÄ, M., KISPERT, A., CHIN, N., & MCMAHON, A. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397: 405–409.
- VALENZUELA, N., ADAMS, D. C., & JANZEN, F. J. 2003. Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? *The American Naturalist*, 161: 676–683.
- VENERE, P. C., FERREIRA, I. A., MARTINS, C., & GALETTI JR., P. M. 2004. A novel ZZ/ZW sex chromosome system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). *Genetica*, 121: 57–80.
- VEYRUNES, F., WATERS, P., MIETHKE, P., RENS, W., MCMILLAN, D., ALSOP, A., GRÜTZNER, F., DEAKIN, J., WHITTINGTON, C., SCHATZKAMER, K., KREMITZKI, C., GRAVES, T., FERGUSON-SMITH, M., WARREN, W., & GRAVES, J. 2008. Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Research*, 18: 965–973.
- VOLFF, J. N., NANDA, I., SCHMID, M., & SCHARTL, M. 2007. Governing sex determination in fish: regulatory puteshes and ephemeral dictators. *Sexual Development*, 1: 85–99.
- WANG, D. S., KOBAYASHI, T., ZHOU, L.-Y., PAUL-PRASANTH, B., IJIRI, S., SAKAI, F., OKUBO, K., MOROHASHI, K., & NAGAHAMA, Y. 2007. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Molecular Endocrinology*, 21: 712–725.
- WANG, D., ZHOU, L., KOBAYASHI, T., MATSUDA, M., SHIBATA, Y., SAKAI, F., & NAGAHAMA, Y. 2010. *Doublesex*- and *Mab-3*-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. *Endocrinology*, 151: 1331–1340.

- WASSERMANN, G. J., & AFONSO, L. O. B. 2003. Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. *Aquaculture Research*, 34: 65–71.
- WILHELM, D., WASHBURN, L., TRUONG, V., FELLOUS, M., EICHER, E. M., & KOOPMAN, P. 2009. Antagonism of the testis- and ovary- determining pathways during ovotestis development in mice. *Mechanisms of Development*, 126: 324–336.
- \* WINGE, O., & DITLEVSEN, E. 1938. A lethal gene in the Y chromosome of *Lebistes*. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg*, 22: 203–211.
- WINGE, Ö., & DITLEVSEN, E. 1947. Colour inheritance and sex determination in *Lebistes*. *Heredity*, 1: 65–83.
- WITTBRODT, J., SHIMA, A., & SCHARTL, M. 2002. Medaka – a model organism from the far East. *Nature Reviews. Genetics*, 3: 53–64.
- YAMAMOTO, T. O. 1959. A further study on induction of functional sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*) and progenies of sex reversals. *Genetics*, 44: 739–757.
- YANO, A., GUYOMARD, R., NICOL, B., JOUANNO, E., QUILLET, E., KLOPP, C., CABAU, C., BOUCHEZ, O., FOSTIER, A., & GUIGUEN, Y. 2012. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22: 1423–1428.
- YANO, A., NICOL, B., JOUANNO, E., QUILLET, E., FOSTIER, A., GUYOMARD, R., & GUIGUEN, Y. 2013. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications*, 6: 486–496.
- ZHAO, D., MCBRIDE, D., NANDI, S., MCQUEEN, H. A., MCGREW, M. J., HOCKING, P. M., LEWIS, P. D., SANG, H. M., & CLINTON, M. 2010. Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. *Nature*, 464: 237–243.