

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra ekologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Bc. Lucia Tóthová

**Úloha steroidních hormonů při kontrole pohlavně
dimorfních znaků u gekončků (Eublepharidae)**

Role of steroid hormones in control of sexually dimorphic traits
in eyelid geckos (Eublepharidae)

Diplomová práce

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

Praha

2013

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať v prvom rade môjmu školiteľovi doc. Mgr. Lukášovi Kratochvílovi, Ph.D. za cenné rady a vedenie mojej práce na pokusoch. Ďalej Mgr. Lukášovi Kubičkovi, Ph.D. a Mgr. Janovi Červenkovi za pomoc pri starostlivosti o pokusné zvieratá a naučenie mnohých postupov a metodík. Na záver ďakujem mojej rodine, môjmu priateľovi a blízkym, ktorí ma po celú dobu štúdia podporovali.

Prehlasujem, že som túto prácu vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Bc. Lucia Tóthová

V Prahe, dňa 15. 8. 2013

ABSTRAKT

Dôležitosť roly pohlavných hormónov pri vzniku, vývine a regulácii pohlavne dimorfného chovania nie je potrebné zdôrazňovať. Ich konkrétne aktivačné a organizačné účinky a vzájomné interakcie v pohlavnej diferenciacii a determinácii však stále nie sú úplne známe. Cieľom našej práce bolo preskúmať efekt hormonálnej manipulácie u jašterov z čeľade gekončíkovitých (*Eublepharidae*) a objasniť úlohu steroidných hormónov pri vzniku a formovaní pohlavných rozdielov.

V prvej časti sme sa pokúsili o hormonálne indukovanú pohlavnú reverziu u gekončíka mexického (*Coleonyx elegans*), ktorý má genotypicky určené pohlavie (GSD) s pohlavnými chromozómami typu X_1X_2Y . U revertovaných jedincov sme chceli skúmať vplyv steroidných hormónov podaných v rannej embryogenéze na pohlavne dimorfné znaky a v prípade ich úplnej reverzie a fertility, ďalej pátrať po géne určujúcom pohlavie u tohto druhu.

V druhej časti našej práce sme skúmali maskulinizačné účinky testosterónu u samíc gekončíka nočného (*Eublepharis macularius*), ktorý má naopak teplotné určenie pohlavia (TSD) a zároveň je blízko príbuzný vyššie spomenutému druhu *Coleonyx elegans*. U pokusných samíc sme pomocou podkožných implantátov dlhodobo zvýšili hladiny testosterónu a potvrdili sme, že sa u takto manipulovaných jedincov objavia samčie gonády a prekloakálne póry. Zaujímalo nás ďalej, ako zvýšené hladiny testosterónu ovplyvňujú chovanie samíc: či v interakcii so samicami a samcami bude tiež maskulinizované. Zistili sme, že dlhodobo mierne zvýšené hladiny testosterónu indukujú okrem vzniku typicky samčích pohlavných orgánov aj vznik samčieho prekopulačného chovania. Ku kopulácii napriek tomu však nedochádza. Zaujímavé je tiež zistenie, že testosterón zvýšil atraktivitu takto manipulovaných samíc pre samcov, ale samice neboli receptívne.

Z našich výsledkov môžeme vyvodit', že rola steroidných hormónov je pri vzniku a vývine pohlavne dimorfných znakov kľúčová, avšak na výslednom efekte sa podieľa celý hormonálny komplex, genetické a aj mnohé ďalšie faktory.

Kľúčové slová: steroidné hormóny, *Eublepharidae*, hormonálna manipulácia, TSD, GSD, pohlavný dimorfizmus, reverzia pohlavia, maskulinizácia

ABSTRACT

The importance of sex hormones in formation, development and regulation of sexually dimorphic behavior does not need to be stressed. However, their actual organizational and activational effects and interactions in sexual differentiation and determination are not fully understood yet. The aim of our study was to explore the effects of hormonal manipulation in eyelid-geckos (family Eublepharidae) and enlighten the role of steroid hormones in formation of sexual differences.

In the first part of our work we tried to reverse sex of Yucatán banded gecko (*Coleonyx elegans*) by hormonal manipulation in the early embryogenesis. This species has genotypic sex determination with chromosome set X_1X_2Y . In reverted individuals we aimed to examine the effects of steroid hormones on sexually dimorphic traits and in case of full sexual reversion and fertility of progeny, we would search for the sex-determining gene.

In the second part, we studied masculinization effects of testosterone in females of leopard gecko (*Eublepharis macularius*). In contrast with the *Coleonyx elegans* mentioned above, this species has temperature dependent sex determination, even though these two species are closely related. Experimental females were implanted with testosterone implants and therefore their testosterone levels were increased in long-term. We confirmed that this hormonal manipulation induces formation of male gonads and precloacal pores in females. We studied then the masculinization of female behavior in interactions with both males and females. Testosterone implanted females developed typically male sexual morphological traits and behavior. However, the copulation never occurred. Interestingly, the testosterone increased attractiveness, but the manipulated females were not receptive.

Our results imply, that steroid hormones have key role in formation and development of sexually dimorphic traits, however, the final phenotype is the result of various interactions of the whole hormonal complex and many other factors.

Key words: steroid hormones, Eublepharidae, hormonal manipulation, TSD, GSD, sexual dimorphism, sex-reversal, masculinization

Obsah

ABSTRAKTY	1
1. Mechanizmy určujúce pohlavie a pohlavný dimorfizmus	4
1.1. Vznik sexuality a pohlavného dimorfizmu	4
1.2. Determinácia a diferenciácia pohlavia a evolúcia pohlavných chromozómov	4
1.3. Pohlavné hormóny a aktivačne-organizačná hypotéza	8
1.4. Genotypické a enviromentálne určenie pohlavia	10
2. Charakteristika skupiny Eublepharidae a modelových druhov <i>Coleonyx elegans</i> a <i>Eublepharis macularius</i>	12
2.1. Gekončík mexický (<i>Coleonyx elegans</i>)	13
2.2. Gekončík nočný (<i>Eublepharis macularius</i>)	13
3. Experiment I: Vplyv steroidných hormónov na determináciu pohlavia u gekončíka <i>Coleonyx elegans</i>	14
3.1. Materiál a metodika	14
3.2. Výsledky	15
3.3. Diskusia	16
4. Experiment II: Úloha testosterónu pri kontrole pohlavného dimorfizmu u samíc gekončíka <i>Eublepharis macularius</i>	19
4.1. Materiál a metodika	19
4.2. Výsledky	23
4.3. Diskusia	25
5. Záver	28
Referencie	29

1. Mechanizmy určujúce pohlavie a pohlavný dimorfizmus

1.1. Vznik sexuality a pohlavného dimorfizmu

Na počiatku vzniku sexuality a vývoja pohlavného dimorfizmu stáli dva zásadné procesy – evolúcia meiózy a syngamie u Eukaryot. Práve tieto apomorfie sa stali prekursorom pre evolúciu dimorfných pohlavných buniek (anizogamia) a následný rozvoj všetkých ďalších pohlavných rozdielov. Meióza je u Eukaryot vysoko konzervovaná a predpokladá sa dokonca, že posledný spoločný predok Eukaryot už meiózu mal a teda, že pravdepodobne neexistujú žiadne primárne asexuálne eukaryotné organizmy (Rhen 2007). Na druhej strane, význam vzniku syngamie a následného pohlavného rozmnožovania je predmetom mnohých hypotéz, ale v zásade je jeho najdôležitejším dôsledkom umožnenie selekcii vytvárať pohlavné rozdiely.

V súvislosti so vznikom anizogamie vznikol trade-off medzi počtom gamét a ich veľkosťou. V závislosti na množstve zdrojov sa fitness jednotlivca zvýši s počtom potomkov, pokiaľ počet potomkov koreluje s počtom gamét. Na druhej strane, veľkosť gamét zvyšuje fitness jedinca pokiaľ je prežitie zygoty závislé na veľkosti fúzujúcich pohlavných buniek. Mnohobunkové organizmy majú zygotu, ktorá má polovicu genómu zdedenú po matke a druhú polovicu po otcovi. Pohlavne antagonistická evolúcia vyvíja na gény exprimované u samčieho aj samičieho pohlavia vysoký tlak, a tak evolúcia pohlavne dimorfného znaku je v zásade vývoj mechanizmov, ktoré tento tlak uvoľňujú.

1.2. Determinácia a diferenciacia pohlavia a evolúcia pohlavných chromozómov

Každý pohlavne dimorfný jedinec musí prejsť dvoma procesmi, pri ktorých tieto odlišnosti vznikajú. Často dochádza k ich zámene, preto je dobré si ich hneď na začiatku definovať.

Pohlavná diferenciacia je proces, pri ktorom vznikajú a vyvíjajú sa samčie alebo samičie pohlavné orgány z ešte nediferencovaných gonád. Determinácia pohlavia je proces, ktorý rozhoduje o tom, či bude vývin jedinca ďalej posupovať v samčom, alebo samičom smere (Pieau a kol. 1999, Sarre a kol. 2004, Rhen 2007).

Základnými mechanizmami, ktoré hrajú rolu v pohlavnej diferenciácii sú bunkové a vývinové mechanizmy, pohlavne špecifická génová expresia, pohlavne viazaná expresia autozomálnych génov a génové epistázy, epigenetické mechanizmy a fenotypová plasticita.

1.2.1. Bunkové a vývinové mechanizmy

Bunkové a vývinové mechanizmy pohlavnej diferenciácie zodpovedajú za pohlavné rozdiely v bunkovom raste, proliferácii a bunkovej smrti. Tieto procesy sa podieľajú na vývoji gonád, ktorý je u stavovcov vysoko konzervovaný. V embryách stavovcov sa súčasne vyvíja Wolfov aj Müllerov vývod a primordium pohlavných žliaz, ktoré je bipotentné: z medulárnej oblasti sa môže vyvinúť samčie testes alebo z kortikálnej samičie ovárium.

V samčích embryách pôsobí testosterón syntetizovaný v testes ako faktor pre prežitie buniek Wolfovho vývodu a hormón AMH (anti-müllerian hormone), ktorý spôsobuje zánik Mullerovho vývodu prostredníctvom bunkovej smrti a tým spúšťa diferenciáciu samčieho typu pohlavných orgánov. Na druhej strane, samičie embryá neprodujú testosterón ani AMH a Wolfov vývod u nich zaniká bunkovou smrťou a Müllerov rastie a diferencuje sa a dáva tak vznik samičiemu typu pohlavných orgánov.

Rola AMH je v embryonálnom štádiu komplikovaná u samcov aj u samíc. Jeho ektopická expresia v samičích embryách má závažné následky: samiciam sa nevyvinie maternica a nie sú schopné rozmnožovania sa. U samcov naopak narušenie AMH signalizácie má za dôsledok neplodnosť. Takto silne antagonistická selekcia by mala pravdepodobne smerovať k strate AMH génu u samíc, ale jeho udržaniu u samcov. Nemôžeme však opomenúť fakt, že AMH hrá významnú rolu vo vývine folikulov u dospelých samíc. Hormón AMH je u ľudí a myší lokalizovaný na autozomálnom lokuse a je preto možné, že jeho expresia je regulovaná pleiotropickými efektmi génov viazaných na pohlavnom chromozóme, alebo pohlavne-špecifickou génovou expresiou (La Marca a kol. 2006, Rhen 2007).

1.2.2. Pohlavne-špecifická génová expresia a evolúcia pohlavných chromozómov

Pre samčie aj samičie pohlavie, by bolo ideálnym riešením sexuálne-antagonistického konfliktu, keby sa všetky gény zvýhodňujúce samčie, ale znevýhodňujúce samičie pohlavie dostali na chromozóm Y - samozrejme, platí to len u druhov s XX/XY typom genotypicky určeného pohlavia. Naopak u druhov s ZZ/ZW typom, by bolo pre obe pohlavia najlepšie, keby sa gény prospievajúce samiciam, ale nie samcom, všetky nachádzali na W-chromozóme.

Pohlavné chromozómy sa môžu vyvinúť vďaka pomerne jednoduchému prvému kroku: na niektorom z autozómov vznikne pohlavie-determinujúci gén. Za pôsobenia sexuálne antagonistickej selekcie sa k nemu postupne pridávajú ďalšie gény, zvyhodňujúce dané pohlavie. Chromozóm s pohlavie-determinujúcim lokusom (pohlavný neochromozóm) a jeho párový chromozóm vzájomne divergujú. Zároveň vznikajú génové väzby medzi génom určujúcim pohlavie a ďalšími pohlavne špecifickými génmi. Selekcia ďalej vyvíja tlak na zabránenie rekombinácii medzi pohlavným neochromozómom a jeho párovým chromozómom. Po zabránení rekombinácii (napr. inverziou), dochádza k hromadeniu mutácií a k postupnej, ale relatívne rýchlej degradácii a ubúdaniu génov na pohlavnom neochromozóme (Müllerova rohatka). Výsledkom tohoto procesu je diferenciácia dvoch nerekombinantných pohlavných chromozómov X a Y alebo Z a W (Arnold 2004, Rhen 2007).

Novovzniknuté pohlavné chromozómy môžeme podľa stupňa divergencie rozdeliť na homomorfné (u plazov napr. primitívne veľhadovité Boidae) a heteromorfné (užovkovité Colubridae, koralovcovité Elapidae a zmijovité Viperidae), prípadne sa môže pohlavie-determinujúci lokus nachádzať na mikrochromozóme (napr. mikrochromozómy ZW u *Pogona vitticeps* (Ezaz a kol. 2005).

1.2.3. Pohlavne-limitovaná expresia autozomálnych génov a epistázy

Aj keď u druhov s genotypickým určením pohlavia je pohlavie určené prítomnosťou pohlavie-determinujúceho génu na pohlavnom chromozóme, kde sa spolu s ním vo väzbe nachádzajú aj ďalšie pohlavne-viazané gény, tak väčšina génov je uložená na autozómoch. Gény viazané na autozómoch, ktoré ovplyvňujú niektorý pohlavne dimorfný znak, však majú často antagonistické účinky: jedno pohlavie zvyhodňujú, avšak u toho druhého majú negatívny vplyv. Tento konflikt vyriešila evolúcia vznikom mechanizmov, ktoré expresiu týchto génov regulujú.

Jedným z nich je epistáza medzi génmi na pohlavnom chromozóme a autozomálnym lokusom (Montagutelli a kol. 1996, Perry a kol. 2003). Expresia autozomálneho génu je teda regulovaná buď priamo - expresiou pohlavne-špecifického génu alebo nepriamo tak, že jej miera závisí od rozdielu v génovej dóze pohlavne-viazaných a autozomálnych génov.

Ďalším mechanizmom regulujúcim mieru expresie génov je na pohlavných chromozómoch nezávislé pôsobenie steroidných hormónov. Ich funkciou je preniknúť do bunky a naviazať sa na špecifický receptor v cytoplazme. Na receptoroch pre steroidné

hormóny je naviazaný chaperon, ktorý zabraňuje preniknutiu komplexu do jadra bunky. Po naviazaní steroidného hormónu sa chaperon uvoľní a komplex hormón-receptor vstupuje do jadra bunky, kde sa naviaže na DNA v mieste HRE (= hormone response elements) a pôsobí tam ako stimulátor alebo inhibítor transkripcie. Viac o funkcii, syntéze a účinkoch steroidných hormónov v kapitole 1.3.

1.2.4. Epigenetické mechanizmy

Epigenetické mechanizmy zahŕňajú genomický imprinting, mimojadrovú dedičnosť a rodičovskú alokáciu zdrojov do určitého potomka. Jedinec má v genóme dve chromozomálne sady – jednu od matky a jednu od otca. Prostredníctvom napr. DNA-metylácie sa jedna z alel (maternálna či paternálna) utlmí a exprimovaná ostáva len alela získaná od druhého rodiča. Genomický imprinting funguje rovnako u dcér aj synov, takže obe pohlavia potomkov budú mať metylovanú tú istú alelu. Týmto mechanizmom je napríklad kontrolovaná odpoveď na stres u potkanov (Francis a kol. 1999).

Vplyv organelovej dedičnosti na determináciu pohlavia a pohlavne dimorfné znaky nie je u pohlavne sa rozmnožujúcich stavovcov veľmi preskúmaný. Recentný výskum mitochondriálnej dedičnosti u kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*) a octomiliiek (*Drosophila melanogaster*) však ukazuje, že mitochondriálna DNA (mtDNA) by mohla mať významný vplyv na výrazný pohlavný dimorfizmus v starnutí (Camus a kol. 2012, Wolff a Gemmell 2013).

Dôležitá je otázka alokácie do samčích či samičích potomkov. Podľa hypotézy optimálneho pomeru pohlaví (Trivers-Willardov model), by matky v dobrej fyzickej kondícii mali produkovať pomery pohlaví posunuté smerom k tomu pohlaviu, ktoré vyťaží z matkinej dobrej kondície viac. Naopak matky v zhoršenej kondícii budú favorizovať pohlavie, ktoré bude lepšie znášať zlé podmienky. Podľa tohto modelu, by u polygynných druhov mala fungovať vyššia maternálna alokácia do samcov. Platnosť modelu závisí na troch základných predpokladoch: 1. fitness potomkov po narodení koreluje s kondíciou matky; 2. rozdiely vo fitness potomkov po narodení majú tendenciu pretvrdnúť do dospelosti; 3. zvýhodňovanie jedného pohlavia v alokácii, v dospelosti zvyšuje jeho úspech v reprodukčnej stratégii (napr. u polygynných druhov samce oplodnia viac samíc) oproti druhému pohlaviu (Trivers a Willard 1973).

1.2.5. Fenotypová plasticita

Pojem fenotypová plasticita sa dá v zásade použiť pre všetky prípady, keď z jedného genotypu, môže vzniknúť niekoľko odlišných fenotypov. Fenotypová flexibilita je na podmienkach prostredia závislá variabilita jedica, ktorá je reverzibilná a jej zmeny v priebehu života sú zväčša predikovateľné (napr. sezónne). Vývinová plasticita, je variabilita v ontogenéze jedinca v rámci jedného genotypu, ktorá je indukovaná prostredím a je spravidla ireverzibilná (Piersma a Drent 2003). Mechanizmy fenotypovej plasticity zahŕňajú interakcie medzi vývinovými, hormonálnymi a enviromentálnymi faktormi.

Zvláštnym prípadom fenotypovej plasticity je aj enviromentálne určenie pohlavia (ESD). Tento typ určenia pohlavia sa vyskytuje u mnohých druhov, ktoré nemajú pohlavné chromozómy a teda genotyp potomstva je rovnaký. Hlavným faktorom, ktorý spôsobí vznik samčieho či samičieho fenotypu, je v tomto prípade niektorý z vplyvov prostredia počas obdobia rannej embryogenézy. Najčastejším faktorom je inkubačná teplota, ktorá u plazov, obojživelníkov aj rýb ovplyvňuje pomery pohlaví potomstva u druhov s teplotným určením pohlavia (TSD). Viac o tomto type určenia pohlavia je v kapitole 1.4.

Steroidné hormóny predstavujú dôležitý mediátor medzi faktormi prostredia a ich zmenami a fenotypom. Kontrolujú génovú expresiu, rýchlosť metabolizmu v cieľových bunkách a majú stimulačné, inhibičné a synergistické interakcie s ostatnými hormónmi. Práve účinky steroidných hormónov môžu zvrátiť mnohé pohlavne dimorfné znaky prípadne úplne revertovať pohlavie jedinca.

1.3. Pohlavné hormóny a aktivačne-organizačná hypotéza

Pohlavné hormóny hrajú zásadnú rolu v pohlavnej diferenciácii a pohlavnom dimorfizme. Podľa aktivačne-organizačnej hypotézy sa účinky pohlavných hormónov delia na organizačné a aktivačné. Organizačné účinky pôsobia v rannom vývoji a sú permanentné a aktivačné účinky môžu byť len dočasné a pôsobia v priebehu rôznych období života (Arnold a Breedlove 1985). Táto hypotéza jednoznačnej dichotómie však už bola aktualizovaná. Podľa Crewsa (2003) je hlavný rozdiel v tom, že organizačné účinky hormónov pôsobia na znaky pohlavného dimorfizmu pri vzniku a diferenciácii tela, mozgu a správania v rannej embryogenéze a aktivačné pôsobia v dospelosti, kedy ich povahou a spôsobom svojej sekrécie aktivujú. Pohlavné hormóny podané v období tzv. senzitivnej periódy, môžu definitívne zmeniť organizáciu pohlavne dimorfných centier v mozgu, pohlavných orgánov a

d'alších špecifických tkanív. Tento efekt už nie je možné zvrátiť ďalšou manipuláciou po skončení senzitivnej periódy. Pre aktivačné účinky hormónov naopak platí, že po ukončení vystavenia jedinca zvýšeným hladinám niektorého hormónu, sa jeho účinky stratia a organizmus sa navráti k pôvodnému fungovaniu.

Pre štúdium organizačne-aktivačných účinkov hormónov sa využívajú rozličné metódy – od priamej aplikácie hormónov či hormonálnych implantátov, cez kastrácie až po tvorbu lézií v pohlavne špecifických centrách v mozgu, či reverziu pohlavia.

Asi najväčším úskalím štúdia hormonálnej kontroly pohlavného dimorfizmu, sú pleiotropné efekty hormonálneho systému. Steroidné hormóny necirkujú v krvi osamote – sú naviazané na proteíny, ktoré zvyšujú ich rozpustnosť v krvi. Takže zmeny v hladinách týchto väzobných proteínov ovplyvňujú dostupnosť cirkulujúcich hormónov v krvi. Ďalším faktorom ovplyvňujúcim pôsobenie hormónov, sú zmeny v počte a aktivite špecifických receptorov v bunkách. V prípade, že je bunka dlhodobo vystavená zníženým hladinám určitého hormónu v plazme, tak je schopná zvýšiť počet receptorov tohto hormónu a tak kompenzovať jeho nedostatok zvýšením svojej citlivosti voči nemu (Dufty a kol. 2002, Bowden a kol. 2000). Receptory hormónov majú rôznu afinitu k určitým hormónom a v závislosti na podmienkach prostredia sa môžu v rôznych obdobiach aktivovať či deaktivovať a tiež tak regulovať pôsobenie hormónov. Stresový hormón kortikosterón napríklad, má dva typy receptorov – jeden je aktivovaný pri nízkych hladinách hormónu a má vysokú afinitu, kdežto druhý je aktivovaný pri vysokých hladinách (pri vyššom strese) a jeho afinita je naopak nízka (Dufty a kol. 2002). Tým je umožnená variabilita odpovede bunky na rôzne stresové podnety. Štúdie pleiotropných účinkov hormónov na fenotypové prejavy prebiehajú často na myšiach s knockoutovanými génmi pre určitý typ špecifického receptoru (ERKO – „estrogen receptor knock-out“), enzýmu (ArKO – „aromatase knock-out“), či hormónu (Couse a Korach 1999, Hill a Boon 2009).

Medzi najdôležitejšie pohlavné hormóny patria androgény, estrogény a progestáíny. Syntetizujú sa steroidogéznou z cholesterolu v gonádach a v mozgu. Ovpľyňujú tiež génovú expresiu a tým regulujú fyziológiu a behaviorálne prejavy organizmu. Dôležitým enzýmom, ktorý ovplyvňuje funkciu pohlavných hormónov je aromatáza. Aromatáza reguluje hladiny pohlavných hormónov tým, že konvertuje testosterón na estradiol. Má tiež kľúčovú rolu počas termosenzitivnej periódy u TSD druhov, čo je obdobie kedy sú jedince citlivé na inkubačnú teplotu a na jej základe sa im determinuje pohlavie.

1.4. Genotypické a enviromentálne určenie pohlavia

Stavovce majú dva základné typy determinácie pohlavia: genotypické (GSD) a enviromentálne (ESD). Kritériom dichotómie je prítomnosť alebo absencia pohlavných chromozómov (Valenzuela a kol. 2003).

Na základe tohto kritéria medzi druhy s GSD zaraďujeme všetky druhy, u ktorých boli preukázané pohlavné chromozómy, t.j. chromozómy obsahujúce gén, prípadne gény detrmínujúce pohlavie. Pohlavné chromozómy môžu byť v závislosti na stupni divergencie homomorfné alebo heteromorfné, prípadne môže byť pohlavie určujúci gén uložený na mikrochromozóme (častý prípad u vtákov) alebo autozóme (Ezaz a kol. 2005, Wallis a kol. 2008). Odlíšujeme dva systémy GSD – samčiu heterogamiiu XX/XY a samičiu heterogamiiu ZZ/ZW.

Determinácia pohlavia je u cicavcov daná prítomnosťou pohlavie-determinujúceho génu *Sry*, ktorý je kódovaný na Y chromozóme. Jeho expresia podmieňuje diferenciaciu testes. V testes je syntetizovaný testosterón, ktorý reguluje pohlavne špecifickú génovú expresiu v mozgu a v ďalších tkanivách a tým spúšťa mechanizmus vývinu jedinca so samčím fenotypom. V prípade chýbajúceho, či nefunkčného génu *Sry* sa spustí vývin ovárií a z jedinca sa vyvinie samica.

U vtákov je konzervovaná samičia heterogamia ZZ/ZW a je niekoľko kandidátov na transkripčné faktory podmieňujúce diferenciaciu ovárií (FOXL2, aromatáza, RSPO1, WNT4, β -catenin a ďalšie), ale žiaden zatiaľ nebol preukázaný. V diferenciacii testes hrá ústrednú rolu pravdepodobne gén DMRT1 kódovaný na Z chromozóme (Ayers a kol. 2013). Rozhodujúcou pre diferenciaciu testes je dvojitá génová dóza DMRT1 u samčieho pohlavia (ZZ) oproti samičiemu (ZW) (Georges a kol. 2010).

U nižších stavovcov nie je determinácia pohlavia naprieč jednotlivými skupinami tak konzervovaná. Okrem GSD druhov nájdeme aj množstvo druhov s enviromentálnym určením pohlavia (ESD). Napríklad u rýb, druh *Oryzias latipes* má XX/XY pohlavné chromozómy, s pohlavie-determinujúcim génom DMY na Y chromozóme, ktorý je zodpovedný za vývin jedinca samčieho typu. Zároveň je však tento druh teplotne-senzitívny, čo sa prejavuje reverziou pohlavia u XX samíc v prípade vystavenia vysokej teplote vody počas senzitívnej periódy. Ak je teplota vyššia ako 32 °C, tak sa z genotypických samíc vyvinú morfológickí samci, so všetkými pohlavne dimorfnými samčými znakmi a funkčnými testes, ktorý sú plne fertilní (Selim a kol. 2009).

Plazy majú tiež veľmi široké spektrum pohlavie-determinujúcich systémov: samčia i samičia heterogamia u GSD, mnohé druhy majú GSD s homomorfnými pohlavnými chromozómami, či mikrochromozómami a mnohé TSD. Hlavný pohlavie-determinujúci gén ani molekulárny mechanizmus determinácie pohlavia však u GSD plazov zatiaľ nie je známy (Georges a kol. 2010).

Enviromentálne určenie pohlavia (ESD) je príkladom fenotypovej plasticity, pri ktorom samci aj samice majú rovnaký genotyp, ale líšia sa fenotypovými prejavmi, ktoré vznikajú na základe podmienok prostredia. Najdôležitejším faktorom pre determináciu pohlavia u plazov s ESD je inkubačná teplota zažitá v senzitívnej perióde (tá je približne v druhej tretine embryonálneho vývinu). Inkubačná teplota pôsobí na genetické mechanizmy, ktoré riadia steroidogénne enzýmy alebo receptory steroidných hormónov a zmenou hormonálneho prostredia pre pohlavne nediferencované embryo teda určujú vývoj v samčom alebo samičom smere (Sarre a kol. 2004). U mnohých druhov TSD plazov bola pokusmi stanovená konkrétna konštantná inkubačná teplota, ktorá spôsobuje produkciu 100% samcov alebo 100% samíc potomstva (typ I). Pri stredných teplotách však dochádza k produkcii rozdielnych pomerov pohlaví. Na druhej strane, napríklad u gekončika *Eublepharis macularius*, sú samice produkované pri nízkych aj vysokých teplotách, kdežto samci vznikajú pri stredných teplotách (typ II). Inkubačná teplota u TSD druhov nekontroluje len determináciu pohlavia a vývin sekundárnych pohlavných znakov, ale aj fyziológiu a behaviorálny fenotyp (Flores a kol. 1994, Flores a Crews 1995).

Existuje niekoľko hypotéz o tom, ktoré proximálne mechanizmy u TSD druhov regulujú determináciu a diferenciáciu jedinca. Podľa konceptu autorov Pieau a Dorizzi (2004) je u TSD druhov za diferenciáciu gonád v ováriách zodpovedná istá prahová hodnota estradiolu (E2). Pokiaľ je táto hladina nižšia, z pôvodne nediferencovanej gonády sa vyvinú testes. Podľa uvedeného konceptu sú za udržiavanie hladiny E2 zodpovedné teplotne závislé faktory. Medzi ne patrí napríklad aj aktivita aromatázy a úroveň expresie génu pre aromatázu. Hlavnou funkciou aromatázy je konverzia T na E2, čím významne ovplyvňuje hladiny cirkulujúcich pohlavných hormónov. Ktorý faktor je však zodpovedný za reguláciu hladín pohlavných hormónov pri stredných teplotách kedy sa ľahnu rozdielne pomery oboch pohlaví? Podľa Elfa (2003) by to mohlo byť spôsobené rozdielnou maternálnou alokáciou žltkových steroidov. Korelácia ich hladín s výsledným fenotypom bola potvrdená u TSD korytnačiek a gekonov (Bowden a kol. 2000, Warner a kol. 2008, Ding a kol. 2012).

Alternatívnou hypotézou k rozdeleniu pohlavie-determinujúcich mechanizmov dichotomicky je hypotéza kontinua medzi GSD a TSD. Podľa autorov nie sú žiadne jasne dané hranice medzi GSD a TSD, a preto tvrdia, že sú to len konce kontinua, v ktorom v mnohých prípadoch genetické a enviromentálne faktory koexistujú a vzájomne interagujú pri produkcii fenotypov. Sarre a kol. tvrdia, že tranzícia medzi GSD a TSD je jednoducho možná, prostredníctvom zmeny hlavného regulátora. Môžu ním byť gény pre transmembránové receptory, transkripčné faktory, fosfatáza, cytoplazmatické proteíny, proteáza či tRNA (Sarre a kol. 2004). Svoju hypotézu dokladajú štúdiami na niekoľkých druhoch plazov, u ktorých boli preukázané pohlavné chromozómy, ale zároveň sa potvrdilo, že počas senzitívnej periódy môže v určitých prípadoch genotypické pohlavie zvrátiť teplota – napr. *Bassiana duperreyi* (Shine 2002). Na druhej strane, proti tejto hypotéze stále stojí fakt, že dobre podložený prípad tranzície z GSD k TSD u plazov nepoznáme, ale mnohé tranzície v smere k vzniku pohlavných chromozómov a genotypickej determinácie pohlavia máme dobre zdokumentované (Pokorná a Kratochvíl 2009). Konflikt medzi hypotézou dichotómie a hypotézou kontinua medzi GSD a TSD by sa tak dal vysvetliť aj existenciou GSD s enviromentálnym vplyvom. Môžu v ňom vplyvom teploty alebo hormonálnej manipulácie vznikáť pohlavne revertovaní jedinci s fenotypom nezodpovedajúcim ich genotypu. Toto vysvetlenie korešponduje aj s teóriou, že pôvodným systémom určenia pohlavia bolo ESD, z ktorého sa evolúciou pohlavných chromozómov vyvinulo GSD (Ohno 1967).

2. Charakteristika skupiny Eublepharidae a modelových druhov *Coleonyx elegans* a *Eublepharis macularius*

Gekončíci skupiny Eublepharidae majú oba systémy determinácie pohlavia GSD aj TSD a nájdeme u nich druhy s rôznym stupňom divergencie pohlavných chromozómov. Na rozdiel od ostatných skupín gekonov majú očné viečka a chýbajú im adhézne brušá prstov. Väčšina druhov kladie v jednej znáške 2 vajíčka, približne rovnako veľké a ich vitelogenéza aj ovulácia prebieha v rovnakom čase (Rhen 2000).

2.1. Gekončík mexický (*Coleonyx elegans*)

Tento druh gekončíka je zaujímavý hlavne z hľadiska jeho prekopulačného a kopulačného chovania. Oproti ostatným gekončíkom je jeho prekopulačné chovanie značne zjednodušené. Z pôvodne zložitého komplexu samčieho sexuálneho chovania si zachoval len tzv. body-grip a mounting. Body-grip nastáva, keď sa samec pred pokusom o kopuláciu so samicou, zakúsne do jej záhlavnej oblasti a vzápätí po ňom nasleduje mounting – samec vylezie samici na chrbát, pridržiava si ju prednými končatinami a jedným z hemipenisov s ňou kopuluje.

U gekončíka mexického dlho neboli objavené pohlavné chromozómy, avšak vedelo sa, že má vyrovnané pomery pohlaví aj pri rôznych inkubačných teplotách. Pohlavné chromozómy sa podarilo objaviť Pokornej a kol. (2010) a tým preukázať jeho genotypické určenie pohlavia.

2.2. Gekončík nočný (*Eublepharis macularius*)

Gekončík nočný je typickým modelovým druhom pre štúdium TSD. Pri inkubačnej teplote 26 °C sa liahnu len samice, pri 30 °C je pomer pohlaví posunutý smerom k samiciam (30:70), pri 32,5 °C je pomer pohlaví posunutý smerom k samcom (75:25) a pri teplotách nad 34 °C je opäť posunutý na stranu samíc (5:95) (Viets a kol. 1993).

Na rozdiel od gekončíka mexického si zachoval typické samčie sexuálne chovanie pre väčšinu gekončíkov. Samec pri stretnutí so samicou najskôr trením prekloakálnych pórov o substrát umiestňuje pachové značenie (marking). V prípade záujmu o samicu sa prezentuje vibrovaním poslednými článkami chvosta, ktoré vytvára charakteristický zvuk (tail-vibration). Ďalej nasleduje vyššie popisovaný body-grip a mounting. Pre samcov je tiež v interakcii s iným samcom typické agresívne chovanie. Samičie sexuálne chovanie je omnoho jednoduchšie: ak receptívna, reaguje na samcove prejavy zdvihnutím chvosta a sprístupnením kloaky. Receptivitu a ochotu páriť sa preukazuje aj tak, že neuteká pred námluvným chovaním samca.

3. Experiment I: Vplyv steroidných hormónov na determináciu pohlavia u gekončika *Coleonyx elegans*

Hlavným zámerom tejto časti našej práce bolo skúmať vplyv exogénne aplikovaných steroidných hormónov na determináciu pohlavia. Ako modelový druh sme si vybrali gekončika *Coleonyx elegans*, u ktorého boli objavené pohlavné chromozómy. Samec má systém pohlavných chromozómov X_1X_2Y (kde Y je metacentrický) a samica $X_1 X_1X_2 X_2$ (Pokorná a kol. 2010). Cieľom experimentu bolo získať pohlavne revertované jedince ($X_1X_1X_2X_2$ samce a X_1X_2Y samice) a zistiť ich behaviorálne a morfológické fenotypy. V prípade, že by boli revertanti fertílne, tak ich ďalej krížiť s nerevertovanými jedincami a pátrať po géne určujúcom pohlavie.

3.1. Materiál a metodika

Výber zvierat do pokusu

Vybrali sme priamo nepríbuzné samice zo stabilného laboratórneho chovu *Coleonyx elegans*, ktoré sme umiestnili do terárií v skupinách po štyroch. Ku každej zo štrnástich skupín sme na jeden týždeň pridali jedného nepríbuzného samca, aby došlo k spáreniu a oplodneniu samíc. Po týždni sme samcov od skupín samíc oddelili, keďže dlhodobé spolunažívanie samíc so samcom v teráriu spôsobuje samiciam stres. Zvieratá mali svetelný režim 12:12 a stálu teplotu 28°C. Kŕmené boli dvakrát týždenne cvrčkami obalenými v zmesi vitamínov a minerálov (Roboran) ad libitum; za stálej dostupnosti vody s rozpusteným vápnikom. Každé dva týždne dostávali vo vode vitamíny A, D, E a K. Ako podstielku sme používali lignocel (kokosové vlákno). Do všetkých terárií sme vložili kladisko (plastovú krabicu), ktoré bolo naplnené zvlhčeným substrátom. Kladiská sme kontrolovali každých 48 hodín a znesené vajíčka sme odobrali.

Hormonálna manipulácia s vajíčkami

Čerstvo odobraté vajíčka boli zvážené a náhodne rozdelené do troch skupín: F, E a C. Na základe rozdelenia do skupín boli ďalej podrobené hormonálnej manipulácii. Vajíčkam v skupine F bol aplikovaný roztok fadrozolu v koncentrácii 0,06 g fadrozolu na 10 ml etanolu (koncentrácie podľa: Shine a kol. 2007). Skupine E bol aplikovaný roztok estronu v koncentrácii 0,01 g estronu na 10 ml etanolu (podľa Radder a kol. 2008). Skupina C slúžila ako kontrolná skupina a tak bol na vajíčka aplikovaný len etanol. Na jedno vajíčko z každej

skupiny sme napipetovali 5 μ l príslušného roztoku a umiestnili ho do inkubátora so stabilnou teplotou 27 °C.

Morfologické a behaviorálne testy, určenie pohlavia

Po vyliahnutí sme mláďatá zvážili a umiestnili do samostatných terárií. Starostlivosť bola podobná, ako je popísané vyššie, s tým rozdielom, že mláďatá boli kŕmené pravidelne každé dva dni.

Naším cieľom bolo po dosiahnutí pohlavnej dospelosti mláďat pokračovať behaviorálnymi a morfologickými testami zameranými na pohlavne dimorfné znaky. Morfologickými testami sme mali určiť veľkosť hemipenisov, šírku hlavy, váhu a dĺžku tela. Behaviorálne testy mali byť zamerané na pohlavne dimorfné znaky sexuálneho chovania, konkrétne na záujem páriť sa, agresivitu samcov, receptivitu a atraktivitu samic. V testoch by hormonálne manipulovaní jedinci zo všetkých skupín interagovali s nemanipulovanými naivnými samcami a samicami. Genetické pohlavie malo byť určené pomocou molekulárne-cytogenetickej analýzy karyotypu z odobratej krvi.

Zaznamenali sme však vysokú mortalitu vajčiek i mláďat a zlé prosperovanie preživších jedincov a tak sme boli nútení design pokusu zmeniť. Uhynutým i eutanazovaným mláďatám sme determinovali pohlavie na základe prítomnosti gonád v brušnej dutine a určili sme pomery pohlaví v jednotlivých skupinách. Uhynutým mláďatám nemohlo byť pohlavie určené všetkým, pretože v začiatkoch pokusu sme nepredpokladali tak vysokú mortalitu a uhynuté mláďatá sme pre podozrenie z choroby neskladovali. Pri rastúcej mortalite sme uhynuté mláďatá začali uchovávať v plastových obaloch v mraziacom boxe kvôli neskoršiemu osexovaniu. Pre štatistické analýzy na efekt manipulácie na mortalitu vajec, mortalitu mláďat a pohlavie mláďat sme zvolili metódu maximálnej vierohodnosti pre binomické rozdelenie. Testy boli prevedené v programe STATISTICA 8.0.

3.2. Výsledky

Mortalita vajec a mláďat

V priebehu pokusu, ktorý trval 1 rok, bolo manipulovaných 83 čerstvo znesených vajec – z toho kontrolných 27 (skupina C), s aplikáciou estradiolu 27 a s aplikáciou Fadrozolu 29 vajec. Zaznamenaná mortalita vajec, mláďat a celková mortalita jedincov, ktorí sa nedožili pohlavnej dospelosti je v Tabuľke č.1. Vplyv jednotlivých manipulácií na mortalitu vajec nebol preukázaný ($\chi^2 = 0,72$; $p = 0,70$). Rovnako nebol preukázaný ani efekt manipulácií na

mortalitu už vyliahnutých mláďat ($\chi^2 = 1,15$; $p = 0,56$). Zo všetkých manipulovaných vajec v čase ukončenia ďalších manipulácií prežilo 40 a tak celková mortalita pre všetky skupiny bola 51,81%.

Tabuľka 1: Mortalita vajec a mláďat

skupina	manip. vajec	nevyliahnutých vajec	uhynutých mláďat	mortalita vajec (%)	mortalita mláďat (%)	celková mortalita (%)
C	27	5	10	18,52	45,45	55,56
E	27	7	6	25,93	30,00	48,15
F	29	5	10	17,24	41,67	51,72
spolu	83	17	26	20,48	39,39	51,81

Pomery pohlaví

Celkovo sme pohlavie určili u 54 mláďat. Vplyv jednotlivých manipulácií na pomery pohlaví mláďat nebol štatisticky preukázaný ($\chi^2 = 4,29$; $p = 0,12$). Pomery pohlaví v skupinách C, F a E sú zobrazené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Pomer pohlaví v jednotlivých skupinách s rozdielnou manipuláciou

skupina	samcov/samíc	podiel samcov	podiel samíc
C	9:4	69,23%	30,77%
E	14:8	63,64%	36,36%
F	7:12	36,84%	63,16%
spolu	30:24	55,56%	44,44%

3.3. Diskusia

Manipulácia s čerstvo znesenými vajčkami je vždy veľmi citlivá záležitosť. Obzvlášť u druhu ako *Coleonyx elegans*, ktorý má malé kožovité vajčka s hmotnosťou okolo 1g. Vplyv exogénnych hormónov podaných v dobe inkubácie sa u plazov skúma mnohými spôsobmi. Vysoká mortalita vajec a mláďat v našom pokuse nemohla byť spôsobená účinkami aplikovaných steroidných hormónov, pretože signifikantný rozdiel v mortalite medzi jednotlivými skupinami sa nepreukázal, a to ani u vajec ani u mláďat. Príčinou vysokej mortality mohlo byť vystavenie embryí príliš vysokým dávkam etanolu. Etanol v embryonálnom vývine môže vyvolať plodový alkoholový syndróm FAS (fetal alcohol syndrome), ktorý spôsobuje spomalenie, či zastavenie rastu, abnormálne zvýšenú bunkovú

smrť, dysfunkcie a anomálie v činnosti centrálnej nervovej sústavy, srdca, očí, obličiek a opornej a svalovej sústavy. Giles a kol. (2008) testovali vplyv aplikácie etanolu na kuracie embryá po 48 hodinách inkubácie od znesenia vajíčka. Priamo na jednotlivé embryá napipetovali 20 μ l etanolu a po niekoľkých hodinách pozorovali kraniofaciálne defekty, abnormálny vývin neurálnej trubice a zvýšenú bunkovú smrť. V našej práci sme síce etanol aplikovali na povrch vajíčka, avšak množstvo takmer 5 μ l etanolu, v ktorom boli podávané hormóny rozpustené, mohlo u tak malých vajíčok gekončínkov *Coleonyx elegans* pôsobiť škodlivo ako na embryonálny, tak na postnatálny vývoj.

Práce s podobnou metodikou, z ktorých sme pri plánovaní experimentu vychádzali, tiež aplikovali na vajíčka steroidné hormóny v roztoku s etanolom, niektoré v rovnakých koncentráciách, aké sme použili my, avšak u iných druhov. Napríklad Shine a kol. (2007) použili rovnakú koncentráciu Fadrozolu a úspešne revertovali pohlavie u jaštera s GSD *Bassiana duperreyi* aj jaštera *Amphibolorus muricatus*, ktorý má TSD. Ani u jedného nezaznamenali efekt aplikácie Fadrozolu na mortalitu vajíčka. O mortalite vajíčka spôsobenej podaním etanolu v kontrolnej skupine sa nezmieňujú a rovnako ani o mortalite mláďat. V inej štúdií o druhu *Bassiana duperreyi*, Radder a kol. (2007) použili rovnakú metodiku aplikácie estradiolu aká bola použitá aj pri našom experimente. Výsledkom manipulácie bolo, že viac než 90% manipulovaných jedincov boli samice, z ktorých asi polovica boli pohlavní revertanti (XY samice). Ich manipulácia nemala žiaden vplyv na mortalitu vajíčka ani jedincov.

Z vyššie uvedeného vyplýva, že zvýšená mortalita by mohla byť spôsobená špecifikami druhu *Coleonyx elegans*, ako je odlišná priepustnosť škrupiny vajíčka než u spomínaných druhov alebo zvýšená citlivosť na etanol. Tiež je možné, že napriek dlhodobým skúsenostiam s chovom tohto druhu, ktoré náš výskumný tím má, mohlo dôjsť k chybe v starostlivosti o zvieratá alebo o rozšírenie nezistenej choroby.

Hormonálna manipulácia nemala štatisticky významný vplyv na pomery pohlaví v jednotlivých skupinách, avšak z Tabuľky 2 je zrejmé, že k určitým posunom tam došlo. Zaujímavé je, že v skupinách E a C je pomer pohlaví oproti našim očakávaniam posunutý na stranu samcov a naopak u skupiny F na stranu samíc. Tento efekt by mohol byť spôsobený faktom, že účinky steroidných hormónov sú veľmi komplexné a jednotlivé faktory v ich signalizácii majú často pleiotropné účinky. Napríklad skoré podanie estradiolu, ktorý má zväčša feminizačné účinky, u zebričky *Taeniopygia guttata* spôsobuje maskulinizáciu samičieho centra pre spev v mozgu a samice v dospelosti spievajú ako samce (Simpson a Vicario 1991). V prípade však, že sa spolu s estradiolom aplikuje aj Flutamide (blokátor

androgénov), tak k maskulinizácii u samíc nedochádza (Grisham a kol. 2002). Podľa aromatizačnej hypotézy totiž testosterón a estrogén môžu vzájomne konvergovať prostredníctvom enzýmu aromatáza.

Naše výsledky poukazujú tiež na možnosť, že GSD mechanizmus zrejme nedovoľuje manipuláciu pomeru pohlaví prostredníctvom žltkových steroidov. V tom prípade by sa mohlo jednať o evolučne vytvorený mechanizmus, ktorý bráni samici favorizovať určité pohlavie. K podobným záverom smeruje aj štúdia, ktorá skúmala vplyv maternálnych hormónov na pohlavie súbežne sa vyvíjajúcich súrodencov (Kratochvíl a kol. 2007). Predpokladali, že pokiaľ má maternálna alokácia steroidov vplyv na determináciu pohlavia, tak u synchronne sa vyvíjajúcich vajíčok v rovnakom prostredí, za rovnakej teploty a rovnakých hladín hormónov, by mali mať súrodenci vo výsledku vždy rovnaké pohlavie. Autori však zistili, že je tomu tak u TSD druhu gekončíka *Eublepharis macularius*, ale u blízko príbuzného GSD druhu *Coleonyx elegans* majú súrodenci skoro vždy opačné pohlavie a teda je manipulácia prostredníctvom žltkových hormónov nepravdepodobná. Môžeme predpokladať, že determinácia pohlavia u tohto druhu je daná genotypicky. Napriek tomu je však možná maskulinizácia samičieho chovania v dospelosti podaním exogénnych hormónov v podobe T-implantátov (Golinski a kol. 2011).

Každopádne by bolo v budúcnosti u tohto druhu gekončíka dobré otestovať iné metódy vzniku pohlavných revertantov, pretože by nám mohli poskytnúť unikátny pohľad na hormonálnu kontrolu pohlavného dimorfizmu a umožniť nám hlbšie pochopenie pohlavie-determinujúcich mechanizmov.

4. Experiment II: Úloha testosterónu pri kontrole pohlavného dimorfizmu u samíc gekončika *Eublepharis macularius*

Testosterón je jedným z najdôležitejších pohlavných hormónov pri vzniku a vývine pohlavne dimorfných znakov najmä u samcov. U samíc však nie je jeho rola úplne jasná. Zvýšené hladiny testosterónu sú u samíc gekončika *Eublepharis macularius* normálne počas neskorej vitelogenézy, kedy sú samice najviac receptívne. Cieľom našej práce bolo prostredníctvom testosterónových implantátov navodiť u samíc typicky samčie hladiny testosterónu a tak maskulinizovať ich fenotyp. Rozhodli sme sa použiť subkutánne implantáty, aby sme mohli skúmať dlhodobý efekt zvýšených hladín testosterónu. Naším zámerom bolo zistiť, či sú jeho účinky na pohlavný dimorfizmus samíc organizačné a teda po vybratí implantátov ostanú zachované, alebo aktivačné a teda budú po odstránení vyhasínať. Okrem morfológických znakov maskulinizácie (hemipenisy, prekloakálne póry) sme sa sústredili hlavne na znaky behaviorálne. Manipulované samice a mieru maskulinizácie ich chovania sme chceli otestovať v interakciách s ďalšími samicami a samcami. Tie by mali jednoznačne ukázať, ktoré časti sexuálneho chovania sú regulované hladinami testosterónu a nakoľko je jeho efekt aktivačný, či organizačný.

4.1. Materiál a metodika

Výber pokusných zvierat a rozdelenie do skupín

Do pokusu sme vybrali 24 mladých samíc *Eublepharis macularius*. Vybraté samice vo veku asi 6 mesiacov boli všetky naivné - tzn. nikdy nevideli iného jedinca svojho druhu, s dostupnými údajmi o histórii jedinca a ich záznamami: znesenie, hmotnosť vajčiek a dĺžka inkubácie, vyľahnutie mláďat, SVL (snout-to-vent length – dĺžka tela od špičky tlamy po bázu chvosta, v mieste kde je vyústenie kloaky) a váha mláďat. Pokusné zvieratá sme rozdelili do troch skupín homogénnych podľa veku, hmotnosti a SVL (ANOVA v programe Biostatistica). Všetky zvieratá zúčastnené v pokusoch mali nastavený svetelný režim 12:12 (po 18:00 začínal nočný režim) a konštantnú teplotu 28 °C. Kŕmené boli ad libitum dvakrát týždenne a boli im podávané doplnkové minerály a vitamíny (podrobnejšie popísané v 4.1. Materiál a metodika).

Do skupiny B bolo náhodne vybraných 6 samíc. Z pôvodných 8 samíc, boli dve zo skupiny B odobrané a rozdelené do skupín A a C z dôvodu zníženia počtu nutných terminácií na minimum. Zvieratá z tejto skupiny boli po 1. kontrolnom natáčaní (pozri odsek

Behaviorálne testy) zvážené, zmerané (SVL, šírka hlavy a veľkosť hemipenisov - meraná na báze chvosta na úrovni kloaky) a usmrtené dekapitáciou. Následne im boli vypreparované mozgy, ktoré sme poslali na ďalšie analýzy. Ich výsledky budú predmetom výskumu pohlavného dimorfizmu v mozgu, ktorému sa venuje časť nášho pracovného tímu. Na záver sme u všetkých šiestich zvierat morfológicky - na základe prítomnosti ovárií – určili pohlavie. Skupiny A a C, každá po 9 samíc, boli určené na hormonálnu manipuláciu.

Operácie – T-implantáty

Ešte pred dosiahnutím pohlavnej dospelosti sme samiciam v skupinách A a C implantovali podkožné testosterónové implantáty (T-implantáty). Pred jednotlivými operáciami sme každé zviera uspali chladom (asi 10 - 15 min na ľade). Potom sme zmerali SVL, šírku hlavy, veľkosť hemipenisov (postup popísaný vyššie) a zvážili ho. Následne sme mu skalpelom narezali kožu medzi lopatkami a vsunuli pod ňu T-implantát (Golinski a kol. 2011). Ranu sme zafixovali tkanivovým lepidlom a zviera sme nechali prebrať sa pri izbovej teplote. Samice sme po operáciách pravidelne kontrolovali po dobu mesiaca a v prípade komplikácií, keď pokožka okolo implantátu dobre nezrastala, prípadne hrozilo vypadnutie implantátu, sme implantát ďalším drobným zákrokom zasunuli hlbšie. Osvedčilo sa nám implantáty zasúvať do podpažia, kde gekončičky *E. macularius* majú kožnú riasu. Po piatich týždňoch od operácií sme vizuálnou kontrolou potvrdili, že sa samiciam zväčšili hemipenisy a zvýraznili prekloakálne póry.

Behaviorálne testy

Pred termináciou skupiny B a operáciami u skupín A a C prebehol kontrolný behaviorálny test interakcií pokusných samíc so stimulmi – dospelými nemanipulovanými naivnými samicami *E. macularius*, ktoré boli vo veku asi 2 roky.

Každý behaviorálny test prebiehal v laboratórnych podmienkach, jednotlivým interakciám bolo priradené náhodné poradie (z hľadiska skupiny aj SVL a hmotnosti fokálnej samice). Testy začínali vždy po 18:00, teda po zotmení, keď sú *E. macularius* aktívne a boli natáčané kamerou s nočným videním. Počas natáčania bola teplota v aréne udržiavaná v rozmedzí 28-30°C.

Interakcie samica - samica

V sérii behaviorálnych testov bolo celkovo 10 natáčaní interakcií samica-samica. Prvé, kontrolné, ktorého sa zúčastnili všetky skupiny (A, B, C) a ďalších 10, ktoré prebehli až po

terminácii skupiny B a 5 týždňov od operácií skupín A a C – teda v dobe, keď už samice s T-implantátmi (ďalej len T-samice) mali morfológicky samčie pohlavné znaky.

Pred každým natáčaním bola T-samici priradená vždy iná nemanipulovaná samica. Jednotlivé testy prebiehali vždy v domácom teráriu T-samice, ktoré bolo vložené do pripravnej arény. Po krátkej aklimatizácii bola do terária vložená priradená nemanipulovaná samica (stimul). Každá interakcia bola natáčaná po dobu 15 minút, od času vpustenia stimulu.

Pri analýze natočených videí sme hodnotili charakteristické samčie kopulačné chovanie u fokálnych samíc voči stimulom – scent-marking, tail vibration, latenciu do 1. tail vibration, body grip a mounting. Pri kontrolnom natáčaní sme predpokladali, že sa tieto znaky neprejavia a pri ďalších desiatich natáčaniach sa začnú prejavovať v závislosti na miere maskulinizácie chovania T-samíc. Behaviorálne testy sme opakovali každých 14 dní.

Merania hladín hormónov

V priebehu pokusu sme kontrolovali hladinu testosterónu v plazme u T-samíc. Po odbere krvi sme vzorky poslali na analýzu do Endokrinologického ústavu v Prahe, kde boli hladiny testosterónu v plazme stanovené metódou RIA. Prvé meranie sa uskutočnilo po ukončení série desiatich natáčaní a druhé v závere pokusu, po ukončení posledných behaviorálnych testov (25 týždňov od vloženia implantátov).

Interakcie samica - samec I

Po zistení, že hladiny testosterónu v plazme u T-samíc sú zvýšené, nedosahujú síce typické samčie hodnoty, ale blížia sa hodnotám, ktoré majú normálne samice v neskorej vitelogenéze, sme sa rozhodli otestovať interakciu T-samíc so samcami.

Samcov *E. macularius* s jasným genetickým pôvodom sme vybrali z nášho laboratórneho chovu. U všetkých sme overili, že sú sexuálne aktívni - reagovali na prezentovanú samicu typickou tail vibration. Keďže samcov bolo 9 a T-samíc 18, náhodným priradením sme vytvorili trojice - jeden samec a dve samice, jedna zo skupiny A a jedna zo skupiny C. Pred natáčaním sme stanovili poradie interakcií, tak aby sa žiaden samec nezúčastnil dvoch pokusov v jeden deň. Natáčanie teda prebiehalo počas dvoch po sebe nasledujúcich večerov a každý samec bol v interakcii so samicou zo skupiny A aj so samicou zo skupiny C, ale s každou v iný večer.

Jednotlivé testy prebiehali opäť v domácich teráriách fokálnych samíc, ktoré boli vložené do arény temperovanej na 30°C. Interakciu stimulujúceho samca s T-samicou sme natáčali 10 min. Pri analýze videí sme potom hodnotili u T-samíc typické samčie znaky –

marking, chasing, tail vibration a latencia do 1. tail vibration, body grip a mountin. U samíc sme hodnotili receptivitu a atraktivitu pre samcov. Samicu sme považovali za receptívnu, pokiaľ v prípade snahy samca o kopuláciu prejavila záujem zdvihnutím chvosta a teda sprístupnením kloaky (tail lift), alebo aspoň ostala stáť na mieste, samcovi sa nebránila a nepokúšala sa ujsť. Atraktivitu samíc sme hodnotili podľa snahy samcov o kopuláciu. Hlavným faktorom bola tail vibration.

Open-field I

Pre open-field testy sme mali pripravenú arénu veľkosti 60x40 cm (opäť temperovanú na 30°C), ktorú sme pred začiatkom každého testu vyčistili liehom a vystlali čerstvým pijavým papierom s narysovanou štvorcovou sieťou 10x10 cm. T-samice sme v pripravenom náhodnom poradí vkladali do arény a sledovali ich pohyblivosť v aréne pomocou metódy počítania štvorcov, do ktorých presunie hlavu. Počíta sa každý ďalší štvorec, v ktorom v predošlom momente nebola, tzn. jeden štvorec sa počas pokusu môže započítať aj niekoľkokrát.

Výber implantátov

Po ukončení behaviorálnych testov interakcia samica-samec I a open-field I sme si náhodne zvolili skupinu T-samíc, ktorej subkutánne T-implantáty vyberieme (skupina A). Pred operáciou bolo každé zviera 10-15 min schladené na ľade. T-implantát mu bol potom opatrne vyrezaný z podkožia či z väziva medzi lopatkami, prípadne vybraný z kožnej riasy v podpazuší. Ranu sme ošetrili tkanivovým lepidlom, nasledujúce 2 týždne sme zvieratá pravidelne kontrolovali a nechali ich zotavovať sa ešte ďalšie 3 týždne.

Interakcie samica-samec II a open-field II

Po piatich týždňoch od operácií, pri ktorých boli skupine A T-implantáty vybrané, sme pokračovali druhou sériou behaviorálnych testov. Open-field II testy prebiehali presne tak isto ako v prvej sérii. Štatisticky sme potom jednocestnou ANOVA metódou porovnali efekt skupiny pre open field I aj II. V druhej sérii testovania interakcií T-samíc a samcov sme postupovali veľmi podobne ako pri prvej sérii, s tým, že samcom boli priradené opäť tie isté dve samice - tentokrát jedna ešte s T-implantátom a druhá už 5 týždňov bez T-implantátu. Poradie interakcie s jednou aj s druhou bolo zvolené náhodne. Po ukončení všetkých behaviorálnych testov boli vybrané T-implantáty aj skupine C a všetkým T samiciam sme odobrali krv a zmerali hladinu testosterónu v plazme (35 týždňov od vloženia implantátov).

4.2. Výsledky

Kontrolné natáčanie, operácie a terminácie

Prvé kontrolné natáčanie prebehlo podľa predpokladov – nezaznamenali sme žiaden výskyt znakov typicky samčieho prekopulačného, či kopulačného chovania u žiadnej samice.

Všetky zvieratá určené k hormonálnej manipulácii (skupiny A a C) sa z operácií, pri ktorých im bol implantát vložený do podkožia zotavili a nevykazovali známky zvýšeného stresu. Po piatich týždňoch od operácií boli u všetkých potvrdené evertovateľné hemipenisy a zväčšené prekloakálne póry.

Samiciam zo skupiny B, ktorá bola terminovaná, sme potvrdili morfológicky rozlíšiteľné samičie gonády a teda samičie pohlavie.

Behaviorálne testy – interakcie samica – samica

Počas kontrolného a rovnako ani počas prvého natáčania po manipulácii sme u pokusných samíc nezaznamenali žiadne známky maskulinizovaného chovania. Pri v poradí treťom natáčaní sa u troch pokusných samíc objavila tail vibration. Prehľad samíc, ktoré počas jednotlivých natáčaní vykazovali tento typicky samčí behaviorálny znak je možné vidieť v Tabuľke 3. Podrobnejšie záznamy z natáčaní, včítane latencie do prvej tail vibration a počtu tail vibrations pokusnej samice v rámci jednej interakcie, sú v prílohách.

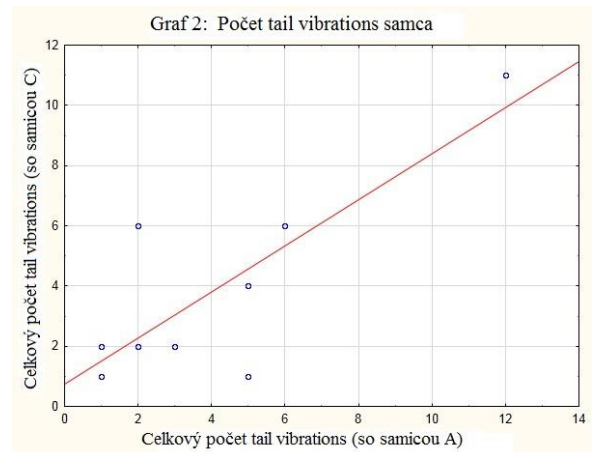
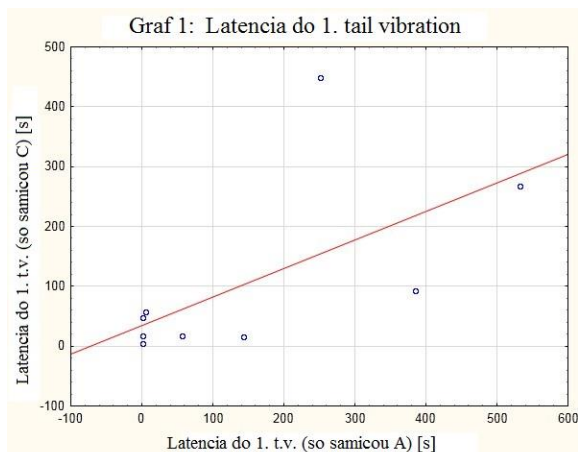
Tabuľka 3: Výskyt tail vibration u jednotlivých samíc počas jednotlivých natáčaní a celkový počet behaviorálnych testov, v ktorých sa u danej samice tail vibration objavila

Natáčanie č.	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ
Kód samice									
EMT 29									0
EMT 17									0
EMT 27	•	•	•	•		•	•	•	7
EMT 15		•							1
EMT 23									0
EMT 26									0
EMT 11	•	•	•	•		•	•		6
EMT 8				•		•			2
EMT 34	•			•	•	•		•	5
EMT 16						•			1
EMT 21									0
EMT 19							•		1
EMT 30				•					1
EMT 28				•	•	•			3
EMT 20							•	•	2
EMT 2							•		1
EMT 9									0

Ďalšie tri typicky samčie behaviorálne prejavy sme do ďalších analýz nezahrnuli. Pachové značenie scent-marking nebolo s úplnou určitosťou potvrditeľné. Kopulačné samčie chovanie (body grip a mounting) nebolo pozorované v žiadnej z interakcií. Z analýz sme museli vylúčiť aj jednu samicu zo skupiny C, pretože v priebehu behaviorálnych testov stratila T-implantát.

Interakcie samica-samec

Analýza videí z natáčaní interakcií T-samica – samec II ukázala, že latencia do 1. tail vibration bola signifikantne nižšia (Spearmanova korelace, $p = 0,71$) a počet tail vibrations u samca bol signifikantne vyšší (Spearmanova korelace, $p = 0,70$) u skupiny C (T-implantát), než u skupiny A (T-implantát v dobe natáčania už 5 týždňov vybratý). Výsledky sú zobrazené na grafoch 1 a 2.



Open field

Testy open field I neukázali signifikantný rozdiel v pohyblivosti samíc v novom prostredí medzi skupinou A a C v čase, keď mali všetky samice T-implantáty ($F = 0,057$, $p = 0,815$). Rozdiel v počte prejdencých štvorcov medzi skupinami nebol signifikantný ani pri druhej sérii testov, kde samice skupiny A mali už T-implantáty 5 týždňov vybraté ($F = 0,023$, $p = 0,882$).

4.3. Diskusia

Naše výsledky potvrdili významný vplyv testosterónu na chovanie samíc u gekončika *Eublepharis macularius*. Dokázali sme, že jeho zvýšené hladiny maskulinizujú samičie chovanie a spúšťajú niektoré typicky samčie prejavy.

Metódou implantácie subkutánných T-implantátov sa nám síce nepodarilo u samíc dosiahnuť rovnaké hladiny testosterónu, aké majú samce, ale podarilo sa nám navodiť tail vibration, ktorá je prejavom samčieho prekopulačného chovania a u nemanipulovaných samíc nikdy pozorovaná nebola. Hormonálna manipulácia tiež vyvolala samčie morfológické znaky – zväčšenie a evertabilitu hemipenisov a zvýraznenie prekloakálnych pórov. Subkutánná implantácia T-implantátov bola už použitá u gekončika *Eublepharis macularius* napríklad v práci Holmes a kol. (2005), kde jej použitím tiež vyvolali samčie morfológické znaky u samíc, ale nevenovali sa už štúdiu dlhodobého efektu testosterónu a jeho vplyvu na samičie chovanie.

Úskalím tejto metódy hormonálnej manipulácie je nerovnomerné vyplavovanie testosterónu z implantátov, ktoré sa odrazilo aj v kolísajúcich hladinách hormónov v priebehu pokusu (tabuľka s nameranými hladinami testosterónu je súčasťou príloh). Pri častejšie

používanej metóde vkladania hormonálnych implantátov do brušnej dutiny je vyplavovanie rovnomernejšie pravdepodobne z jednoduchého dôvodu: implantát je obmývaný telovými tekutinami (táto metóda bola úspešne použitá napríklad v prácach Rhen a kol. 1999, Golinski a kol. 2011). My sme si metódu subkutánnej implantácie zvolili hlavne z hľadiska nižšej invazívnosti pre pokusné zvieratá a zároveň kvôli plánovanému designu pokusu: aby mohli byť implantáty aj po dlhšej dobe ľahko vyoperovateľné a my sme mohli ďalej testovať postupné vyhasínanie efektu dlhodobého vplyvu testosterónu. Pri subkutánnej implantácii však implantát vo väčšine prípadov vrastie do väziva a tak môže byť uvoľňovanie testosterónu pomalšie a menej plynulé. Prejavilo sa to aj pri nábehu a vyhasínaní maskulinného chovania samíc. Tail vibration sa u niektorých prejavila už pár týždňov od vloženia implantátu a u niektorých až po niekoľkých mesiacoch. Takisto sa jednotlivé samice líšili v dĺžke obdobia, počas ktorého v interakciách s nemanipulovanými samicami prejavovali maskulinizované chovanie.

Ďalšie typicky samčie behaviorálne znaky ako marking, body grip a mounting sme sa do výsledných analýz nakoniec rozhodli nezahrnúť. Body grip a mounting sú prejavy, ktoré priamo predchádzajú kopulácii a k tej v interakciách medzi T-samicami a ich stimulmi nedošlo ani v jednom prípade. Chovanie podobné markingu bolo niekoľkokrát pozorované, ale v tomto prípade hral u mladších samíc zrejme úlohu stres z neznámej staršej samice a tak pohyby neboli úplné a chovanie nebolo jednoznačne preukázateľné.

Okrem maskulinizačných účinkov, hrá testosterón významnú rolu aj v samičej vitelogenéze. Podľa našich výsledkov u samíc zvyšuje atraktivitu. Na samice s T-implantátmi reagovali samci vyšším počtom tail vibrations, než na samice, ktoré ich už mali vyoperované, a zároveň latencia do prvej tail vibration bola nižšia. Na druhej strane je ale neskorá vitelogenéza obdobia, kedy sú samice najviac receptívne (Rhen a kol. 2000). Samice s dlhodobo zvýšenými hladinami testosterónu však pri našom pokuse receptívne neboli ani v jednom prípade a to ani po odobratí T-implantátu. Vplyvu zvýšených hladín testosterónu na chovanie samíc *Eublepharis macularius* sa venovalo množstvo štúdií. Rhen a kol. (2000) testovali rôzne vysoké koncentrácie testosterónu v T-implantátoch vložených do brušnej dutiny po rôzne dlhé obdobia (krátke 8 dní a dlhé 35 dní). Naše výsledky korešpondujú s ich zistením, že nízke a stredne vysoké koncentrácie testosterónu pri krátkodobej aplikácii vyvolali u samíc receptivitu, ale pri dlhodobej už nie. Zistili tiež, že stredne vysoké a vysoké hladiny, mali bez ohľadu na dĺžku manipulácie, negatívny vplyv na atraktivitu samíc. Naše výsledky naopak poukazujú na vysokú atraktivitu T-samíc. Avšak pri porovnaní hladín testosterónu u samíc z nášho pokusu s tromi skupinami samíc z ich pokusu (nízka, stredná

a vysoká hladina T v plazme), hladiny našich samíc by boli niekde v rozmedzí medzi nízkymi a strednými hladinami.

5. Záver

Cieľom našej práce bolo preskúmať účinky steroidných hormónov na pohlavne dimorfné znaky u dvoch blízko príbuzných druhov gekončikov z čeľade Eublepharidae. U gekončika mexického (*Coleonyx elegans*), druhu s genotypickým určením pohlavia, sme sa zamerali na reverziu pohlavia prostredníctvom hormonálnej manipulácie v rannej embryogenéze. Z dôvodu vysokej mortality manipulovaných jedincov sa síce nepodarilo uskutočniť všetky ciele, ktoré sme si stanovili, avšak vieme už, na ktoré úskalí sa je nutné pri hormonálnych manipuláciách dávať pozor.

V druhej časti našej práce sme skúmali dlhodobý efekt testosterónu na morfológický a behaviorálny fenotyp samíc gekončika nočného *Eublepharis macularius*. Podarilo sa nám u nich vyvolať typické samčie pohlavne dimorfné znaky a maskulinizovať aj ich chovanie. V interakciách s ďalšími samicami sa u samíc s testosterónovými implantátmi objavuje samčie prekopulačné chovanie, ale k úplnému zvratu chovania na samčie nedôjde – samice sa nikdy s ďalšími samicami nepokúšali kopulovať. Na druhej strane, v interakcii so samcom sú takto manipulované samice pre samcov veľmi atraktívne, ale nie sú receptívne a ani v tomto prípade teda ku kopulácii nedochádza. Naše výsledky poukazujú na fakt, že testosterón má schopnosť aktivovať u samíc samčie sexuálne chovanie a vyvolať samčie pohlavné znaky, ktoré však pri opätovnom poklese hladín testosterónu vyhasínajú a zanikajú.

Keďže sú oba druhy blízko príbuzné s úplne odlišným systémom determinácie pohlavia, tak tieto výsledky môžu poslúžiť pri ďalšom štúdiu evolučných mechanizmov ako diferenciácie a determinácie pohlavia, tak i pohlavného dimorfizmu.

Referencie

- Arnold AP (2004) Sex chromosomes and brain gender. *Nat Rev Neurosci* 5(9):701-8.
- Ayers KL, Sinclair AH, Smith CA (2013) The molecular genetics of ovarian differentiation in the avian model. *Sex Dev* 7(1-3):80-94.
- Bowden RM, Ewert MA, Nelson CE (2000) Environmental sex determination in a reptile varies seasonally and with yolk hormones. *Proc Biol Sci* 267(1454):1745-9.
- Camus MF, Clancy DJ, Dowling DK (2012) Mitochondria, maternal inheritance and male aging. *Curr Biol* 22(18):1717-21.
- Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20(3):358-417.
- Dufty AM, Clobert J, Møller AP (2002) Hormones, developmental plasticity and adaptation. *Trends Ecol Evol* 17(4):190-196.
- Elf PK (2003) Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. *Gen Comp Endocrinol* 132(3):349-55.
- Ezaz T, Quinn AE, Miura I, Sarre SD, Georges A, Marshall Graves JA (2005) The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Res* 13(8): 763-7.
- Flores DL, Crews D (1995) Effect of hormonal manipulation on sociosexual behavior in adult female leopard geckos (*Eublepharis macularius*), a species with temperature-dependent sex determination. *Horm Behav* 29(4):458-73.
- Flores D, Tousignant A, Crews D (1994) Incubation temperature affects the behavior of adult leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Physiol Behav* 55(6):1067-72.
- Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ (1999) Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 286(5442):1155-8.

- Georges A, Ezaz T, Quinn AE, Sarre SD (2010) Are reptiles predisposed to temperature-dependent sex determination? *Sex Dev* 4(1-2):7-15.
- Giles S, Boehm P, Brogan C, Bannigan J (2008) The effects of ethanol on CNS development in the chick embryo, *Reproductive Toxicology*, Volume 25, Issue 2, February 2008, Pages 224-230
- Golinski A, John-Alder H, Kratochvíl L (2011) Male sexual behavior does not require elevated testosterone in a lizard (*Coleonyx elegans*, Eublepharidae). *Horm Behav* 59(1):144-50.
- Grisham W, Lee J, McCormic ME, et al. (2002), Antiandrogen blocks estrogen-induced masculinization of the song system in female zebra finches. *Journal of neurobiology* 51 (1) p. 1-8
- Hill RA, Boon WC (2009) Estrogens, brain, and behavior: lessons from knockout mouse models. *Semin Reprod Med*27(3):218-28.
- Holmes, M. M., Putz, O., Crews, D., & Wade, J. (2005). Normally occurring intersexuality and testosterone induced plasticity in the copulatory system of adult leopard geckos. *Hormones and behavior*, 47(4), 439–45.
- Kratochvíl L (2006) Captive breeding and a threatened gecko. *Science* 313(5789):915.
- Kratochvíl, L., Kubicka, L., & Landová, E. (2008). Does the mechanism of sex determination constrain the potential for sex manipulation? A test in geckos with contrasting sex-determining systems. *Die Naturwissenschaften*, 95(3), 209–15. doi:10.1007/s00114-007-0317-0
- La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A (2006) Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 21(12):3103-7.

- Montagutelli X, Turner R, [Nadeau JH](#) (1996) Epistatic control of non-Mendelian inheritance in mouse interspecific crosses. *Genetics* 143(4):1739-52.
- Perry GM, Ferguson MM, Danzmann RG (2003) Effects of genetic sex and genomic background on epistasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genetica* 119(1):35-50.
- Pieau C, Dorizzi M (2004) Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *J Endocrinol* 181(3):367-77.
- Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N (1999) Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol Life Sci* 55(6-7):887-900.
- Piersma T, Drent J (2003) Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends Ecol Evol* 18(5):228-233.
- Pokorná M, Kratochvíl L (2009) Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zool J Linnean Soc* 156(1):168–183.
- Pokorná M, Rábová M, Ráb P, Ferguson-Smith M, Rens W, Kratochvíl L (2010) Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination. *Chromosome Res*, 18(7):809–20
- Radder RS, Quinn AE, Georges A, Sarre SD, Shine R (2008) Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. *Biol Lett* 4(2):176-8.
- Radder R, Ali S, Shine R (2007) Offspring sex is not related to maternal allocation of yolk steroids in the lizard *Bassiana duperreyi* (Scincidae), *PBZ* 80(2):220-7.
- Rhen T (2007) *Sex, size and gender roles*. New York: Oxford University Press 1.vydanie. 167-175 ISBN 978-0-19-920878-4.

- Rhen, T., Ross, J., & Crews, D. (1999). Effects of testosterone on sexual behavior and morphology in adult female leopard geckos, *Eublepharis macularius*. *Hormones and behavior*, 36(2), 119–28.
- Rhen, T., & Crews, D. (2000). Organization and activation of sexual and agonistic behavior in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Neuroendocrinology*, 71(4), 252–61.
- Rhen T, Crews D, Fivizzani A, Elf P (2006) Reproductive tradeoffs and yolk steroids in female leopard geckos, *Eublepharis macularius*. *J Evol Biol* 19(6):1819-29.
- Sarre SD, Georges A, Quinn A (2004) The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Bioessays* 26(6):639-45.
- Selim KM, Shinomiya A, Otake H, Hamaguchi S, Mitsuru S (2009) Effects of high temperature on sex differentiation and germ cell population in medaka, *Oryzias latipes*. *Aquaculture* 289(3-4):340-9.
- Shine R (2002) Reconstructing an adaptationist scenario: what selective forces favor the evolution of viviparity in montane reptiles? *Am Nat* 160(5):582-93.
- Shine R, Warner DA, Radder R (2007) Windows of embryonic sexual lability in two lizard species with environmental sex determination. *Ecology* 88(7):1781-8.
- Simpson HB, Vicario DS (1991) Early estrogen treatment of zebra finches masculinizes the brain pathway for learned vocalizations. *J Neurobiol.* 1991 Oct;22(7):777-93
- Trivers RL, Willard DE (1973) Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science* 179(4068):90-2.
- Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ (2003) Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? *Am Nat* 161(4):676-83.

Viets BE, Tousignant A, Ewert MA, Nelson CE, Crews D (1993) Temperature-dependent sex determination in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J Exp Zool* 265(6):679-83.

Wallis MC, Waters PD, Graves JA (2008) Sex determination in mammals-before and after the evolution of SRY. *Cell Mol Life Sci* 65(20):3182-95.

Warner D, Lovern MB, Shine R (2008) Maternal influences on offspring phenotypes and sex ratios in a multi-clutching lizard with environmental sex determination. *Biol J Linnean Soc* 95(2):256–266.

Wolff JN, Gemmell NJ (2013) Mitochondria, maternal inheritance, and asymmetric fitness: why males die younger. *Bioessays* 35(2):93-9.

Sekundárne citácie:

Arnold AP, Breedlove SM (1985) Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Horm Behav* 19(4):469-98.

Zoznam použitých skratiek a cudzích výrazov:

AMH	Anti-mullerian hormone
HRE	Hormone response elements
ERKO	Estrogen receptor knock-out
ArKO	Aromatase knock-out
GSD	Genotypické určenie pohlavia
ESD	Enviromentálne určenie pohlavia
TSD	Teplotné určenie pohlavia
SVL	Snout-to-vent length (dĺžka od špičky tlamy po bázu chvosta)
T	Testosterón
T-implantát	Testosterónový implantát
T-samica	Samica s testosterónovým implantátom
E2	Estradiol
Tail vibration	vibrácia koncovými stavcami chvosta samca
Marking	pachové značenie prekloakálnymi pórmami
Mounting	samec pred kopuláciou vylezie samici na chrbát
Body grip	samec sa samici zahryzne do záhlavnej časti
Knockoutovaný gén	vyradený, nefunkčný gén
FAS	Fatal alcohol syndrome