

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie

Zaměření: Terestrická ekologie



Tereza Schořálková

Hormonální kontrola samčích znaků u gekončíka nočního,
Eublepharis macularius

Hormonal control of male traits in leopard gecko, *Eublepharis macularius*

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Lukáš Kubička, 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, 13.8.2013

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat školiteli doc. Mgr. Lukáši Kratochvílovi Ph.D. a konzultantovi Mgr. Lukáši Kubičkovi Ph.D. za jejich trpělivost a dobré rady při psaní této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě vždycky podporovala v mém snažení.

Abstrakt

Obecně se věří, že přítomnost samčích znaků je regulována androgeny. Tato práce je zaměřená na odhalení vlivu testosteronu na samčí znaky u gekončíka nočního, *Eublepharis macularius*. K manipulaci s hormonálním stavem již dříve kastrovaných samců a intaktních samic byla použita neinvazivní metoda kožní aplikace směsi rostlinného oleje a testosteronu. Tato metoda se ukázala být efektivní variantou k hojně používaným hormonálním implantátům. Manipulace byla úspěšná, u obou skupin byl patrný nástup samčího sexuálního chování. U samic trval tento nástup déle, ale obě skupiny byly schopné předvést všechny součásti tohoto chování. Dále se podařilo zjistit, že v rozporu s rozšířeným předpokladem samčí sexuální chování přetrvává u obou manipulovaných skupin ještě několik týdnů po snížení hladin testosteronu. Tyto výsledky přinášejí další důkazy o možném mechanismu dočasné organizace samčího sexuálního chování testosteronem.

Klíčová slova:

Eublepharis macularius, sexuální chování, testosteron, hormonální manipulace, hypotéza aktivace a organizace

Abstract

It is generally believed that the presence of male traits is regulated by androgens. This thesis is designed to reveal the influence of testosterone on male traits in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. The noninvasive skin application mixture of vegetable oil and testosterone was used to manipulate the hormonal status of females and castrated males. This method has proven to be an effective alternative to the widely used hormonal implants. Manipulation was successfully validated, and there was apparent progressive increase of male sexual behavior in both groups. In females, the onset lasted much longer time, but both groups were able to perform all components of males sexual behaviour. Furthermore, I found that, contrary to widespread view, male sexual behavior persisted several weeks after reduction of testosterone levels in both manipulated groups. These results bring new evidence for temporary organization of male sexual behaviour by testosterone.

Key words:

Eublepharis macularius, sexual behavior, testosterone, hormonal manipulation, hypothesis of activation and organization

OBSAH

1. ÚVOD	8
1.1. REPRODUKČNÍ STRATEGIE OBRATLOVCŮ	8
1.2. HYPOTÉZA ORGANIZAČNÍHO A AKTIVAČNÍHO ÚČINKU HORMONŮ.....	10
1.2.1. <i>Organizace</i>	10
1.2.2. <i>Aktivace</i>	11
1.2.3. <i>Příklady a výjimky</i>	13
1.2.4. <i>Koncept dočasné organizace hormony</i>	14
1.3. OBECNÉ INFORMACE O ZKOUMANÉM DRUHU	15
2. METODIKA	20
2.1. ROZPOUŠTĚNÍ HORMONŮ V ROSTLINNÉM OLEJI	20
2.2. PILOTNÍ POKUS.....	20
2.3. HLAVNÍ EXPERIMENT	21
2.3.1. <i>Testování jedinci</i>	21
2.3.2. <i>Samice sloužící jako stimul</i>	23
2.3.3. <i>Metoda rozpouštění testosteronu v oleji</i>	23
2.3.3.1. Příprava směsi	23
2.3.3.2. Aplikace směsi	24
2.3.3.3. Odběry krve a měření hladin testosteronu.....	25
2.3.4. <i>Behaviorální testování</i>	26
2.3.5. <i>Vyhodnocování sexuálních interakcí</i>	28
3. VÝSLEDKY	29
3.1. VÝSLEDKY PILOTNÍHO EXPERIMENTU	29
3.2. VÝSLEDKY HLAVNÍHO EXPERIMENTU	30
3.2.1. <i>Hladiny testosteronu během experimentu</i>	30
3.2.2. <i>Vyhodnocení behaviorálních testů</i>	34
3.2.2.1. Výskyt samčího sexuálního chování.....	34
3.2.2.2. Podíl jedinců předvádějící konkrétní znak samčího sexuálního chování v závislosti na natáčecí události	36
3.2.2.3. Průběh nástupu a vyhasínání samčího sexuálního chování	46
4. DISKUZE	52
4.1. VLIV MANIPULACE NA HLADINY TESTOSTERONU V KRVÍ	52
4.2. VLIV MANIPULACE NA SAMČÍ ZNAKY	53
4.2.1. <i>Rozsah vyvolaných změn v morfologii a chování</i>	53
4.2.2. <i>Průběh nástupu a vyhasínání samčího sexuálního chování</i>	53
4.3. DŮSLEDKY DESIGNU EXPERIMENTŮ.....	56
4.4. EVOLUCE HORMONÁLNÍ KONTROLY SEXUÁLNÍHO CHOVÁNÍ.....	57
5. ZÁVĚR	59
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60

1. ÚVOD

Podle obecného předpokladu jsou významné pohlavně dimorfní znaky, jako je typické chování a morfologie, regulovány pohlavními hormony. Zatímco samčí znaky jsou převážně pod kontrolou androgenů, typické samičí znaky jsou regulovány progestiny a estrogeny. Avšak složité hormonální kaskády přinášejí do tohoto problému další nejasnosti. Přesto u mnoha druhů obratlovců bylo již dokázáno, že aromatizací testosteronu vzniklý estradiol je nezbytný pro expresi celého repertoáru samčího reprodukčního chování (takzvaná aromatizační hypotéza) (Callard a kol. 1978a, 1978b). V poslední době se objevují práce, podle kterých je nečekaně i progesteron důležitý pro samčí rozmnožování, ačkoliv jeho účinky byly obvykle považovány za antiandrogenní (Andersen a Tufik 2006). Existuje tedy ještě mnoho fenoménů, které nebyly zatím úspěšně objasněny. Plazi jsou značně variabilní skupinou, co se týče morfologie i repertoáru chování a proto nabízejí velké množství možností, jak tuto problematiku studovat.

Cílem této diplomové práce je objasnit, jak pohlavní hormon testosteron působí na jednotlivé prvky samčího sexuálního chování a zda jeho působení lépe odpovídá konceptu dočasné organizace, nebo klasickým konceptům organizace a aktivace. K tomuto objasnění jsem použila hormonální manipulace u samic a kastrovaných samců gekončika nočního, *Eublepharis macularius* doprovázené behaviorálním testováním. Zaměřila jsem se na to, které znaky jsou touto manipulací ovlivněny, jaký je průběh a jak dlouho vydrží tento vliv po ukončení aplikace exogenního testosteronu.

1.1. Reprodukční strategie obratlovců

Na základě vztahů mezi aktivitou pohlavních orgánů a reprodukčním chováním byly navrženy tři základní skupiny reprodukčních strategií (Crews 1984; Woolley a kol. 2004). Nejdůležitějším kritériem je načasování produkce pohlavních hormonů a pohlavních buněk:

1) *asociovaná reprodukční strategie*: Do této kategorie pravděpodobně můžeme zařadit většinu prozkoumaných obratlovců, druhům řazeným do této skupiny se říká „*associated breeders*“. Jejich sexuální chování je u samců spojené se zvýšenými

hladinami androgenů a/nebo se spermatogenezí. Do této skupiny byly druhy zařazeny především na základě výsledků vyplývajících z pozorování reprodukčního chování během roku a sledováním hladin pohlavních hormonů. Je však zapotřebí hormonálních manipulací, jako je kastrace a/nebo hormonální implantáty, aby se potvrdila přímá spojitost mezi sexuálním chováním a sekrecí pohlavních hormonů.

Z ještěřů byly do této skupiny řazeny následující druhy: *Anolis carolinensis* (Crews a kol. 1978; Mason a Adkins 1976; Noble a Greenberg 1941), *Anolis sagrei* (Tokarz 1986), *Eublepharis macularius* (Flores a Crews 1995; Rhen a Crews 1999), *Eumeces laticeps* (Cooper a kol. 1987), *Paroedura picta* (Golinski a kol. 2011a), *Sceloporus jarrovi* (Moore 1987), *Uta stansburiana* (Ferguson 1966). U těchto druhů byly provedeny manipulační experimenty, které ukázaly přímý vliv hormonů na samčí reprodukční chování (po kastraci došlo k vymizení tohoto chování a po navýšení androgenů bylo obnoveno).

2) *disociovaná reprodukční strategie*: samčí reprodukční chování není spojené se sekrecí gonadálních hormonů ani se spermatogenezí. Je typické pro druhy žijící v pravidelně měnících se podmínkách. Tato strategie není dosud plně prozkoumána a řadí se sem poměrně málo druhů, označují se pak jako „*dissociated breeders*“. Z plazů se standardně do této skupiny řadí užovka *Thamnophis sirtalis parietalis* (Camazine a kol. 1980; Crews a kol. 1984; Crews 1991; shrnuto Krohmer 2004).

3) *konstantní neboli oportunistická reprodukční strategie*: plně vyvinuté gonády uchovávají po většinu roku zralé gamety až do vhodného okamžiku pro rozmnožování. Řadí se sem jen velmi málo druhů, které přežívají ve velmi proměnlivých extrémních podmínkách.

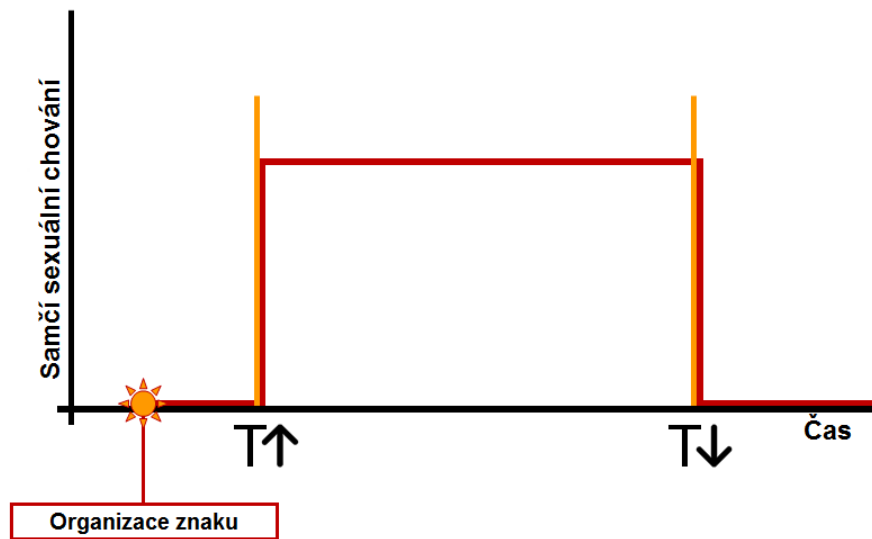
Brzy se ukázalo, že toto rozdělení není dostačující, protože existují druhy, které se do žádné z navrhovaných skupin nedají zařadit. Crews (1984) navrhl, že sexuální chování a aktivita pohlavních orgánů nemusí být nezbytně nutně funkčně propojené. Nezávislost sexuálního chování a pohlavních hormonů by mohla být u obratlovců běžnějším fenoménem, než se obecně myslí. V extrémním případě by běžně pozorovatelné souvislosti mohly být výsledkem konvergentního vývoje.

1.2. Hypotéza organizačního a aktivačního účinku hormonů

Mnoho pohlavně dimorfních znaků týkajících se morfologie, chování a fyziologie je regulováno pomocí pohlavních hormonů. Podle hypotézy organizace-aktivace existují dva základní způsoby, kterými pohlavní hormony tyto znaky ovlivňují. Jedná se o organizační a aktivační efekty steroidních hormonů (Phoenix a kol. 1959; shrnuto Arnold a Breedlove 1985). Není to tak dávno, co se zjistilo, že steroidní hormony mohou ovlivňovat počet neuronů v centrální nervové soustavě. Je několik možností, jak toho dosáhnou. Mohou ovlivnit proliferaci a vymírání specifických neuronů, případně mohou pozměnit jejich diferenciaci. Hormony dále mohou regulovat růst, velikost, tvar a migraci neuronů, množství receptorů a počet buněk akumulujících hormony (shrnutí Arnold a Breedlove 1985).

1.2.1. Organizace

Práce, která upozornila na rozdílné způsoby, jak pohlavní hormony mohou ovlivňovat jedince, pochází z 50. let (Phoenix a kol. 1959). V tomto experimentu autoři aplikovali injekce testosteron propionátu gravidním samicím morčete a pozorovali, že tím trvale maskulinizovali morfologii a následné sexuální chování narozených samiček. Injekce po narození a v dospělosti takový účinek neměly. Phoenix a kol. (1959) na základě těchto výsledků vyslovili myšlenku, že v raném ontogenetickém vývoji musí existovat senzitivní perioda, během níž hormony dlouhodobě ovlivňují morfologii a budoucí chování jedince. Pokud senzitivní perioda pomine, není už možné docílit stejného efektu, ani chování v budoucnu aktivovat (Obr. 1). K ovlivnění základních znaků dochází pravděpodobně prostřednictvím strukturních změn v mozku, modifikacemi metabolismu steroidních hormonů, či díky změnám v citlivosti neuronů vůči steroidním hormonům. Vystavení androgenům během senzitivního období v raných ontogenetických fázích způsobí maskulinizaci nervových drah jak u samečů, tak u samic a ovlivní základní znaky, jimiž se jedinci opačného pohlaví odlišují. Organizační efekt je dlouhodobý a nemůže být později pozměněn dalším vystavením pohlavním hormonům.



Obr. 1 Schéma organizace. Znak může být aktivován, pouze pokud je předtím organizován v senzitivním období během rané ontogeneze.

Původní definice týkající se organizační funkce hormonů (Arnold a Breedlove 1985; Phoenix a kol. 1959):

→ efekt hormonů je dlouhodobý/trvalý

→ hormony působí organizačně v prenatální období nebo krátce z počátku postnatálního období

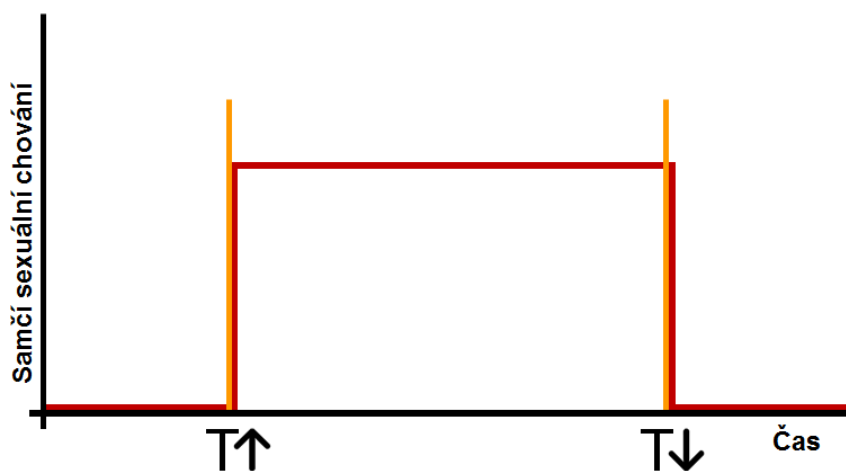
→ organizační efekt může vzniknout jen během kritické/senzitivní periody. Když tato perioda pomine, hormony už nemohou způsobit trvalý efekt (Obr. 1). Zřejmě je to díky tomu, že s věkem centrální nervová soustava poněkud ztrácí plasticitu a schopnost odpovídat re-organizací příslušných struktur

→ působení hormonů v rané fázi vývoje má za následek strukturální změny v mozku nebo další dlouhodobé změny, jako je modifikace metabolismu steroidů nebo citlivost neuronů na steroidy

1.2.2. Aktivace

S organizačním působením hormonů je už od počátku spojena hypotéza aktivačního efektu hormonů. Phoenix a kol. (1959) zjistili, že stejné dávky testosteron

propionátu aplikované v dospělosti působí rozdílně na jedince, kteří už dostali jednu dávku prenatalně a na jedince, kteří žádnou dávku nedostali. Autoři se domnívali, že je nutná organizace v brzkém ontogenetickém stádiu, aby v dospělosti mohlo dojít k expresi daného chování pomocí aktivace hormonů. Platí, že chování v dospělosti je většinou přímo ovlivňováno přítomností specifických hormonů. Tyto hormony působí na příslušné receptory v konkrétních tkáních a spouští expresi samčího či samičího chování či fyziologie. Tento efekt je dočasný, uplatňující se pouze v přítomnosti zvýšených hladin příslušných hormonů. Většinou bývá spojen s předchozí organizací, ale pokud nebyly odpovídající dráhy v minulosti organizovány, tak může být chování aktivováno i nezávisle na pohlaví, protože dráhy mohou být do jisté míry plastické. Pro aktivační efekt steroidních hormonů je typické, že po odstranění zdroje hormonů chování vyhasíná a opět se objevuje až při zvýšených hladinách (Obr. 2).



Obr. 2 Schéma aktivace. Znak je aktivován zvýšenou hladinou hormonu a vymizí krátce po jejím poklesu.

Základní definice aktivačního vlivu hormonů (Arnold a Breedlove 1985):

→ aktivace má přechodnou dobu trvání, znaky a změny citlivé na hormony jsou exprimovány dospělci jen po dobu, dokud jsou tyto hormony přítomné; když se jejich hladiny sníží, znaky vymizí (Obr. 2)

- efekt nastává později v ontogenezi, nejčastěji až v dospělosti
- aktivační působení nemá časové nebo vývojové omezení
- zahrnuje mírnější vratné změny v předem vytvořených drahách. Možná se bude jednat o dočasné změny v produkci neurotransmiterů

1.2.3. Příklady a výjimky

Příkladem organizace chování během embryonálního vývoje a následné aktivace tohoto chování v dospělosti by mohla být atraktivita a receptivita samic gekončíka nočního, *Eublepharis macularius*. Po odstranění gonád jedincům obou pohlaví lze toto chování obnovit pomocí estrogenů jen u samic, u samců ho spustit nelze (Rhen a Crews 2000). Na základě těchto výsledků přišli autoři s hypotézou, že samci nemají toto samičí chování naorganizováno, proto nemůže být v dospělosti ani aktivováno.

Za příklad aktivace sexuálního chování by mohlo být považováno podání testosteronového implantátu dospělým samicím gekončíka *Eublepharis macularius*, který způsobí, že samice předvádějí typicky samčí dvoření vůči samičímu stimulu (Flores a Crews 1995; Rhen a Crews 1999). Po odstranění implantátu dojde během několika dnů k vymizení samčích znaků a samice jsou později schopné vlastní reprodukce a produkují potomky srovnatelné s potomky nemanipulovaných samic (Rhen a kol. 1999). U kastrovaných samců byl patrný významný pokles dvoření, který se dal zvrátit pomocí exogenního testosteronu (Rhen a Crews 1999). Na základě těchto výsledků přišli autoři s hypotézou, že některé znaky samčího sexuálního chování mohou být u obou pohlaví gekončíka nočního aktivovány dodanými hormony.

Od doby navržení hypotézy organizace-aktivace byla tato dichotomie zkoumána u různých skupin obratlovců. Ukázalo se, že rozdělení na aktivaci a organizaci nemusí být tak jednoznačné a mnoho sexuálně dimorfních vlastností vyžaduje organizaci nebo aktivaci, ale ne nutně oboje (Moore 1991).

Výjimky z definice aktivace a organizace (shrnutí Arnold a Breedlove 1985):

- steroidní hormony mohou způsobit významné morfologické změny i v dospělém mozku a tyto změny mohou být i trvalé
- senzitivní perioda, během které se vytváří trvalý efekt, může pokračovat i mimo neonatální období

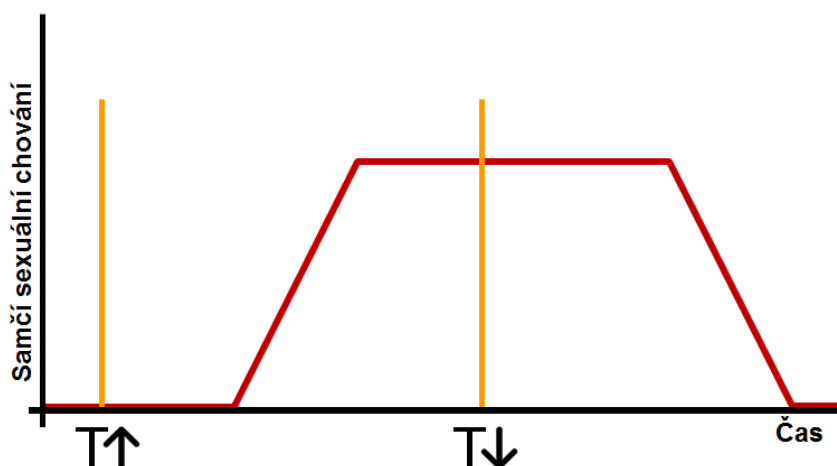
→ steroidní hormony mají dlouhodobé vratné efekty na chování v dospělosti

1.2.4. Koncept dočasné organizace hormonů

Při experimentální manipulaci s hormonálním stavem gekončika *Coleonyx elegans* bylo zjištěno, že se samci tohoto druhu pokoušeli pářit se samicemi i po deseti týdnech od kastrace (Golinski a kol. 2011b). V této době měli velmi nízké hladiny testosteronu, což by svědčilo pro to, že toto chování není aktivováno testosteronem. Ovšem u samic testosteronové implantáty samčí sexuální chování vyvolaly. U tohoto druhu gekončika v evoluci vymizelo samčí dvoření se samicí (vibrace ocasem) a mezi jeho sexuální chování patří „body grip“ a kopulace (podrobněji v kapitole 1.3. „Obecné informace o zkoumaném druhu“). Proto autoři navrhují, že by jednotlivé fáze sexuálního chování mohly být regulovány odlišně. V extrémním případě by dvoření mohlo být pod kontrolou pohlavních hormonů a páření na androgenech nezávislé.

Dalším vysvětlením by mohlo být, že je zde přítomný další typ regulace sexuálního chování pohlavními hormony. Mohlo by se jednat o takzvanou dočasnou organizaci, která by měla déle trvající účinek na určité tkáně. Přechodné hormonální působení v dospělosti by mělo za následek delší přetrvání sexuálního chování po snížení hladin testosteronu, než je typické pro aktivační efekt (Obr. 3). Tomuto konceptu by odpovídala například regulace sexuálního chování u užovky *Thamnophis sirtalis parietalis*, jež se řadí mezi „dissociated breeders“ (viz kapitola 1.1. „Reprodukční strategie obratlovců“). U tohoto druhu je samčí reprodukční chování podle všeho nezávislé na aktuálních hodnotách androgenů, ale důležité je zvýšení hodnot androgenů před hibernací, kdy dochází ke spermatogenezi (Camazine a kol. 1980; Crews a kol. 1984; Crews 1991). Je možné, že díky tomuto zvýšení dochází k nějakému typu organizace, která se projeví na jaře v období páření. Délka tohoto přetrvání sexuálního chování bez přítomnosti androgenů by teoreticky mohla být charakteristická pro každý druh, v závislosti na tom, jaké prostředí jedinci obývají, nebo jakou mají jejich populace sociální strukturu. Existuje také možnost, že tento typ regulace sexuálního chování je rozšířenější, než by se mohlo zdát, protože přetrvávání samčího sexuálního chování po odstranění gonád bylo pozorováno u různých taxonů (shrnuto např. Golinski a kol. 2011b). Mohlo by se jednat o preadaptaci pro vývoj disociované reprodukční strategie. To, že do dnešní doby nebyl tento fenomén prozkoumán, by mohlo být zapříčiněno používaným designem experimentů. Efekty

aktivace a dočasné organizace se v některých aspektech mohou shodovat, hormony u obou typů spouští sexuální chování a liší se až ve fázi, kdy jsou hladiny hormonů nízké. Ne všechny experimenty mohly rozdíly díky své metodice zachytit, důležité je sledovat nástup a vyhasínání sexuálního chování u obou pohlaví pomocí hormonálních manipulací.



Obr. 3 Schéma dočasné organizace. Po zvýšení hladiny hormonu je nástup sexuálního chování pozvolný, po snížení hladiny toto chování ještě nějakou dobu přetrvává a opět zvolna vymizí.

1.3. Obecné informace o zkoumaném druhu

Eublepharis macularius (Blyth, 1854) je druh gekončíka, který je řazen do čeledi Eublepharidae infrařádu Gekkota (Jonniaux a Kumazawa 2008). Jeho areál rozšíření je především v oblasti Pákistánu, jihovýchodního Afghánistánu a severozápadní Indie, kde žije v kamenitých oblastech a pouštích s řídkou rostoucí vegetací. Je to soumravné a noční zvíře, preferující teplotu okolo 26,5 °C. Je insektivorní, v zajetí přijímá převážně cvrčky, sarančata, myšata a moučné červy. Na prstech končetin nemá adhezivní lamely a má pohyblivá oční víčka, což je charakteristický znak pro celou skupinu (Kirschner a kol. 2005). Samci dorůstají délky 11 až 16 cm a samice 11 až 13 cm. Dospělé samice váží průměrně 35 až 45 g (Tousignant a Crews 1995), samci jsou těžší, celkově robustnější a mívají širší hlavu a krk než samice (Kirschner a kol. 2005). S největší pravděpodobností se jedná o druh se sezónním rozmnožováním, samice obvykle kladou vajíčka od března

do listopadu (Kirschner a kol. 2005; vlastní pozorování). První vitelogenní folikuly mají samice ve věku 40 až 45 týdnů, což to bývá považováno za známku pohlavní dospělosti. Několik týdnů po páření snáší obvykle dvě vejce s kožovitou skořápkou (Tousignant a kol. 1995). Mláďata se líhnou po 35 až 72 dnech, záleží na inkubační teplotě (Viets a kol. 1993).

Gekončík noční má teplotně určené pohlaví (Viets a kol. 1993), což znamená, že nemá pohlavní chromozomy a každý zárodek se může vyvíjet jako samec či samice, záleží jen na teplotě prostředí během embryonálního vývoje (Bull 1980). Jedná se o typ vztahu „vše nebo nic“, nevyvíjejí se žádní intersexuální jedinci (Flores a kol. 1994).

Samice se mohou vyvíjet přes celý rozsah inkubačních teplot, samci hlavně ve středních teplotách. Při nižších inkubačních teplotách (26 °C) se líhnou výhradně samice („*all-female temperature*“), při vyšších teplotách se podíl samců zvyšuje a při velmi vysokých teplotách opět klesá. Při 30 °C („*female-biased temperature*“) se líhne přibližně 33 % samců, při 32,5 °C („*male-biased temperature*“) je to 75 % samců a při nejvyšších teplotách (34 °C) se líhnou opět hlavně samice (95 %) (Viets a kol. 1993). Extrémně vysoké teploty (34 až 35 °C) jsou již blízko letální teplotě, proto se při inkubaci běžně používá přesunů do teploty 32 °C na poslední tři dny inkubace (Flores a kol. 1994). Jedinci pocházející z inkubačních teplot 26, 30, 32,5 a 34 °C se v experimentech používají nejčastěji. Inkubační teplota má vliv nejenom na pohlaví, ale i na další znaky, takže jedinci stejného pohlaví pocházející z různých inkubačních teplot se mohou lišit mezi sebou v chování, fyziologii i stavbě určitých oblastí mozku (Gutzke a Crews 1988; Flores a kol. 1994; Tousignant a Crews 1995; Rhen a Crews 1999; Coomber a kol. 1997).

Do dnešního dne bylo provedeno několik experimentů, které zkoumaly vliv inkubační teploty na znaky v rámci pohlaví. Z nich převážně vyplývá, že samice z *male-biased temperature* jsou maskulinizované ve znacích jako je růst, hormonální fyziologie a agresivní chování v porovnání se samicemi z jiných teplot. Samice z *male-biased temperature* pohlavně dospívají později (Tousignant a kol. 1995), mají vyšší hladiny testosteronu (Gutzke a Crews 1988, ale Tousignant a Crews 1995; Flores a Crews 1995; Tousignant a kol. 1995) a nižší hladiny estradiolu (Gutzke a Crews 1988; Tousignant a Crews 1995, ale Rhen a kol. 2000) než samice z chladnějších teplot. Ovšem endokrinní výsledky je nutné brát s opatrností, jak ukázali Rhen a kol. (2000) a Tousignant a kol. (1995), protože se liší mezi samicemi z různé teploty i podle jejich reprodukčního statutu. Samice ze *male biased temperature* jsou celkově agresivnější (Gutzke a Crews 1988; Flores a kol. 1994; Flores a Crews 1995) a mají tendenci být méně atraktivní pro samčí

stimul než samice z *all-female temperature* (Flores a kol. 1994). Tento jev by mohl být způsoben tvorbou více maskulinních semiochemikálií, podle kterých se jedinci odlišného pohlaví rozeznávají (Mason a Gutzke 1990), protože samice z *male-biased temperature* manipulované během inkubace estrogenem, byly v dospělosti více atraktivní než kontroly a to až na úroveň samic z *all-female* teploty. U těchto manipulovaných samic mohlo dojít díky dávkám estradiolu ke změně specifických semiochemikálií směrem k více feminním (Flores a kol. 1994). Změna složení specifických semiochemikálií mohla být příčinou napadání samic s testosteronovými implantáty samčím stimulem (Flores and Crews, 1995).

Rozdíly v rámci pohlaví najdeme i mezi samci. Samci z *male-biased temperature* jsou více agresivní, méně sexuálně aktivní vůči samicím, mají nižší hladiny estrogenů a mají tendenci dorůstat větších rozměrů než samci pocházející z *female-biased temperature* (Flores a kol. 1994; Tousignant a Crews 1995; Rhen a Crews 1999). Oba typy samců se od sebe odlišují ve výběru samice, samci z *female-biased temperature* dávají přednost samicím pocházejícím z 34 °C, zatímco z *male-biased temperature* upřednostňují samice z 30 °C (Putz a Crews 2005).

Eublepharis macularius se také vyznačuje výrazným pohlavním dimorfismem, a to jak v chování, fyziologii i morfologii:

Samci mají nápadně zvětšené subkloakální vaky, obsahující párový pářící orgán hemipenis. Samice tyto struktury zvětšené nemají, ačkoliv malé hemipenisy u nich můžeme najít. U samic tohoto druhu byly také nalezeny motoneurony a oba svaly, které hemipenisy ovládají (Holmes a kol. 2005). Účel zachování těchto struktur u rozmnožujících se samic je nejasný. Samice, kterým byl uměle dodán testosteron, měly po dvou týdnech evertovatelné hemipenisy (Rhen a kol. 1999), v další studii uvádějí po čtyřech týdnech také zvětšené hemipenisy a přidružené svaly oproti kontrole (Holmes a kol. 2005). Dalším morfologickým samčím znakem jsou výrazné prekloakální póry (většinou 8 až 14). Z těchto pórů je sekretována voskovitá substance, která je roztírána po substrátu, což je součástí typického samčího chování (Kirschner a kol. 2005). Dalším dobře pozorovatelným znakem, kterým se samci odlišují od samic, je nápadný opaleskující povrch pokožky na spodní straně těla. Samci jsou delší a těžší, mají širší hlavu a mohutnější krk (Tousignant a Crews 1995).

Samci mají vyšší hladiny androgenů a nižší hladiny estrogenů než samice (Tousignant a Crews 1995, Crews a kol. 1996) a tento rozdíl je patrný již od stáří 2 týdnů (Rhen a kol. 2005).

U samců *Eublepharis macularius* můžeme pozorovat agresivní (teritoriální) a specifické sexuální chování. V některých znacích se shodují se samicemi, jiné můžeme najít výhradně u samců. Samci bývají obecně agresivnější (Rhen a Crews 2000). Jednotlivé části samčího sexuálního chování se dají rozdělit do dvou kategorií: dvoření a páření. U gekončíka nočního se znaky jako olizování, vysoký postoj, značení póry a vibrace ocasem považují za prvky dvoření. Součástí páření je pak kousání, *mounting* a vlastní kopulace (viz dále). Tyto typy chování intaktní samice nikdy nepředvádějí (Flores a Crews 1995), stejně tak intaktní samci nebývají receptivní a sexuálně atraktivní pro samčí stimul (Rhen a Crews 2000).

Jednotlivé prvky samčího sexuálního chování gekončíka nočního (Gutzke a Crews 1988; Rhen a Crews 1999; shrnuto Crews a kol. 1996):

Olizování – pro gekončíky mají pachové signály velký význam, protože mají dobře vyvinutý čichový aparát a vomeronazální orgán. V přítomnosti nového stimulu si nápadně olizují rty („labial licking“) či olizují vzduch a substrát („tongue flicking“), pravděpodobně aby získali chemické informace. Protože se mezi pohlavími liší typické pokožkové lipidy, je pravděpodobné, že dochází rozpoznávání pohlaví pomocí analýzy uvolňovaných semiochemikálií (Mason a Gutzke 1990). Je dokázáno, že samci dokáží rozpoznat chemické signály samice, ale reagují na ně spíše sexuálním chováním než zvýšenou frekvencí olizování (Cooper a Steele 1997). Samice také používají různé typy olizování a stejné chování můžeme pozorovat i v teritoriálním nebo potravním chování (Deperno a Cooper 1996; Steele a Cooper 1997). Olizování je nespecifický znak, proto je nevhodný pro hodnocení sexuálního chování, pokud není doprovázen dalším sexuálním prvkem.

Vysoký postoj („high posture“) – jedinec stojí rozkročený, trup má napjatý, nedotýká se substrátu a může mít vyklenutý hřbet. Tento postoj se často objevuje při agresivně motivovaných interakcích, ale zároveň ho můžeme pozorovat i u sexuálně motivovaných jedinců. Jedná se o nespecifický znak, proto je nevhodný pro hodnocení sexuálního chování, pokud není doprovázen dalším sexuálním prvkem.

Vibrace ocasem – jedná se o rychlý pohyb konce ocasu, většinou doprovázený vířením substrátu a zvukovým efektem. Liší se od ostatních pohybů ocasu, které zvíře

vykonává, když má strach nebo když útočí. Samec vibruje ocasem jen v přítomnosti samice či chemických signálů ze samice, nikdy ne na dalšího samce. Vibrace ocasem by měla zvyšovat receptivitu samice (nepublikovaná data citovaná v Crews a kol 1996).

Značení póry – samci mají výrazné prekloakální póry, v kterých se tvoří hustý voskovitý sekret, který je roztírán po substrátu pomocí specifických klouzavých pohybů a tření pánví o podklad. Toto chování většinou doprovází nebo předchází sexuální chování, ovšem můžeme ho pozorovat při značení teritoria a jako reakci na nové podmínky či prostředí (Cooper a Steele 1997). Samice *Eublepharis macularius* mají také prekloakální póry, ale jsou méně zřetelné, nejsou otevřené a nikdy se v nich netvoří sekret (Rhen a Crews 1999; vlastní pozorování).

Kousání do kůže samice („*body grip*“) – jedná se o poměrně jemné zakousnutí do kůže samice v oblasti ocasu, trupu či krku, doprovázené trhavými pohyby. Pro správnou polohu při kopulaci je nutné kousnutí do kůže krku. Často můžeme pozorovat, že se samec nejdříve zakousne do kůže na ocasu a postupně se propracovává až ke krku. Samice na kousnutí může reagovat ustrnutím a zvednutím ocasu (receptivní chování) nebo se naopak snaží utéct či zaútočit na samce (nereceptivní chování).

Vylezení na samici („*mounting*“) – samec se snaží vylézt samici na záda a zaujmout vhodnou polohu pro kopulaci, přičemž je zakousnutý do kůže na krku samice. Snaží se dostat do paralelní pozice se samicí a jednu zadní nohu pokládá seshora samici na pánev. V tu chvíli receptivní samice zvedá ocas a umožňuje samci zaujmout správnou pozici pro kopulaci.

Kopulace– samec použije jeden ze svých dvou erektilních hemipenisů a dvojice zůstává přibližně 2 minuty nehybná. Po ejakulaci se pár rozchází a samec si olíže pohlavní orgány.

Ve své práci jsem sledovala nástup těchto prvků samčího sexuálního chování u kastrovaných samců a intaktních samic gekončíka nočního po aplikaci testosteronu a následné vyhasínání po přerušení aplikace. Dalším cílem bylo zhodnotit, zda nástup a vyhasínání samčích sexuálních znaků odpovídá konceptu organizace-aktivace nebo konceptu dočasné organizace.

Podle konceptu organizace-aktivace by dodaný testosteron měl u kastrovaných samců i u samic poměrně rychle indukovat prvky samčího sexuálního chování, které vyžadují pouze aktivaci. Navíc u kastrovaných samců by se měly objevit prvky, které vyžadují organizaci. Po skončení hormonální manipulace by mělo samčí sexuální chování

do několika dnů až týdnů vymizet – podle výsledků práce Rhen a Crews (1999) by nemělo přetrvat u gekončíka nočního déle než 4 týdny.

Podle konceptu dočasné organizace by dodaný testosteron měl indukovat sexuální chování u kastrovaných samců i u samic, ale doba jeho nástupu by se pro jednotlivá pohlaví mohla lišit. Po skončení hormonální manipulace by mělo u gekončíka nočního samčí sexuální chování přetrvat déle, než uvádí Rhen a Crews (1999).

2. METODIKA

2.1. Rozpouštění hormonů v rostlinném oleji

U ještěřů se při experimentech s hormonálními hladinami běžně používají kromě kastrací i injekce s roztokem rozpuštěných hormonů (Mason a Adkins 1976) nebo častěji plastické implantáty plněné krystalickým testosteronem vložené pod kůži nebo do břišní dutiny zvířete (Crews a kol. 1996; Golinski a kol. 2011b; Rhen a Crews 2000). Nicméně tyto metody jsou pro zvířata stresující a často vyžadují invazivní chirurgické zákroky a následnou rekonvalescenci. Alternativní méně invazivní metodou je rozpouštění hormonů v rostlinném oleji, který je následně aplikován na kůži zvířete (Meylan a kol. 2003; Belliure a Clobert 2004; Trompeter a kol. 2011). Tuto metodu jsem vybrala, protože při ní nejsou potřeba žádné zásahy do těla zvířete, zvířata jsou méně stresována, nijak je neomezuje a je snadné tuto hormonální manipulaci přerušit. Nevýhodou této metody je poměrně větší časová náročnost přípravy a aplikace a nutnost dodržovat dané schéma aplikací.

2.2. Pilotní pokus

Před plánovaným experimentem předcházel pilotní pokus (leden 2012), během kterého jsem ověřovala, zda je metoda rozpouštění testosteronu v oleji a jeho kožní aplikace vhodná pro gekončíka nočního, navíc se jednalo i o jiný hormon než použili Meylan a kol. (2003). Bylo tedy nutné otestovat jaké koncentrace a jak častá aplikace bude vhodná pro samotný pokus. Pilotní pokus trval 8 dní, metodika přípravy a aplikace směsi byla stejná jako v hlavním experimentu (viz níže), jen množství testosteronu a oleje se lišilo. V pilotním pokusu jsem použila směs o poměru 3 mg testosteronu na 1 ml oleje,

příčemž zvířeti bylo na každý gram hmotnosti aplikováno 0,3 µl výsledné směsi, aby výsledné množství odpovídalo koncentraci přibližně 1 µg testosteronu na gram hmotnosti zvířete. V tomto pilotním pokusu jsem použila 30 dospělých samic gekončíka nočního pocházejících z naší chovné skupiny, které byly rozděleny do 3 skupin: a) skupina A (12 samic), b) skupina B (12 samic), c) skupina C (6 samic). Všem samicím byla v průběhu experimentu odebrána krev (první, druhý, třetí, čtvrtý, pátý a osmý den), přičemž každé samici jen jednou.

Skupina A – samicím byla aplikována směs hormonu a oleje pouze první den, cca čtyři hodiny před odběry krve. Pro odběry byly náhodně vybrány vždy dvě samice. Tento pokus přinesl informace, jak se zvýší hladiny testosteronu v krvi po jedné aplikaci a za jak dlouho vymizí.

Skupina B – samicím byl aplikován hormon první, třetí a pátý den cca čtyři hodiny před odběrem krve, přičemž k odběrům byly náhodně vybrány vždy dvě samice. Tento pokus měl ukázat, zda je aplikace každý druhý den dostatečná, jakou má za následek koncentraci testosteronu v krvi a zda jsou patrné nějaké trendy při opakované aplikaci.

Skupina C – tato skupina byla kontrolní, aplikovala jsem jim jen čistý rostlinný olej první, třetí a pátý den cca čtyři hodiny před odběry krve. K odběrům byla náhodně vybrána vždy jedna samice. Tato skupina měla ukázat, zda samotný olej nějak neovlivňuje nízké hladiny testosteronu v krvi typické pro intaktní samice.

Na základě výsledků tohoto pilotního experimentu byl vytvořen základní design hlavního experimentu.

2.3. Hlavní experiment

2.3.1. Testování jedinci

Pro testování regulace samčího sexuálního chování byly do hlavního experimentu zařazeny dvě skupiny gekončků: kastráti a intaktní samice.

Do experimentu bylo vybráno 15 kastrovaných samců (dále jen „EMH“) inkubovaných v roce 2009 při teplotě 30 °C, jež byli po celý život chováni v izolaci, aby se předešlo jakýmkoliv možným sociálním zkušenostem, které by potencionálně mohly ovlivnit jejich reakce a prodloužit předvádění sexuálního chování po skončení

manipulace. Průměrný věk této skupiny byl 142 týdnů (rozsah 136 až 148 týdnů). Kastrace byla provedena v naší laboratoři v roce 2010, když byli samci v prepubertálním věku (průměrný věk při operaci 33 týdnů, rozsah 27 až 39 týdnů). Po úvodním behaviorálním testování, které předcházelo hormonálním manipulacím, byli vyloučeni dva kastráti (EMH 26 a EMH 93), kteří sexuálně reagovali na samičí stimul. Dále byl během pokusu vyloučen jeden kastrovaný samec (EMH 3), protože jsem zpětně zjistila, že již v prvním testování reagoval na přítomnost samice. Následné analýzy hladin testosteronu odhalily, že tyto kastráti měli po dvou letech (108 týdnů) od chirurgického zákroku stále zvýšenou hladinu tohoto hormonu (20,62 – 66,66 ng/ml), která je typická spíše pro intaktní samce (Gutzke a Crews 1988; Tousignant a Crews 1995). Vysoké hladiny testosteronu byly patrně způsobeny neúplnou kastrací, zřejmě se jedná o podobný případ jako v práci Tousignant a Crews (1995), kde ačkoliv byla varlata vyjmuta, tak se ze zbytku tkáně zregenerovala. Hladiny testosteronu u ostatních pokusných sameců byly velmi nízké.

Pro druhou část pokusu bylo nejdříve náhodně vybráno 24 mlád'at (dále jen „EMJ“) pocházejících z našich chovů a inkubovaných v teplotě 28 °C, při které se líhnou samice, přičemž podmínkou bylo, aby byla všechna vylíhla během srpna 2011 a při vstupu po experimentu byla jejich hmotnost vyrovnaná (13 g až 16,8 g), což platí i pro věkové rozpětí skupiny před zahájením hormonálních manipulací (29 až 33 týdnů). Všechna tato mlád'ata byla chována po celý život v izolaci a měla zachované intaktní gonády. Před samotným experimentem jsem zjistila, že EMJ 17 je samec (pravděpodobnost vylíhnutí samce při inkubační teplotě 28 °C je podle autorů Viets a kol. (1994) 2 %) a další tři náhodně vybrané samice byly vyřazeny z experimentu. Tito jedinci dále sloužili jako intaktní kontrola morfologického a vývojového stavu.

Obě zkoumané skupiny byly chovány ve skleněných teráriích o velikosti 15 × 15 × 40 cm (v × š × d), které jsou dostatečně velké pro chov jednoho dospělého jedince gekončíka a zároveň se s těmito terárii snadno manipuluje, což bylo nutné pro natáčení behaviorálních interakcí. EMH byli krmeni jednou týdně vhodně velkými cvrčky, EMJ nejdříve 2 × týdně menšími cvrčky, protože ještě nebyli plně vzrostlí, později jednou týdně středně velkými cvrčky. Cvrčky jsem vždy před podáním obalila ve vitamínovém prášku Roboran a do vody na pití jsem přidávala vápník, který jsem jednou za čtrnáct dní nahradila vodou obohacenou vitamíny A, D₃ a E (Combial).

2.3.2. Samice sloužící jako stimul

21 samic, které sloužily jako podnět pro manipulované jedince (dále v textu jako „stimuly“), pochází z naší chovné skupiny a byly inkubovány při teplotě 30 °C. Jedná se o reprodukce schopné samice chované izolovaně, takže při testování by měly být s největší pravděpodobností receptivní. Protože již byly použity jako stimul v jiném experimentu, nebyly na začátku mého experimentu sociálně naivní. Ke každé samici byl přiřazen maximálně jeden EMH a jedna EMJ, 9 samic mělo jen jednoho z nich. Přiřazení bylo neměnné během trvání celého experimentu.

2.3.3. Metoda rozpouštění testosteronu v oleji

Používala jsem upravenou metodu, která byla zmíněna v práci Meylan a kol. (2003). Pro potřeby experimentu jsem používala krystalický testosteron (>99%, Sigma-Aldrich), slunečnicový olej v lékárenské kvalitě a čistý ethanol.

2.3.3.1. Příprava směsi

Směs testosteronu a slunečnicového oleje jsem připravovala v laboratoři vždy v den, kdy jsem ji měla aplikovat. Abych zabránila kontaminaci okolí, používala jsem alobal a částečně jsem pracovala v prostoru pod digestoří. Příslušné množství krystalického testosteronu jsem navážila na analytických vahách s přesností 0,0001 gramu. Pro 1. až 10. kolo natáčení to bylo 0,0075 g testosteronu (rozpětí 0,0075-0,0085 g). Od 11. kola natáčení (po čtyřech měsících aplikace, podrobněji v následující kapitole) jsem množství rozpouštěného testosteronu zvedla na 0,0150 g (rozpětí 0,0150-0,0160 g). K naváženému testosteronu jsem pomocí automatické pipety přidala 75 µl čistého ethanolu, který usnadňuje rozpouštění většího množství hormonu v oleji (Lukáš Kubička, ústní sdělení). Dále jsem přidala 500 µl slunečnicového oleje. Výslednou směs jsem promíchala na vortexu přibližně po dobu dvou minut při 1500 otáčkách za minutu, dokud se všechn testosteron nerozpustil. Výsledný poměr testosteronu v oleji byl přibližně 15 µg, respektive 30 µg testosteronu na 1 µl oleje (vyšší koncentrace než v pilotním pokusu). To umožnilo aplikaci menšího množství této směsi, která se lépe a rychleji vstřebává (vlastní pozorování).

2.3.3.2. Aplikace směsi

Každý týden jsem všechny manipulované jedince zvažila na analytických vahách s přesností 0,001 gramu. Aktuální hmotnost byla důležitá, protože každé zvíře muselo dostávat dávku 0,1 μ l směsi na 1 g hmotnosti. Směs testosteronu a slunečnicového oleje jsem aplikovala zvířatům 2 \times týdně vždy ve stejný den (pondělí a čtvrtek) a přibližně ve stejnou dobu, aplikace mi trvala přibližně hodinu. Používala jsem čtyři různá schémata aplikace, tak aby pořadí jedinců nebylo pokaždé stejné. Kůže ještěřů obsahuje lipidy a lipofilní molekuly, jako jsou steroidy, mohou skrz ni snadno projít (Meylan a kol. 2003). Objem směsi specifický pro konkrétní zvíře jsem aplikovala pomocí automatické pipety na kůži v oblasti krku a ramen. Toto místo je vhodné, protože se minimalizuje kontaminace okolí a směs se může vstřebávat po delší čas (během jednoho dne, maximálně dvou dnů). EMH dostávali směs v období 26.3.2012 až 1.10.2012 a EMJ v období 26.3.2012 až 11.2.2013. Pokud bylo zvíře zrovna v období svlékání kůže nebo krátce před ním (mléčně zbarvená kůže), tak jsem takové zvíře manuálně svlékla, aby nebylo omezeno vstřebávání hormonu. O ekdysi jsem si v průběhu pokusu vedla záznamy pro pozdější kontrolu, zda zásadně neovlivňují chování zvířat, ovšem všechny ekdyse jsem nezachytila, protože vlastní svlékání netrvá příliš dlouho a svlečenou pokožku zvířata požírají. Mladší zvířata rychleji rostou, proto svlékají pokožku častěji než starší zvířata, ale svlékání ovlivňují i další faktory, jako je množství potravy a vitamínů. Zvířata se svlékají přibližně jednou za měsíc (Kirschner a kol. 2005).

Po 14 týdnech od začátku manipulace jsme provedli kontrolní odběry krve pro stanovení hladin testosteronu u všech jedinců ze skupiny EMH a 12 jedinců ze skupiny EMJ (podrobněji v následující kapitole). Po stanovení hladin v Endokrinologickém ústavu v Praze jsem zjistila, že hladiny testosteronu byly vyšší než na začátku experimentu, ale nedosahovaly hodnot naměřených u kontrolních nemanipulovaných samců během reprodukce (podrobněji v kapitole „Výsledky“). Proto bylo původní dávkování 1,5 μ g testosteronu na 1 g hmotnosti zvířete operativně navýšeno po 18 týdnech od začátku aplikace na dvojnásobek, tj. 3 μ g testosteronu na 1 g hmotnosti. Hmotnost EMH se pohybovala v rozpětí 54 až 73 g (průměr 66 g), hmotnost EMJ byla na začátku experimentu 14 až 19 g (průměr 16,8 g) a na konci experimentu se pohybovala mezi 30 a 40 g.

2.3.3.3. Odběry krve a měření hladin testosteronu

S odběry krve mi pomáhal Lukáš Kubička. Krev jsme odebírali až na výjimky všem jedincům ve skupině vždy v rámci tří hodin z cév na přední končetině pomocí heparinizované inzulinové stříkačky v takovém množství, aby výsledné krevní plasmy bylo minimálně 25 μl (většinou bylo v rozmezí 30 až 50 μl). Odsátou krev jsem dala na led. Ta pak byla na chlazené centrifuze stočena během 15 minut při 1500 otáčkách za minutu a 4 °C. Tímto krokem se oddělí červené krvinky od plasmy, kterou jsme odsáli a skladovali v mrazničce při teplotě pod -20 °C. Vzorky byly odeslány do Endokrinologického ústavu v Praze na analýzu obsahu testosteronu. Analýza byla provedena metodou radioimunologické analýzy (RIA). Pro naše vzorky byla použita následující metodika: 20 μl plasmy bylo smícháno s 80 μl fyziologického roztoku a 1 ml diethyletheru. Vodní fáze pak byla zmrazena v suchém ledu a zbylá etherová fáze převedena do zkumavky a následně odpařena ve vodní lázni při 37 °C. Takto získaný extrakt byl smíchán se 100 μl antiséra pro testosteron a radioaktivně značeným testosteronem. Směs byla pak inkubována přes noc při teplotě 2 až 4 °C. Následující den bylo přidáno 500 μl suspenze aktivního uhlí a směs byla inkubována 10 minut při 5 °C a poté odstředována 10 minut při 3000 otáčkách za minutu. V supernatantu (bez volných antigenů) byla následně změřena radioaktivita, přičemž vyšší naměřená radioaktivita značila nižší podíl neznačeného testosteronu. Množství obsaženého testosteronu bylo vypočítáno pomocí kalibrační křivky, sestavené v měřitelném rozsahu od 0,03 do 92,29 ng/ml.

Pro hladiny testosteronu kontrolních nemanipulovaných samců v období reprodukce jsem využila nepublikovaná data naší pracovní skupiny. Tyto odběry byly provedeny už dříve, hladiny hormonu však byly stanoveny stejnou metodou RIA.

Schéma odběrů:

A) EMH

První odběr jsme provedli ještě před začátkem experimentu, 16.3.2012. Výsledky tohoto odběru měly potvrdit, úspěšnou kastraci všech jedinců a tedy nízké hladiny testosteronu.

Druhý odběr se konal 4.7.2012 (mezi 7. a 8. kolem testování), přibližně po třech měsících od začátku aplikace směsi, aby se zkontrolovalo, zda je manipulace úspěšná

a aplikace směsi na kůži zvyšuje hladiny testosteronu. Po výsledcích tohoto odběru jsem začala aplikovat dvojnásobné dávky testosteronu.

Třetí odběr byl naplánován den po poslední aplikaci směsi, tedy 2.10.2012 a přibližně po 6 měsících od počátku aplikace obou směsí (mezi 13. a 14. kolem testování). Tento odběr byl důležitý pro kontrolu hladin testosteronu po dlouhodobé zvýšené aplikaci testosteronu.

Čtvrtý odběr se konal 22.10.2012, tj. tři týdny po ukončení manipulace (mezi 15. a 16. kolem testování), aby se potvrdilo vymizení testosteronu z krevního oběhu.

B) EMJ

Odběry před vlastní manipulací jsme neprováděli, protože jsem předpokládala, že všechny samice před experimentem budou mít velmi nízké hodnoty testosteronu, jež jsou typické pro intaktní samice (Rhen a kol. 2000), navíc u tak malých jedinců by byly odběry velmi obtížné a mohly by způsobit trvalé následky.

První odběr se konal 4.7.2012 (mezi 7. a 8. kolem testování), přibližně po třech měsících od začátku aplikace směsi, aby se potvrdila úspěšnost manipulace. Byl proveden pouze u 12 jedinců, kteří byli dostatečně vzrostlí na takový zákrok. Po výsledcích tohoto odběru jsem u této skupiny rovněž začala aplikovat dvojnásobné dávky testosteronu.

Druhý odběr jsme provedli 12.2.2013, tedy den po skončení manipulace s navýšeným dávkováním (mezi 23. a 24. kolem testování) a přibližně 10 a půl měsíce od začátku aplikace obou směsí. Výsledky tohoto odběru byly důležité pro kontrolu, jestli se pohybuje obsažené množství testosteronu v krvi v rámci fyziologických hodnot.

Třetí odběr byl naplánován na 1.3.2013, tj. 18 dní po skončení aplikace hormonu (mezi 24. a 25. kolem natáčení), aby se potvrdilo vymizení testosteronu z krve.

2.3.4. Behaviorální testování

Behaviorální interakce jsem natáčela jednou za čtrnáct dní, přičemž jedna natáčecí událost byla rozdělena do dvou po sobě následujících dnů, aby byly stimuly použity jen jednou za den (platí pro 1. až 22. kolo behaviorálního testování). Po ukončení části experimentu s kastráty EMH byla zbylá zvířata testována v jeden den (platí pro 23. až 36. kolo testování). Interakce zkoumaných zvířat se stimulem jsem natáčela v chovech za tmy po zhasnutí všech světel (po 18. hodině), k přisvětlování jsem použila noční žárovku (Night glo, Exo Terra), která gekončíky, jakožto noční zvířata, neruší. Aby se

minimalizovala pravděpodobnost vyrušení, interakce jsem sledovala z vedlejší místnosti pomocí televize propojené s kamerou. Kamera se zapnutým nočním režimem byla umístěna přibližně 60 cm nad teráriem na stativu, takže byl k dispozici pouze pohled svrchu, který je ale pro sledování většiny behaviorálních interakcí naprosto dostačující. Během natáčení interakcí jsem si dělala stručné poznámky o chování a výsledné nahrávky jsem podrobně analyzovala na konci celého experimentu. Terárium s manipulovaným fokálním jedincem jsem vložila do připravené arény, vyhřívané cca na 30 °C (pro zajištění dostatečné performance pokusných zvířat). Použila jsem tuto variantu z toho důvodu, abych snížila pro fokální zvíře možný stres z manipulace a cizího prostředí a abych tak zvýšila pravděpodobnost, že pokusný jedinec bude mít možnost přirozeně reagovat. Samici sloužící jako stimul jsem vyjmula z jejího terária, přenesla v krabici a následně vložila do terária k pozorovanému zvířeti, byla tedy v neznámém prostředí. Pokud byla samice těsně před svlékáním pokožky, ručně jsem jí exuvii odstranila, jinak by mohlo být omezeno uvolňování specifických semiochemikálií z kůže, díky kterým gekončici pravděpodobně rozpoznávají pohlaví druhého jedince (Mason a Gutzke 1990). Mason a Gutzke (1990) informovali o tom, že samci mohou napadat samice, které jsou v období ekdyse, čemuž jsem se během experimentu chtěla vyhnout. Po celou dobu experimentu jsem používala latexové rukavice, které jsem si po každé manipulaci se zvířetem měnila, protože zde byla možnost přenesení pachů z jednoho stimulu na druhý, což bylo nežádoucí. Po zapnutí kamery a přesunu do vedlejší místnosti jsem začala odpočítávat pět minut, což je dostatečná doba pro sexuální interakce u gekončíka nočního (osobní pozorování; Flores a Crews 1995; Rhen a Crews 1999). Pokud se během této doby objevilo sexuální chování či jeho náznak, prodloužila jsem natáčení o minutu nebo o delší čas podle potřeby. Po skončení natáčení byl stimulus vrácen do svého terária.

Úvodní behaviorální testování probíhalo ještě před hormonální manipulací (21. až 22.3.2012; dále označováno jako nultá natáčecí událost). Toto úvodní testování sloužilo jako vlastní kontrola pro každého jedince před manipulací. Nejprve jsem ve stejných podmínkách (vyhřívaná aréna, osvětlení, délka natáčení) vyzkoušela interakci mezi intaktním samcem a intaktní samicí, abych měla představu, jak se k sobě jedinci chovají a jak vypadá vlastní samčí sexuální chování. Zároveň jsem využila přítomnosti samce EMJ 17, abych si ověřila, že i menší subadultní zvíře ve věku 32 týdnů a hmotnosti 15,4 g (což odpovídá věkovému a hmotnostnímu rozložení skupiny EMJ na začátku experimentu) je schopné sexuálního chování vůči mnohem větší samicí.

Během experimentu jsem na dvě kola natáčení (15. a 16. kolo, říjen 2012) nahradila všechny samice-stimuly pro EMJ malými květináči z pálené hlíny. Tyto květináče z porézní hmoty jsou schopné absorbovat pachy (Cooper a Steele 1997), proto jsem je před natáčením umístila do terária s dospělými samicemi. Při interakcích jsem květináč vložila do terária se sledovaným zvířetem a nechala ho tam po standardních 5 minut či více. Učinila jsem toto opatření z důvodu, abych si ověřila, zda reakce EMJ není ovlivněna tím, že jsou menší než stimuly, s kterými mají interagovat. Protože reakce na květináče byla srovnatelná, dokonce nepatrně menší než reakce na stimuly, opět jsem do experimentu zařadila stimuly. Tyto dvě natáčecí události nejsou zahrnuty ve výsledcích.

Behaviorální testování EMH probíhalo v období 21.3.2012 až 24.1.2013 (23 natáčecích událostí), behaviorální testování EMJ probíhá od 21.3.2012 a nadále pokračuje (ke dni 24.7.2013 ještě tři EMJ reagují na stimul). Vyhodnocování interakcí jsem ukončila ke dni 24.7.2013 (celkem vyhodnoceno 36 natáčecích událostí)

2.3.5. Vyhodnocování sexuálních interakcí

Vyhodnocování interakcí jsem dělala tak, že jsem zhlédla všechna videa natočená během behaviorálního testování. Do připravené tabulky jsem zapisovala pomocí binárních znaků přítomnost nebo nepřítomnost daného prvku chování u každého jedince při konkrétní natáčecí události. Zaznamenávala jsem přítomnost olizování („*labial licking*“, „*tongue flicking*“) značení prekloakálními póry, vibrace ocasem, vysoký postoj, „*body grip*“, vylezení na stimul, páření a olizování hemipenisu (popis jednotlivých znaků viz kapitola 1.3. „Jednotlivé prvky samčího sexuálního chování gekončíka nočního“). Výsledky jsem zdokumentovala vytvořením grafů v programu Excel.

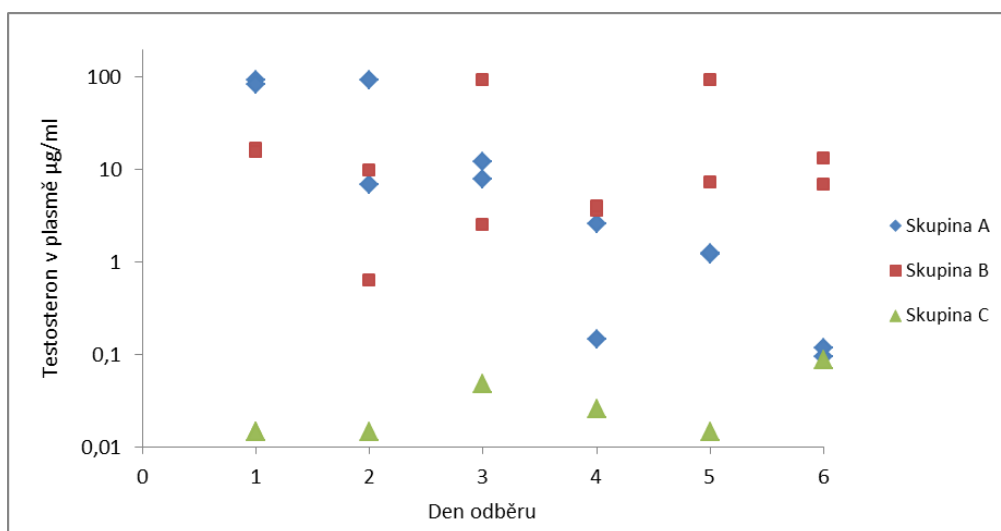
Ke statistickému vyhodnocení byl použit program STATISTICA a analýza přežívání (srovnání nástupu znaků, respektive vyhasíná znaků) – Gehanův-Wilcoxonův test. Pro analýzu nástupu chování byla potřeba pro každého jedince data o prvním výskytu daného znaku po začátku aplikace testosteronu a pro analýzu vyhasínání data o posledním výskytu daného znaku. Výsledkem byly kumulativní funkce nástupu a vyhasínání chování.

3. VÝSLEDKY

3.1. Výsledky pilotního experimentu

Naměřené hladiny testosteronu v krevní plasmě tří skupin samic s rozdílným schématem manipulace jsou uvedeny v Obr. 4. U skupiny A je patrný pokles hladin v průběhu experimentu po jediné aplikaci testosteronu. Na úroveň kontrol (skupina C) se dostávají šestý den odběrů (týden po aplikaci). Skupina B, kde byl testosteron aplikován opakovaně, ukazuje mírně stoupající trend hladin tohoto hormonu ve dnech bez aplikace (mezi pátým a šestým odběrem krve byly dva dny bez odběru). Kontrolní skupina C ukazuje, že aplikace samotného slunečnicového oleje nezpůsobuje žádné zvýšení hladin testosteronu.

Čtyři vzorky plasmy měly příliš nízkou aktivitu při RIA, (tj. nad limitem kalibrační křivky) proto jim byla přiřazena nejvyšší měřitelná hodnota koncentrace testosteronu podle kalibrační křivky (92,29 ng/ml). Čtyři vzorky měly naopak příliš vysokou aktivitu při RIA (tj. pod limitem kalibrační křivky), proto jim byla přiřazena nejnižší měřitelná hodnota koncentrace testosteronu podle kalibrační křivky (0,03 ng/ml).



Obr. 4 Naměřené hladiny testosteronu v krvi tří skupin samic z pilotního pokusu. Osa y je v logaritmické škále.

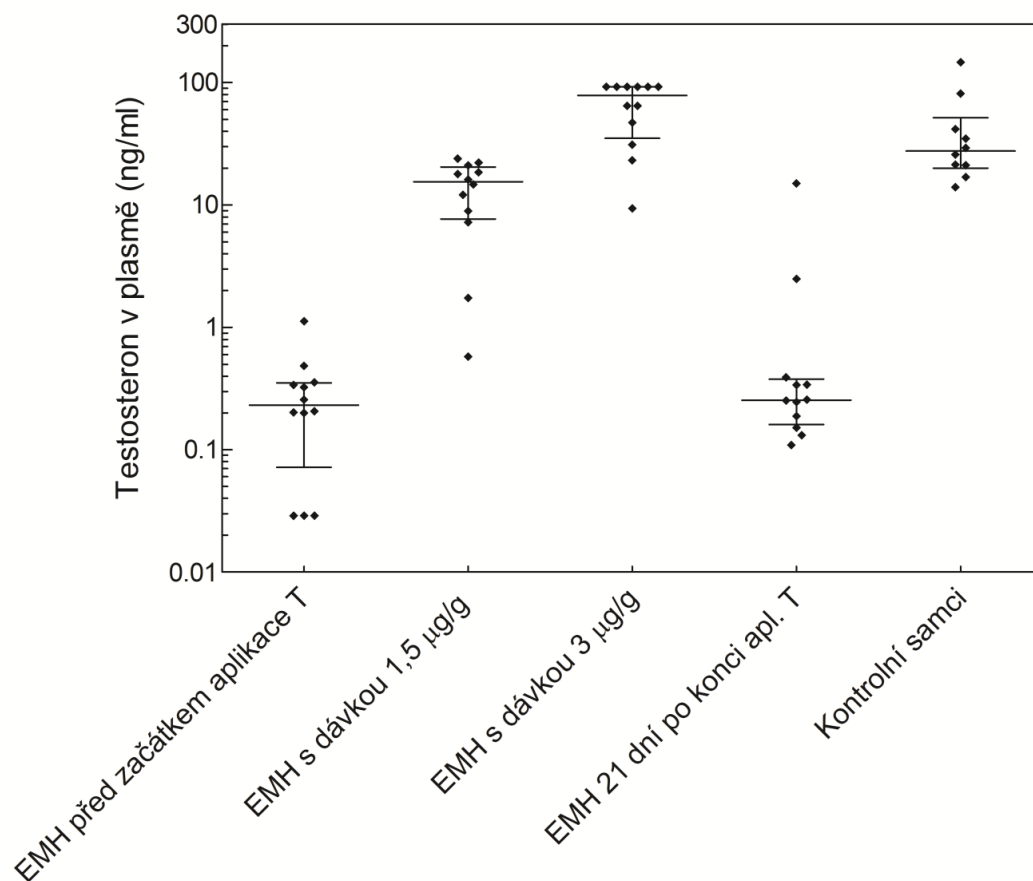
3.2. Výsledky hlavního experimentu

3.2.1. Hladiny testosteronu během experimentu

A) EMH

Experimentální zvířata ze skupiny EMH měla podle očekávání před započtím aplikace velmi nízké hladiny testosteronu. Dávka testosteronu 1,5 $\mu\text{g/g}$ způsobila nárůst hladin tohoto hormonu v plasmě, které však byly nižší než u skupiny kontrolních samců. Navýšení dávky na dvojnásobné množství (tj. 3 $\mu\text{g/g}$) navodilo hladiny srovnatelné s kontrolní skupinou nemanipulovaných samců. 21 dní po skončení aplikace byly hladiny testosteronu u většiny EMH opět velmi nízké. Pouze ve dvou případech (2,48 a 14,93 ng/ml) byly vyšší než 1 ng/ml plasmy (Obr. 5).

Vzorky tří jedinců z odběrů krve před začátkem manipulace měly příliš vysokou aktivitu při RIA (pod hranicí detekce), proto jim byla přiřazena nejnižší měřitelná hodnota koncentrace podle kalibrační křivky (0,03 ng/ml). Vzorky šesti jedinců z odběrů krve před koncem manipulace (s dávkou 3 $\mu\text{g/g}$) měly příliš nízkou aktivitu při RIA (nad hranicí detekce), proto jim byla přiřazena nejvyšší měřitelná hodnota koncentrace testosteronu podle kalibrační křivky (92,29 ng/ml). Výsledky kontrolních samců pocházejí z nepublikovaných dat naší pracovní skupiny. Tři jedinci vyloučení na začátku experimentu nejsou v analýze zahrnuti.

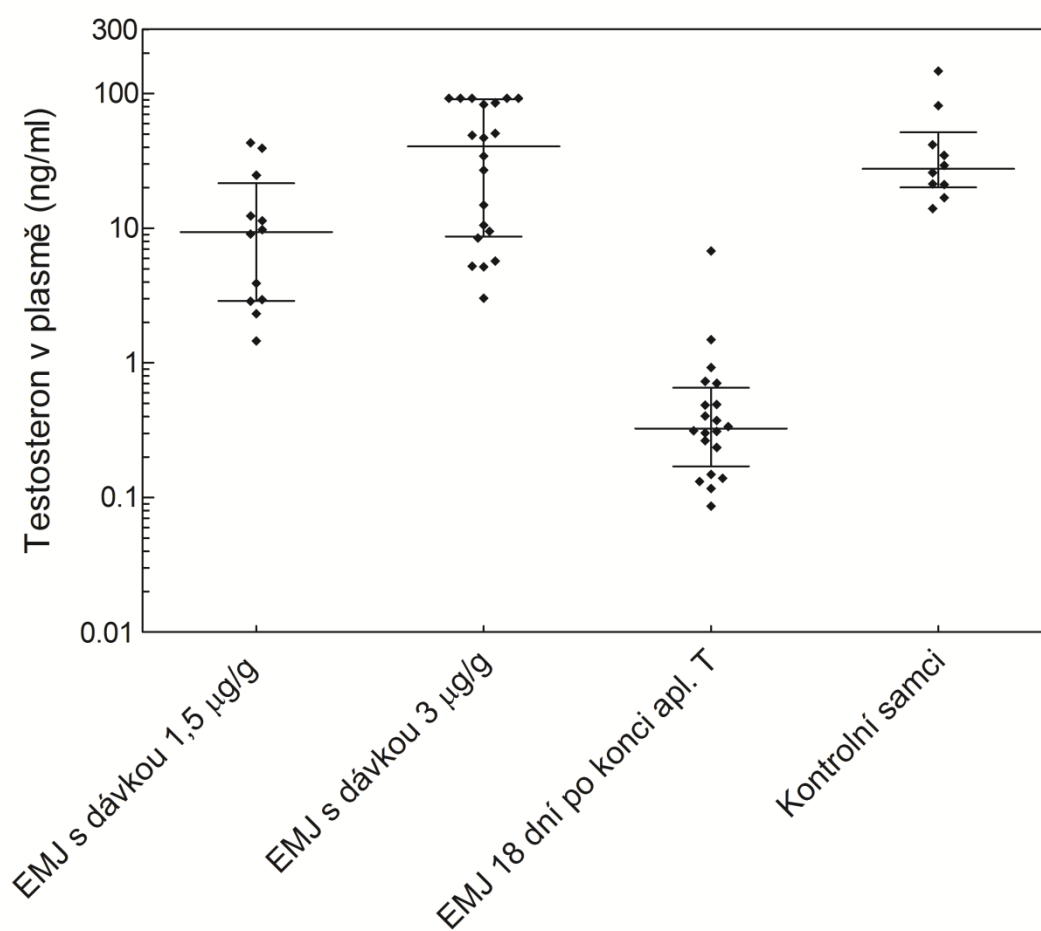


Obr. 5 Hladiny testosteronu v krevní plasmě manipulovaných EMH a kontrolních intaktních samců. Osa y je v logaritmické škále. T je testosteron. Zvýrazněn je medián, první a třetí kvartil.

B) EMJ

Aplikace testosteronu měla také vliv na hladiny cirkulujícího testosteronu u samic ze skupiny EMJ. Dávka testosteronu 1,5 µg/g způsobila nárůst hladin, které však nedosahovaly hodnot kontrolních samců. Po navýšení dávky na 3 µg/g byly hladiny testosteronu srovnatelné s kontrolní skupinou nemanipulovaných samců (stejně jako u EMH). Podle očekávání 18 dní po skončení aplikace byly hladiny testosteronu u většiny EMJ velmi nízké. Pouze ve dvou případech (1,49 a 6,79 ng/ml) byly vyšší než 1 ng/ml plasmy (Obr. 6).

Vzorky pěti jedinců z odběrů krve před koncem manipulace (s dávkou 3 µg/g) měly příliš nízkou aktivitu při RIA (nad hranicí detekce), proto jim byla přiřazena nejvyšší měřitelná hodnota koncentrace testosteronu podle kalibrační křivky (92,29 ng/ml). Výsledky kontrolních samců pocházejí z nepublikovaných dat naší pracovní skupiny.



Obr. 6 Hladiny testosteronu v krevní plasmě manipulovaných EMJ a kontrolních intaktních samců. Osa y je v logaritmické škále. T je testosteron. Zvýrazněn je medián, první a třetí kvartil.

3.2.2. Vyhodnocení behaviorálních testů

3.2.2.1. Výskyt samčího sexuálního chování

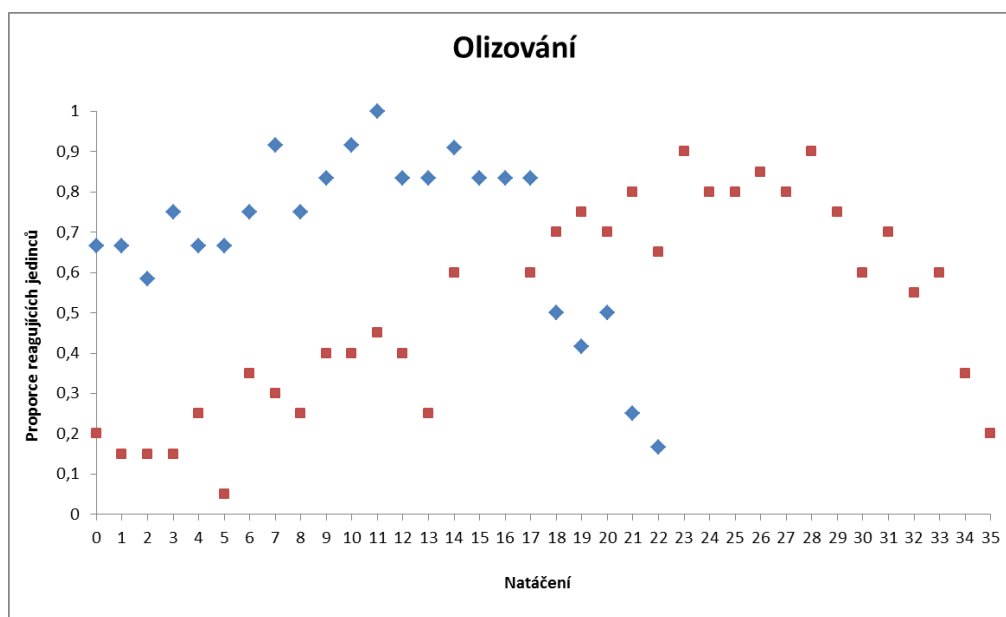
Ze záznamu natáčení behaviorálních testů, které se opakovaly každých 14 dní, jsem hodnotila přítomnost sexuálního chování jedinců před hormonální manipulací (úvodní nultý test), během ní a po ukončení aplikace testosteronu. Na základě mého pozorování jsem pak vytvořila přehledné tabulky (Tab. 1 a Tab. 2), v kterých je znázorněna přítomnost celkového sexuálního chování (hlavní kritéria byla přítomnost alespoň jednoho prvku chování – značení póry, vibrace ocasem, *body grip*, *mounting*, kopulace, olizování hemipenisů či celkového zájmu o samičí stimul). Olizování a vysoký postoj do tohoto souhrnu nebyly zahrnuty, protože se nejedná o specifické samčí sexuální chování. V tabulkách je patrný nástup a vymizení samčího sexuálního chování u jednotlivých manipulovaných jedinců, ale i to, jak jedinci při některém testování nereagovali, ačkoli vykazovali sexuální chování během předchozího testování.

3.2.2.2. Podíl jedinců předvádějící konkrétní znak samčího sexuálního chování v závislosti na natáčecí události

Pro obě skupiny platí, že natáčení 1 až 10 bylo s nižší dávkou testosteronu (1,5 µg/g), od jedenáctého až do konce aplikace byla dávka dvojnásobná. U skupiny EMH byla ukončena aplikace testosteronu po 13. natáčení u skupiny EMJ to bylo po 23. natáčení. V grafech nejsou zobrazeny výsledky z 15. a 16. měření pro skupinu EMJ, kdy byly použity hliněné květináče jako stimuly (metodika).

→ olizování (Obr. 7)

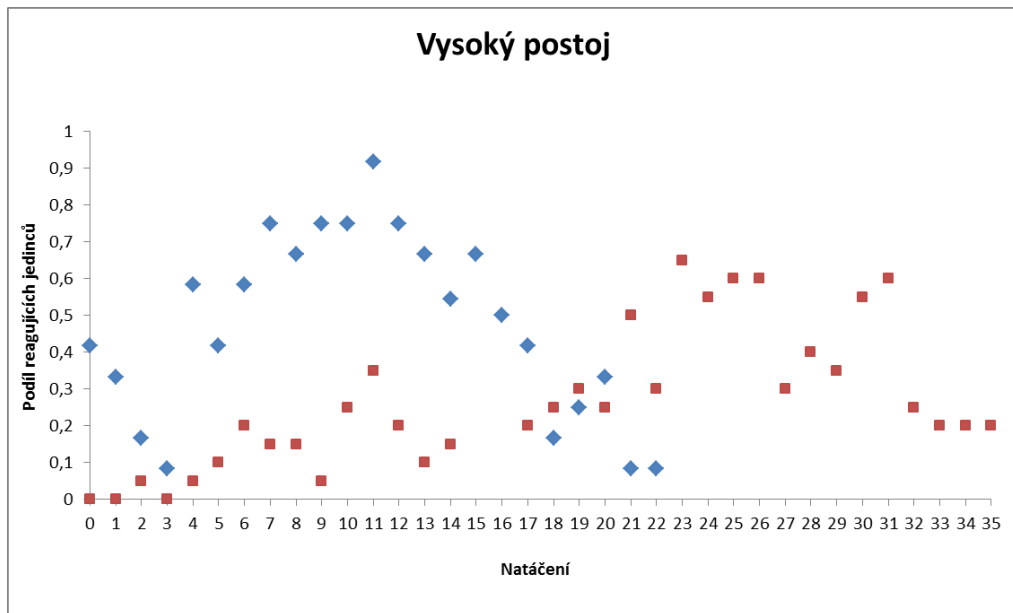
Proporce jedinců, kteří se olizovali („labial licking“ a „tongue flicking“) byla ovlivněna přítomností testosteronu hlavně u EMJ. U EMH byl trend zpočátku mírný, po skončení aplikace došlo k poklesu. Znak přetrvával u EMH ještě 16 týdnů po ukončení aplikace testosteronu (z toho 6 týdnů ve srovnatelném rozsahu s obdobím aplikace) u EMH a 23 týdnů u EMJ (z toho 19 týdnů ve srovnatelném rozsahu s obdobím aplikace).



Obr. 7 Proporce jedinců reagujících olizováním na stimul. Modré kosočtverce jsou EMH, červené čtverce EMJ. Nultá natáčecí událost byla bez manipulace.

→ vysoký postoj (Obr. 8)

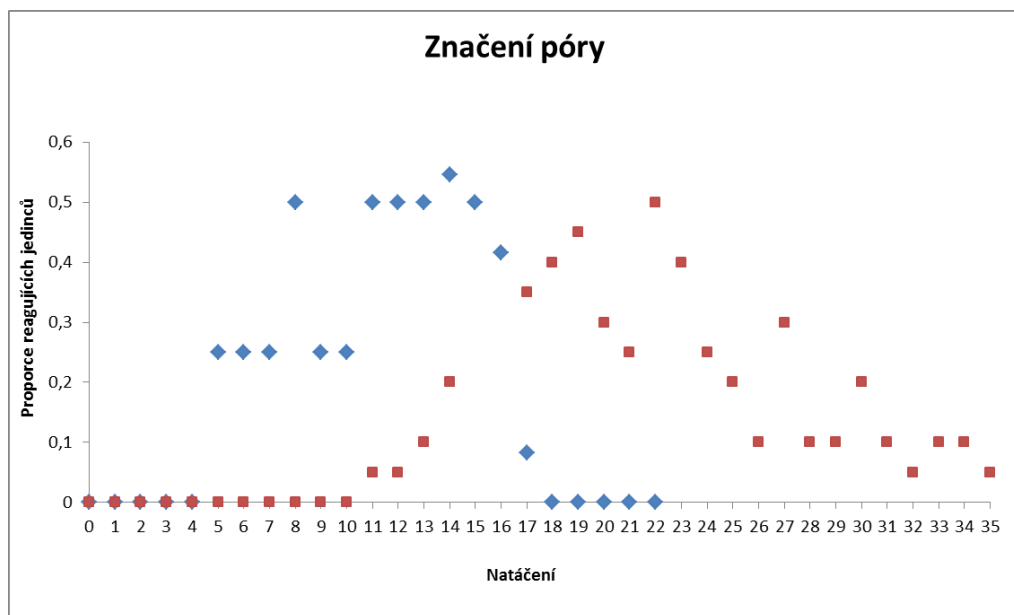
Proporce jedinců, kteří během testování provedli vysoký postoj, byla testosteronem ovlivněna hlavně u skupiny EMH. Skupině EMJ trval nástup déle. Toto chování se objevilo u větší proporce EMH než EMJ. Znak přetrvával u EMH ještě 16 týdnů a u EMJ 23 týdnů po ukončení aplikace testosteronu.



Obr. 8 Proporce jedinců reagujících vysokým postojem na stimul. Modré kosočtverce jsou EMH, červené čtverce EMJ. Nultá natáčecí událost byla bez manipulace.

→ značení substrátu prekloakálními póry (Obr. 9)

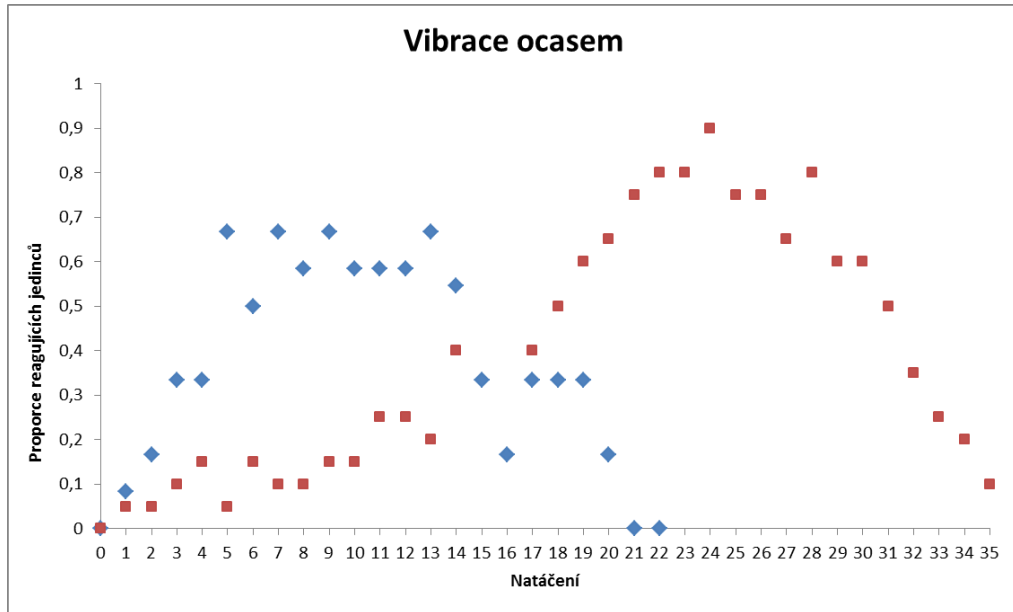
U obou skupin byl znak ovlivněn testosteronem, u EMJ nástup trval déle. U EMH byl patrný strmý pokles po skončení manipulace. U EMJ byl pokles naopak mírný. Znak vymizel u EMH do 8 týdnů po skončení aplikace a jedna EMJ pokračovala v chování po skončení vyhodnocování (po 23 týdnech).



Obr. 9 Proportione jedinců, kteří značili prekloakálními póry substrát během přítomnosti stimulu. Modré kosočtverce jsou EMH, červené čtverce EMJ. Nulová natáčecí událost byla bez manipulace.

→ vibrace ocasem (Obr. 10)

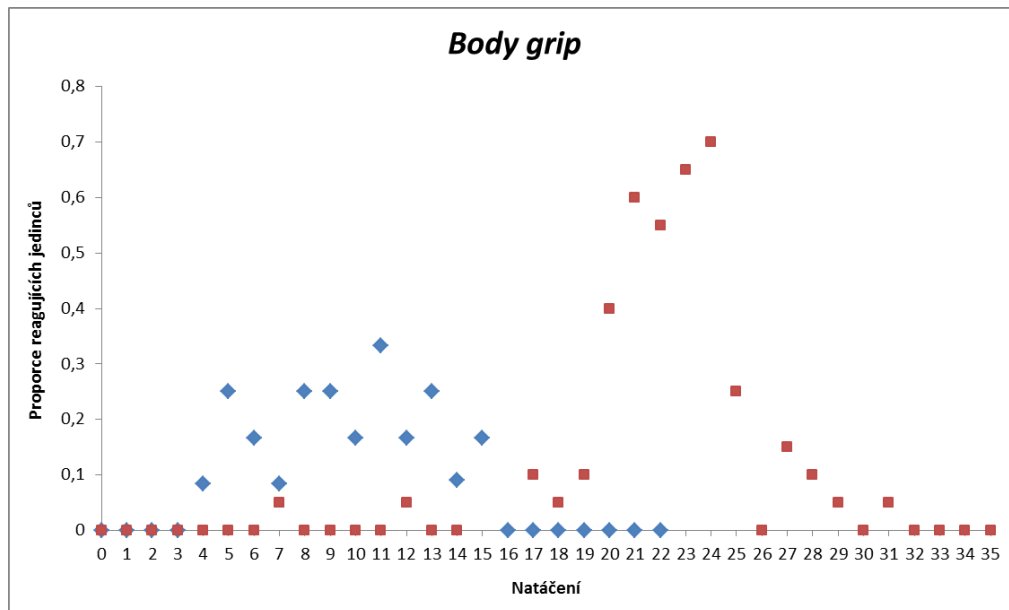
Znak se objevil v reakci na testosteron, ale u obou skupin byl znak přítomný i po skončení manipulace. U EMJ byl patrný pomalý nástup i pokles. Znak vymizel u EMH do 14 týdnů po ukončení aplikace, ale dvě EMJ pokračovaly v chování ještě po skončení vyhodnocování (tedy po 23 týdnech).



Obr. 10 Proporce jedinců, kteří vibrovali ocasem v přítomnosti stimulu. Modré kosočtverce jsou EMH, červené čtverce EMJ. Nultá natáčecí událost byla bez manipulace.

→ *body grip* (Obr. 11)

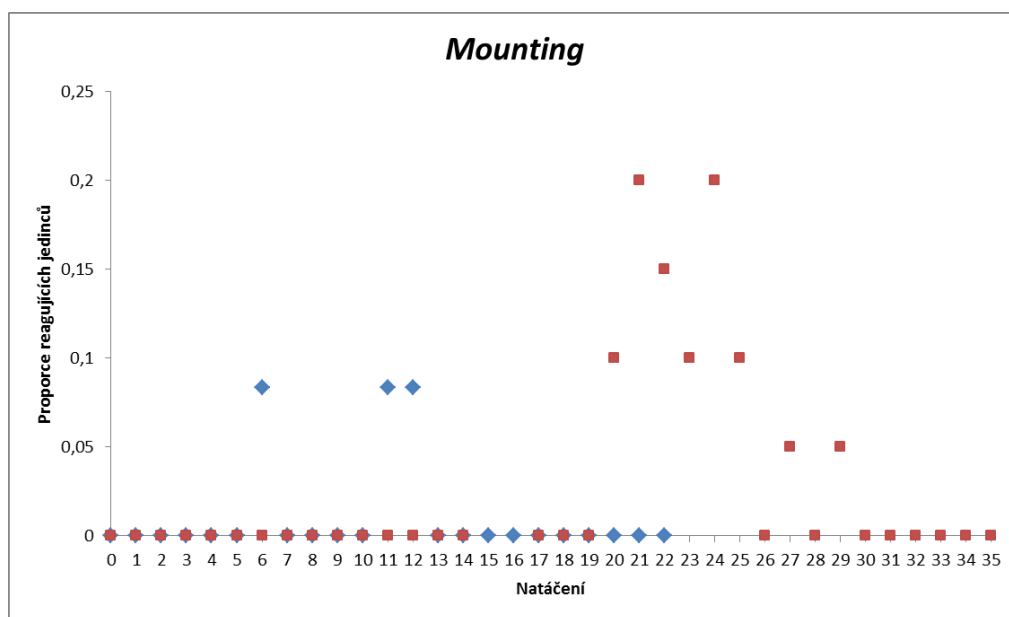
Body grip byl ovlivněn aplikací testosteronu. U obou skupin po skončení aplikace poměrně rychle klesl, zřejmě byl více závislý na aktuálních hladinách než vibrace ocasem. Jedná se o znak, který závisí i na vyladění stimulu, proto jeho frekvence nebyla nijak vysoká. Znak vymizel u EMH do 4 týdnů a u EMJ do 17 od ukončení aplikace testosteronu.



Obr. 11 Proportion of individuals who performed *body grip* in response to the stimulus. Blue diamonds represent EMH, red squares represent EMJ. The zero rotation event was without manipulation.

→ *mounting* (Obr. 12)

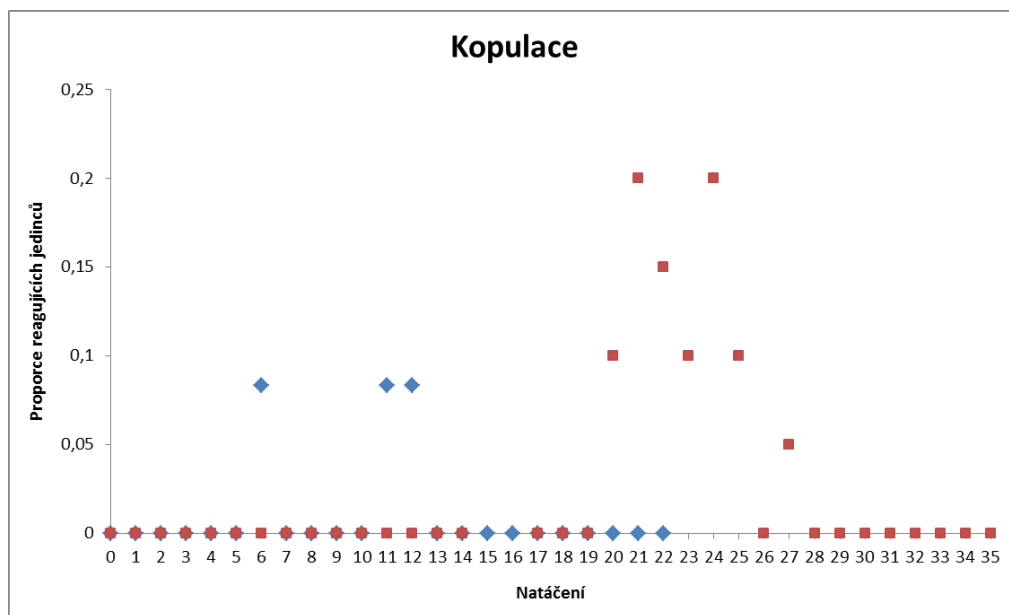
Tento znak je přímo závislý na receptivitě samice a na znaku *body grip*, proto jeho frekvence nebyla příliš velká. Přesto je velmi pravděpodobné, že je spouštěn testosteronem, protože tento znak nebyl před manipulací patrný. Následně po tomto znaku většina jedinců kopulovala, rozdíl je jen u jedné EMJ. Znak vymizel u EMJ do 13 týdnů od ukončení aplikace.



Obr. 12 Proporce jedinců, kteří provedli *mounting* během přítomnosti stimulu. Modré kosočtverce jsou EMH, červené čtverce EMJ. Nultá natáčetí událost byla bez manipulace.

→ kopulace (Obr. 13)

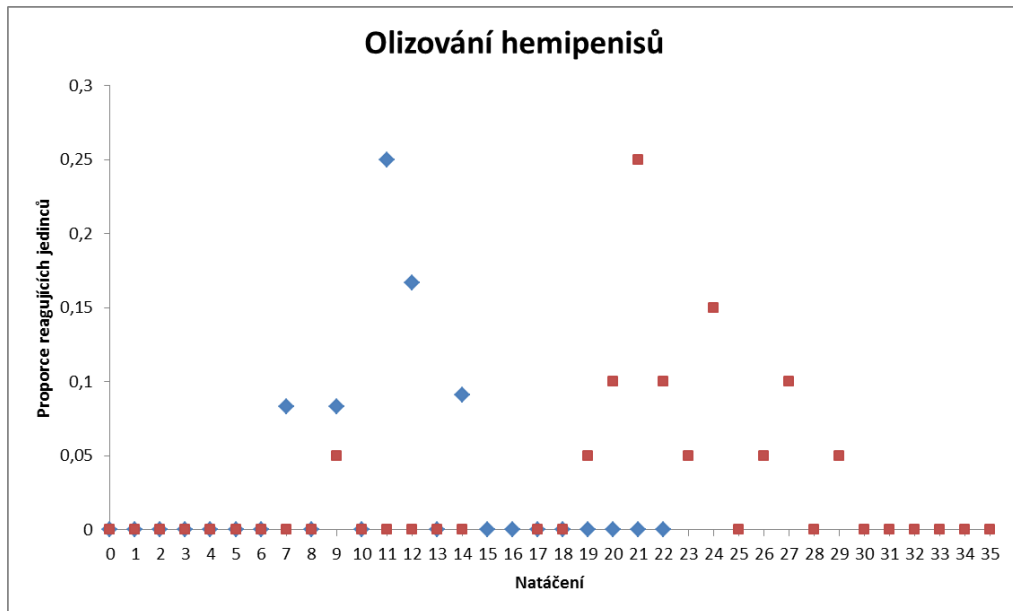
Znak přímo závislý na receptivitě samice a na znacích *body grip* a *mounting*, proto jeho frekvence nebyla příliš velká. Přesto je velmi pravděpodobné, že je ovlivněn testosteronem. U EMJ bylo pozorováno osm případů kopulace v rámci 7 týdnů po skončení manipulace.



Obr. 13 Proporce jedinců, kteří kopulovali se samičím stimulem. Modré kosočtverce jsou EMH, červené čtverce EMJ. Nulná natáčecí událost byla bez manipulace.

→ olizování hemipenisů (Obr. 14)

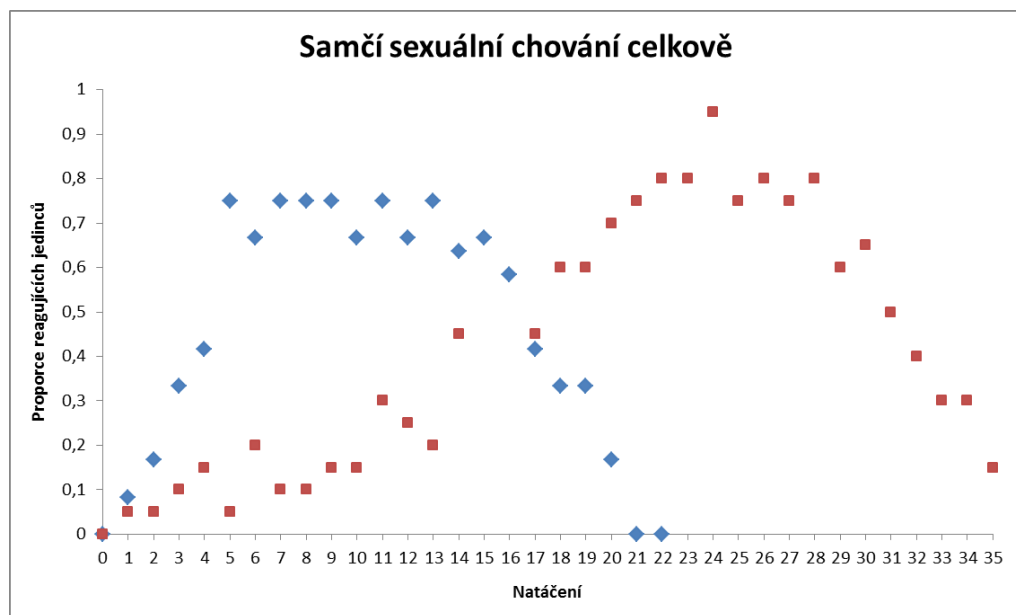
Znak ovlivněný testosteronem. Jeho frekvence byla nízká, nastával téměř výhradně po kopulaci, jistě ovlivněn dalšími faktory Znak u EMJ vymizel do 11 týdnů po ukončení aplikace testosteronu.



Obr. 14 Proportion of individuals who licked hemipenises. Blue diamonds are EMH, red squares EMJ. Zero manipulation event was without manipulation.

→ samčí sexuální chování celkově (Obr. 15)

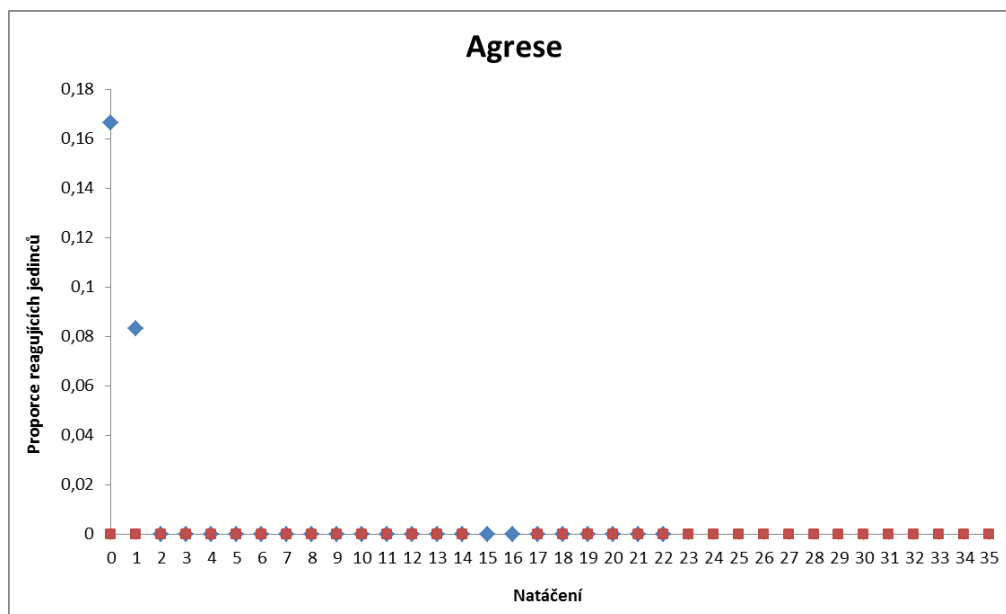
Jedná se o znázornění přítomnosti sexuálního chování jako celku. Bylo několik jedinců, kteří během některých natáčecích událostí nevíbrovali ocasem, ale jinak projevovali o stimul velký zájem či vykazovali další známky samčího sexuálního chování (značení póry, body grip, olizování hemipenisů). Samčí sexuální chování je spouštěno testosteronem, ale jeho vyhasínání na testosteronu přímo závislé není. U skupiny EMH vyhaslo do 10 týdnů po ukončení aplikace, tři EMJ pokračovaly v projevech samčího sexuálního chování po skončení vyhodnocování (po 23 týdnech).



Obr. 15 Proportione jedinců, kteří projevovali některý z prvků samčího sexuálního chování jako reakci na samčí stimul. Modré kosočtverce jsou EMH, červené čtverce EMJ. Nultá natáčecí událost byla bez manipulace.

→ agrese (Obr. 16)

V tomto experimentu se jednalo o znak řídce zastoupený. Zaznamenala jsem pouze tři události, z toho dvě ještě před počátkem aplikace hormonu. Je pravděpodobné, že testosteron neindukuje agresi vůči samičímu stimulu.



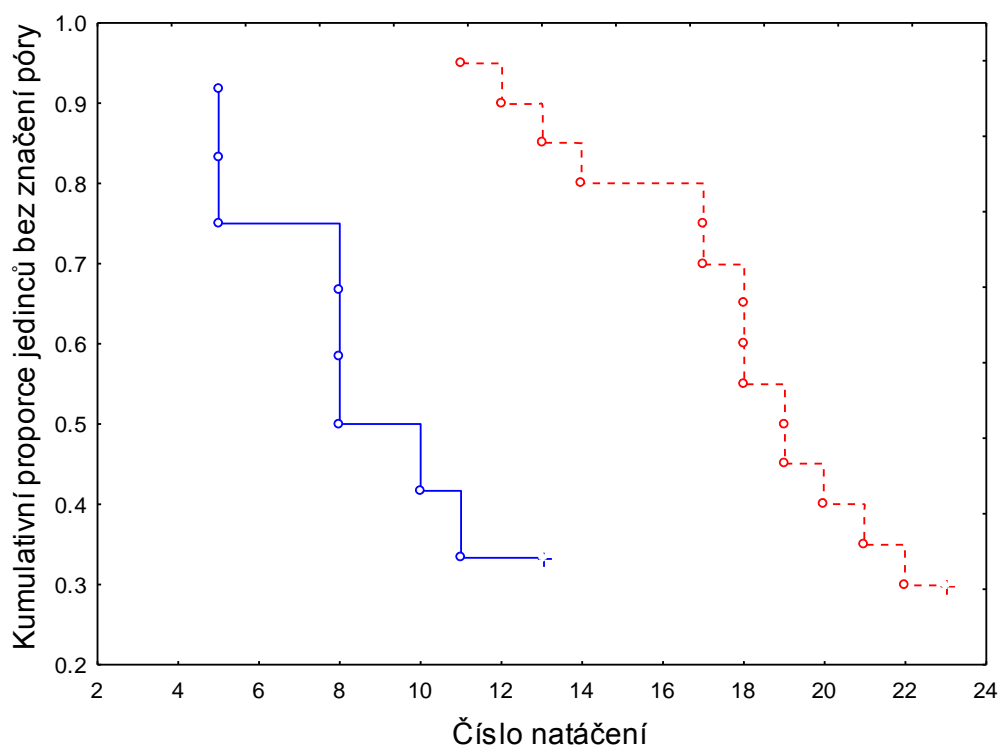
Obr. 16 Proporce jedinců, kteří se chovali agresivně vůči samičímu stimulu. Modré kosočtverce jsou EMH, červené čtverce EMJ. Nultá natáčecí událost byla bez manipulace.

3.2.2.3. Průběh nástupu a vyhasínání samčího sexuálního chování

Modelování nástupu nejdůležitějších prvků samčího sexuálního chování (značení póry, vibrace ocasem, sexuální chování celkově) proběhlo pomocí analýzy přežívání (Gehanův-Wilcoxonův test). Jedná se o kumulativní funkci nástupu, vypočítanou na základě prvního pozorování chování u každého jedince.

→ nástup značení póry

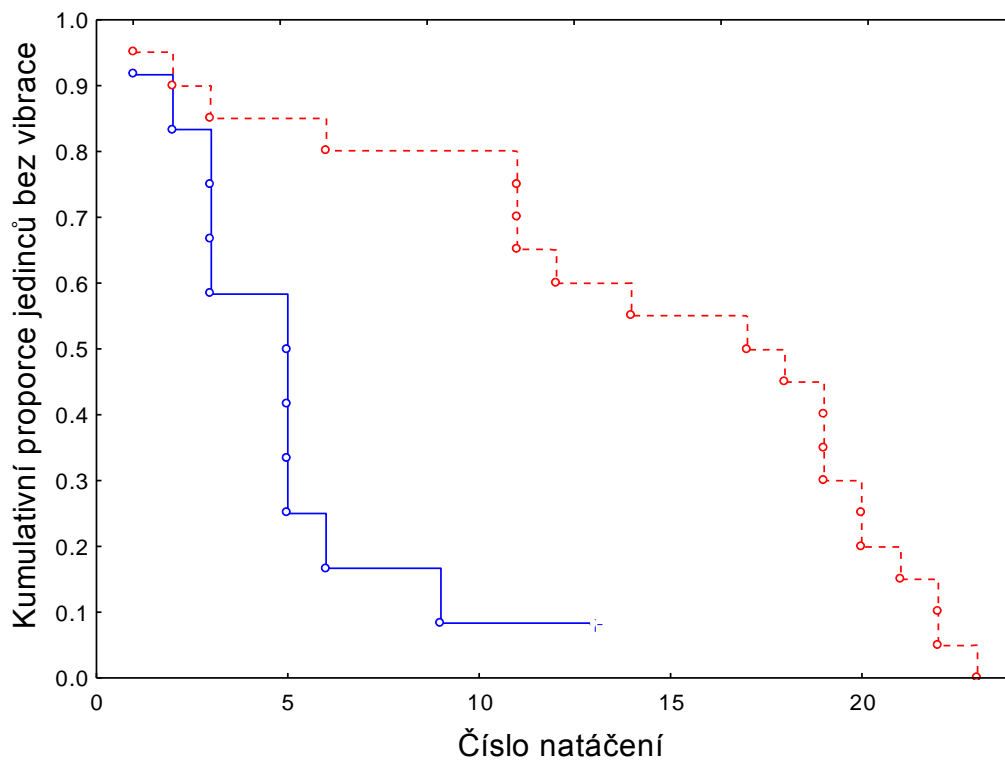
Skupiny se mezi sebou signifikantně liší v nástupu značení substrátu prekloakálními póry (Gehanův-Wilcoxonův test: testová statistika = -3,07792, $p = 0,002$; Obr. 17). U EMH trval nástup značení póry minimálně 9 týdnů, u EMJ 21 týdnů.



Obr. 17 Kumulativní proporce jedinců bez značení s póry. Modře EMH, červeně EMJ. Kolečka označují konkrétní nástup chování, křížky ukazují proporce zvířat, u kterých značení póry nezačalo do konce manipulace.

→ nástup vibrací ocasem

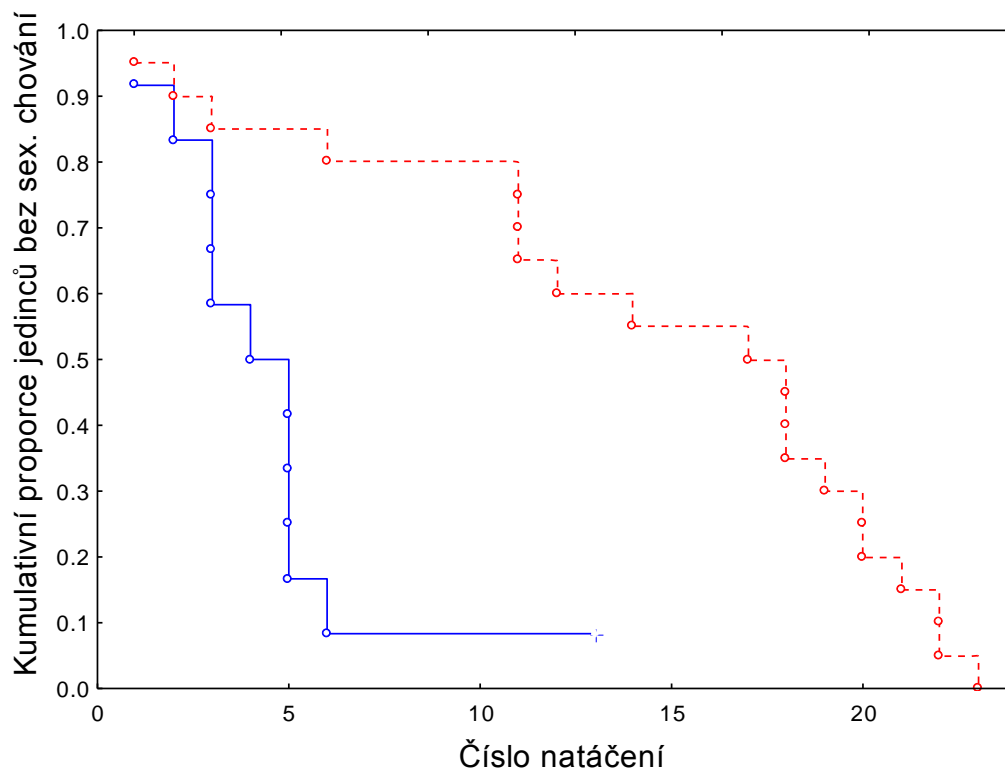
Skupiny se mezi sebou signifikantně liší v nástupu vibrace ocasem (Gehanův-Wilcoxonův test: testová statistika = -3,00852, $p = 0,003$; Obr. 18). U EMH byl nástup vibrace ocasem patrný už po jednom týdnu a u EMJ také po jednom týdnu.



Obr. 18 Kumulativní proporce jedinců bez vibrací ocasem. Modře EMH, červeně EMJ. Kolečka označují konkrétní nástup chování, křížky ukazují proporce zvířat, u kterých vibrace ocasem nezačala do konce manipulace.

→ nástup samčího sexuálního chování celkově

Skupiny se mezi sebou signifikantně liší v nástupu samčího sexuálního chování (Gehanův-Wilcoxonův test: testová statistika = -3,04785, $p = 0,002$; Obr. 19). U EMH trval nástup samčího sexuálního chování minimálně jeden týden a u EMJ také minimálně jeden týden.

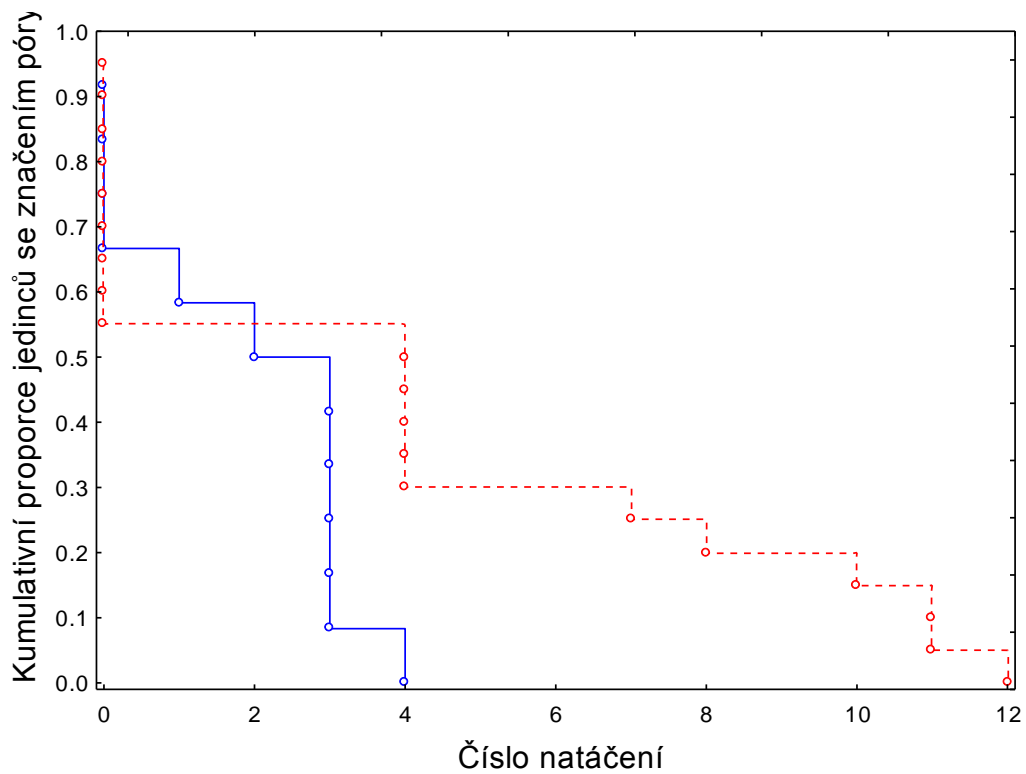


Obr. 19 Kumulativní proporce jedinců bez samčího sexuálního chování. Modře EMH, červeně EMJ. Kolečka označují konkrétní nástup chování, křížky ukazují proporce zvířat, u kterých samčí sexuální chování nezačalo do konce manipulace.

Modelování vyhasínání nejdůležitějších prvků samčího sexuálního chování (značení póry, vibrace ocasem, sexuální chování celkově) po skončení manipulace pomocí analýzy přežívání (Gehanův-Wilcoxonův test). Jedná se o kumulativní funkci vyhasínání, vypočítanou na základě posledního pozorování prvku chování u každého jedince.

→ vyhasínání značení póry

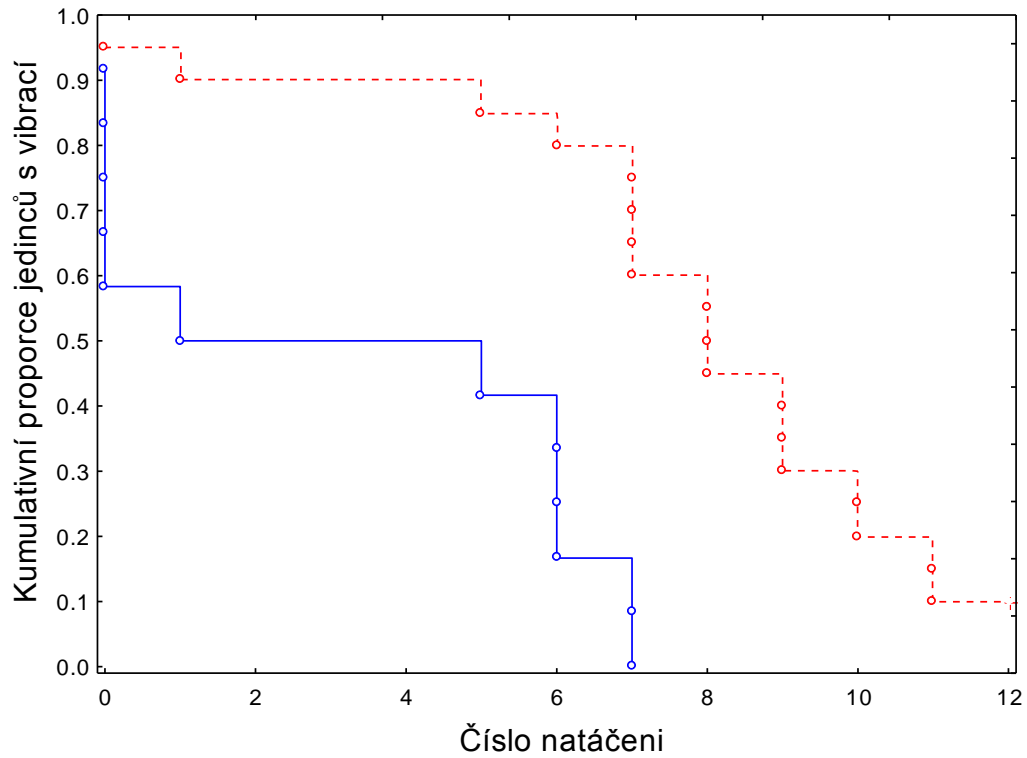
Skupiny se mezi sebou signifikantně neliší ve vyhasínání značení póry (Gehanův-Wilcoxonův test: testová statistika = -1,09392, $p = 0,274$; Obr. 20). U EMH trvalo vyhasínání značení póry 8 týdnů, u EMJ minimálně 23 týdnů.



Obr. 20 Kumulativní proporce jedinců se značením prekloakálními póry. Modře EMH, červeně EMJ. Kolečka označují konkrétní vymizení chování.

→ vyhasínání vibrace ocasem

Skupiny se mezi sebou významně liší ve vyhasínání vibrací ocasem (Gehanův-Wilcoxonův test: testová statistika = -3,55312, $p = 0,00038$; Obr 21). U EMH trvalo vyhasínání vibrace ocasem 14 týdnů, u EMJ byli dva jedinci ještě po 23 týdnech aktivní.

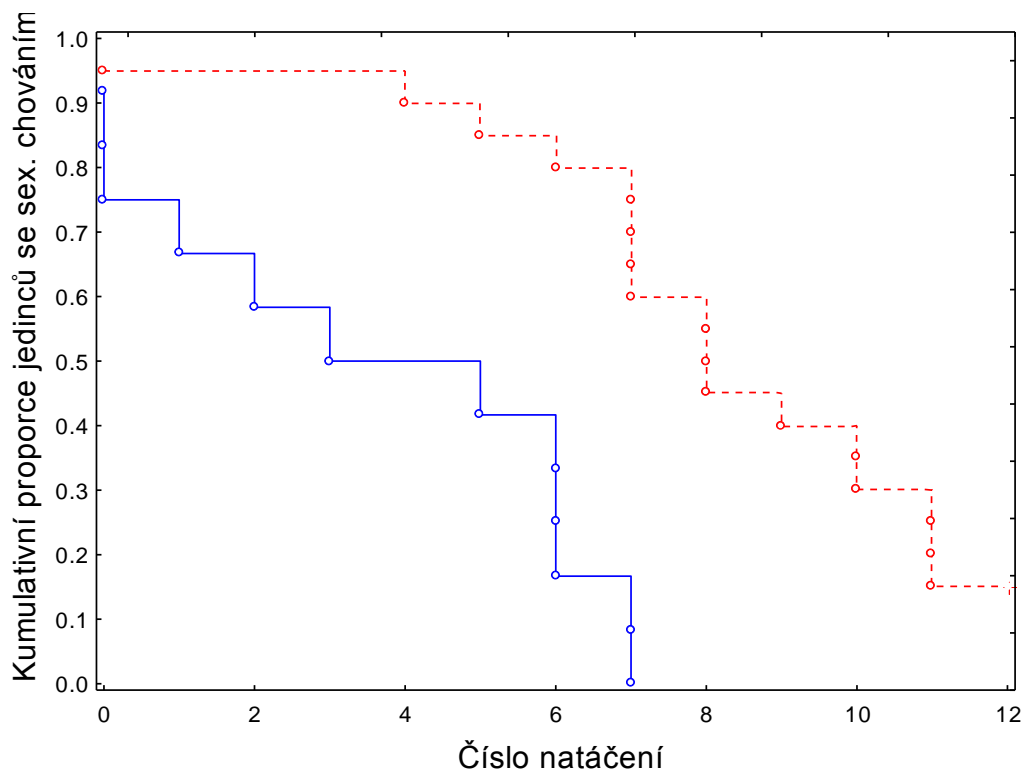


Obr. 21 Kumulativní proporce jedinců s vibrací ocasem. Modře EMH, červeně EMJ. Kolečka označují konkrétní vymizení chování, křížky ukazují proporci zvířat, u kterých chování nevyhaselo do konce vyhodnocování.

→ vyhasínání samčího sexuálního chování

Skupiny se mezi sebou signifikantně liší ve vyhasínání celkového samčího sexuálního chování (Gehanův-Wilcoxonův test: testová statistika = -3,52561, $p = 0,00042$; Obr. 22).

U EMH trvalo vyhasínání samčího sexuálního chování 14 týdnů, u EMJ byli tři jedinci ještě po 23 týdnech od skončení aplikace sexuálně aktivní.



Obr. 22 Kumulativní proporce jedinců se sexuálním chováním. Modře EMH, červeně EMJ. Kolečka označují konkrétní vymizení chování, křížky ukazují proporci zvířat, u kterých chování nevyvymizelo do konce vyhodnocování.

4. DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak androgeny (konkrétně testosteron) časově ovlivňují jednotlivé prvky samčího sexuálního chování a zda jejich působení lépe odpovídá konceptu dočasné organizace, nebo klasickým konceptům organizace a aktivity. K testu jsem použila natáčení behaviorálních interakcí v dlouhých časových řadách, které pomohly odhalit, jak kastrování samci a intaktní samice gekončíka nočního reagují na hormonální manipulaci testosteronem. Zaměřila jsem se na to, které znaky tato manipulace spouští, zda vůbec a jak dlouho tento vliv vydrží po ukončení aplikace exogenního testosteronu.

4.1. Vliv manipulace na hladiny testosteronu v krvi

Metoda manipulace s hladinami testosteronu u testovaných zvířat byla úspěšná, jak u obou skupin potvrdily opakované rozборы krevní plasmy (Obr. 5 a Obr. 6). Trend nárůstu a později poklesu hladin testosteronu byl u obou manipulovaných skupin stejný. Obě skupiny měly před aplikací hladiny nízké. Přestože neznám hodnoty testosteronu pro EMJ z doby před manipulací, předpokládám, že počáteční hladiny byly obdobné, jaké můžeme najít u intaktních samic. Tyto hladiny kolísají v závislosti na fázi samičího reprodukčního cyklu, ale celkově jsou podstatně nižší než hladiny intaktních samců (Tousignant a Crews 1995; Rhen a kol. 2000). Výsledky odběrů po čtrnácti týdnech aplikace již ukázaly značně zvýšené hladiny, ale stále ještě nedosahovaly hodnot intaktních samců. Proto jsem se rozhodla pro zdvojnásobení dávky aplikovaného testosteronu. Dávka 3 $\mu\text{g/g}$ byla dostatečná pro navození hladin srovnatelných s kontrolními samci. Tři týdny po konci aplikace ukázaly výsledky odběrů podle očekávání opět nízké hladiny testosteronu. Testosteron již nemohl přímo ovlivňovat samčí chování.

Pokud je mně známo, šlo o první manipulaci hladinami testosteronu aplikací na kůži, jedním důležitým závěrem mé práce tedy je, že tato relativně neinvazivní metoda výborně funguje.

4.2. Vliv manipulace na samčí znaky

4.2.1. Rozsah vyvolaných změn v morfologii a chování

Pokus ukázal, že experimentální dodání testosteronu má vliv na vývoj typicky samčích znaků, jako je samčí sexuální chování a morfologie. Testosteron je schopen vyvolat všechny základní prvky samčího sexuálního chování u obou zkoumaných skupin. Chování, které se podáváním hormonu podařilo indukovat, je v souladu s chováním intaktních rozmnožujících se samců. U manipulovaných samic bylo vyvolané chování ve stejné míře jako u kastrovaných samců, přestože účinek testosteronu v takovém rozsahu nebyl nikdy dříve nalezen, což vedlo předchozí autory k závěru, že aspoň některé části samčího sexuálního chování vyžadují ranou organizaci a nemohou být u adultních samic vyvolány exogenním testosteronem (Flores a Crews 1995; Rhen a Crews 1999). Manipulované samice byly schopny demonstrovat vibrace a značení prekloakálními póry v reakci na samičí stimul a při kontaktu s receptivním stimulem předváděly *body-grip*, *mounting* a následně byly schopny kopulace. Deset z nich bylo schopných kopulovat a to i opakovaně. Úspěšnost indukce samčího sexuálního chování nepřímo podporuje i fakt, že pět samičích stimulů během experimentu sneslo neoplozená vejce, pravděpodobně v důsledku interakce s manipulovanými jedinci.

Testosteron měl vliv na rozvoj vnějších morfologických struktur typických pro samce gekončíka nočního. Ty byly ovlivněny téměř totožně u obou manipulovaných skupin. U samců i samic se během experimentu vyvinuly zvětšené hemipenisy, subkloakální vaky a opaleskulící spodní strana těla. U samic na rozdíl od samců nedošlo k rozvoji preakloakálních pórů, proto samice nikdy aktivně nesekretovaly, ačkoli u nich bylo chování spojené se značením substrátu těmito póry běžně pozorováno. Po odstranění zdroje testosteronu došlo k postupné regresi samčích struktur, mezi prvními vymizela opalizace spodní strany těla, pak aktivní póry a nejdéle přetrvaly výrazné subkloakální vaky s hemipenisy. U části samic se již obnovil reprodukční cyklus (mají vitelogenní folikuly patrné přes břišní stěnu).

4.2.2. Průběh nástupu a vyhasínání samčího sexuálního chování

Ačkoli experiment ukázal, že exogenní testosteron je schopný indukovat všechny prvky samčího sexuálního chování u obou manipulovaných skupin, trend nástupu

nejdůležitějších znaků se mezi oběma testovanými skupinami liší, u samic trvá nástup déle. Průběh nástupu byl testován u nejčastěji se vyskytujících znaků a potvrdilo se, že průběh nástupu značení póry, vibrací a celkového sexuální chování se mezi manipulovanými skupinami signifikantně liší (Obr. 17, 18, 19). Samice reagují na manipulaci testosteronem po mnohem delší době než prepubertálně kastrování samci. Jedním z možných vysvětlení by mohla být interference manipulace se samičími gonadálními hormony. Exogenní testosteron vede u samic gekonů k regresi ovárií (Kubička a kol. 2013), přesto i ty mohou být enzymaticky či hormonálně aktivní. Tuto hypotézu by šlo v budoucnu otestovat zařazením ovariektomizovaných samic. Také je důležité mít na paměti, že skupiny se mezi sebou lišily stářím v počátku manipulace (prepubertální samice vs. plně vzrostlí samci). Roli může hrát i rozdílná inkubační teplota (28 °C u samic vs. 30 °C u kastrováných samců).

Z experimentu dále vyplývá, že jednotlivé prvky samčího chování se mezi sebou liší svým nástupem a průběhem: vibrace ocasem se u obou skupin objevuje dříve než značení póry, značení póry i rychleji mizí, rozdílný nástup má i *body-grip* a kopulace v porovnání s vibrací (Obr. 9, 10, 11, 13). U všech však pozorujeme postupný nástup po aplikaci testosteronu a postupné mizení po jejím ukončení. Zdá se tedy, že testosteron ovlivňuje expresi jednotlivých prvků samčího sexuálního chování a to podle stejného schématu, prvky se jen liší v „načasování“. Rozdíly v načasování byly patrně příčinou, proč předchozí autoři, např. Golinski et al. (2011b), došli k pravděpodobně chybnému závěru, že dvoření (hlavně vibrace) a kopulace by mohly být u gekončičků řízeny jinými hormony.

Po skončení aplikace hormonu se prokázalo, že samčí sexuální chování má schopnost přetrvávat delší dobu bez přítomnosti testosteronu (nízké hladiny testosteronu byly potvrzeny krevními rozbory), než by odpovídalo konceptu aktivace. Nejdříve došlo k vymizení prvků páření. Z tohoto důvodu se možnost navržená autory Golinski a kol. (2011b), že prvky páření mohou být nezávislé na testosteronu, ale pro úspěšnou kopulaci je nutné dvoření, které na testosteronu závisí, zdá nepravděpodobná. Výsledky u gekončíka nočního hovoří spíše ve prospěch konceptu dočasné organizace. Hormonální manipulace pomocí testosteronu indukovala samčí sexuální chování u obou skupin a ukončení aplikace nemělo na toto chování okamžitý efekt, stejně jako tomu bylo předtím u gekončíka *Coleonyx elegans* (Golinski a kol. 2011b). Data od obou druhů gekončičků odpovídají spíše dočasnému organizačnímu působení hormonů v dospělosti.

Průběh vyhasínání základních prvků samčího sexuálního chování se lišil mezi testovanými skupinami, jedinou výjimkou bylo značení póry, kde byl průběh podobný u obou skupin (Obr. 20). U samic bylo vyhasínání samčího sexuálního chování pomalejší než u EMH, 10 týdnů po ukončení aplikace testosteronu si zachovalo schopnost sexuálního chování 85 % EMJ a jen 40 % EMH. 40 % EMJ si tuto schopnost zachovalo ještě 19 týdnů po ukončení aplikace.

Zajímavým zjištěním bylo, že po dlouhodobé aplikaci část jedinců vibrovala ocasem v reakci na přenesení do arény, kde se měli podrobit behaviorálnímu testování. Podobné chování pozorovali Sakata a Crews (2003). Design jejich experimentu spočíval v tom, že nejdříve experimentátoři vyndali ven všechno vybavení z domácího terária intaktních samců, ti byli poté necháni pět minut kvůli habituaci a až poté byla do terária vložena receptivní samice. Každý z 24 samců se zúčastnil deseti testování a vibrace před přítomností stimulu byla pozorována v šesti případech a to hlavně v posledních čtyřech testech. Autoři to vysvětlují tak, že odstranění vybavení z terária signalizovalo samcům budoucí přítomnost samice a samci mohli očekávat možnost k páření. V mém experimentu tomu bylo podobně. Toto chování jsem poprvé u manipulovaných samic pozorovala 41 týdnů od počátku aplikace a pokračovalo i po skončení aplikace. Celkově takto reagovalo jedenáct EMJ, všechny ihned poté vibrovaly i na předložený stimul. Bohužel, tyto situace nebyly zaznamenány kamerou, proto je nebylo možné zpětně zhodnotit. Není jasné, zda mohl mít mechanismus spouštějící vibrace před interakcí se stimulem vliv na přetrvání sexuálního chování po skončení manipulace. U gekončíka nočního nebyl prokázán vliv sociálních zkušeností na sexuální chování po kastraci v porovnání s naivními jedinci (Sakata a kol. 2002), předpokládám tedy, že to samé platí pro případ odstranění zdroje exogenního testosteronu. Sakata a Crews (2003) jev předčasné vibrace pozorovali na intaktních samcích. Je možné, byť značně spekulativní, že by se mohlo jednat o asociativní učení, kdy by si samci mohli situaci (manipulaci s terárií či předměty), která vždy předcházela přítomnosti samice, spojit s přítomností samice a podmíněně na tuto situaci reagovali. V budoucnosti by bylo zajímavé tento efekt prozkoumat podrobněji, pokud by se potvrdil, teorie o pohlavním výběru by měla více akcentovat roli učení.

4.3. Důsledky designu experimentů

Na základě mé diplomové práce se zdá pravděpodobné, že pro žádnou součást samčího sexuálního chování gekončíka nočního není nezbytně nutná časná organizace během embryonálního vývoje. Obě pohlaví v dospělosti reagují na dodání testosteronu změnou v chování. Tento výsledek by naznačoval, že obě pohlaví mají pravděpodobně zachované plastické nervové dráhy, které mohou být v dospělosti ovlivněny hladinami cirkulujících hormonů. Tyto výsledky se neshodují s údaji, které publikovali Rhen a Crews (1999), ačkoli v jejich práci byly sledovány kastrované samice na rozdíl od mého experimentu. Rhen a Crews (1999) poukázali na to, že samice gekončíka nočního ocasem vibrují jen málo, nepředvádějí *body-grip* a nikdy neznačí póry substrát a to ani při stejné manipulaci, která tato chování spouští u kastrovaných samců. Domnívali se, že u většiny prvků samčího sexuálního chování je pravděpodobně nutná organizace v embryonálním věku a následná aktivace v dospělosti cirkulujícími hladinami pohlavních hormonů.

Na základě mých výsledků je pravděpodobnější možnost, že přechodné zvýšení hladin androgenů v krvi vede k dočasné organizaci nervových drah. Ta nemusí být podle účinků jednoduše rozlišitelná. Pro odlišení aktivace a dočasné organizace chování je nutné provést odstranění hlavního zdroje hormonů (gonády, implantáty) a sledovat vymizení daného chování v čase.

Důvodem, proč některé prvky sexuálního chování nebyly u samic dříve pozorovány, by mohlo být způsobeno jejich pomalejším nástupem. Rhen a Crews (1999) uskutečnili své experimenty pouhé 4 týdny po zavedení hormonálních implantátů, v té době u samic ještě nemusely být naorganizovány všechny nervové obvody. Naopak Golinski a kol. (2011b) realizovali testování samic se samičím stimulem u gekončíka *Coleonyx elegans* 7 týdnů po implantaci a v této práci bylo u samic samčí sexuální chování pozorováno. V mém experimentu se u samic většina prvků samčího sexuálního chování začala pravidelně objevovat až po 29 týdnech manipulace.

Z toho vyplývá, že je nutné řádně naplánovat design experimentů a provádět dlouhodobější sledování, aby se předešlo předčasným nesprávným závěrům. Podle mého názoru by se při experimentálních manipulacích s hormonálním stavem mělo počítat s možností delší časové prodlevy nutné pro indukci všech znaků. Neméně důležité je správné načasování behaviorálního testování. Je vhodné provést opakovaná testování, aby se zachytil celý průběh exprese chování. Tento design je sice velmi pracný, ale pro posouzení vlivu hormonů se ukazuje jako nezbytný.

4.4. Evoluce hormonální kontroly sexuálního chování

Výsledky pocházející z mého experimentu nejsou v souladu se zažitými představami o aktivaci sexuálního chování pohlavními hormony. Mé výsledky společně s daty od *Coleonyx elegans* (Golinski a kol. 2011b) ukazují další, zatím téměř neprozkoumanou možnost regulace sexuálního chování hormony.

Proximální mechanismy regulace sexuálního chování se u živočichů studují již nějakou dobu. Většina zkoumaných druhů byla dosud řazena do skupiny s asociovanou reprodukční strategií. Přesto lze najít několik výjimek, u kterých byla provázanost samčího sexuálního chování s androgeny nejasná. Mezi druhy obratlovců, u kterých kastrace úplně nezrušila sexuální chování, patří *Zonotrichia leucophrys gambelii* (Moore a Kranz, 1983), *Scaphiopus couchi* (Harvey a Propper 1997), *Thamnophis sirtalis parietalis* (Crews a kol. 1984; Krohmer 2004), *Coleonyx elegans* (Golinski a kol. 2011b) a nyní i *Eublepharis macularius* (tato práce). Z této skupiny byla asi nejvíce studována užovka *Thamnophis sirtalis parietalis*, která je považována přímo za zástupce skupiny s disociovanou reprodukční strategií (Camazine a kol. 1980; Crews a kol. 1984; Crews 1991; shrnuto Krohmer 2004). Během některých studií měli samci na počátku reprodukčního období hladiny testosteronu nízké, podle jiných byly hladiny mírně zvýšené, gonády má během odboví rozmnožování v regresi. Další poznatky ukazují, že sexuální chování u samců není aktivováno testosteronem, protože kastrace před zimní hibernací ani po ní samčí sexuální chování nenaruší a dodaný testosteron ho mimo období rozmnožování nespustí, ale pro úspěšné jarní rozmnožování je nutné zvýšení jeho hladiny během předcházejícího roku. Pro *Thamnophis sirtalis parietalis* je výhodné po celou dobu hibernace udržovat schopnost sexuálního chování, která byla naprogramovaná testosteronem během předešlého roku, protože to umožní na jaře rychleji reagovat na příchod samic a nemusí čekat na obnovu činnosti gonád. Může se jednat o adaptaci na extrémní samčí kompetici o samice.

Mechanismus, který umožní přetrvání samčího sexuálního chování po odstranění zdroje testosteronu u *Coleonyx elegans* a *Eublepharis macularius* by mohl být preadaptací pro vznik disociované reprodukční strategie. Zároveň by tento mechanismus mohl být ancestrální pro všechny plazy nebo i pro všechny tetrapodní obratlovce s ohledem na pozorování u *Zonotrichia leucophrys gambelii* a *Scaphiopus couchi*. Při evoluci disociované reprodukční strategie by se mohla jen prodloužit doba vyhasínání sexuálního

chování po poklesu hladin androgenů. Jako rychlost téměř všech biologických dějů, i rychlost vyhasínání by mohla souviset s intenzitou metabolismu, a ten je silně korelován s teplotou těla. U hibernujících plazů by se tak rychlost vyhasínání mohla zpomalit nízkou teplotou, vznik disociované reprodukční strategie by tak mohl být způsoben kombinací dočasné organizace s chladnými podmínkami při zimování.

5. ZÁVĚR

Exogenní testosteron je schopný indukovat u samic i kastrovaných samců gekončíka nočního, *Eublepharis macularius* všechny součásti samčího sexuálního chování, jako jsou prvky fáze dvoření a páření. Nástup samčích znaků je pozvolný, hlavně co se týče samic, ale i ony jsou schopny předvést celý repertoár samčího sexuálního chování. Je zřejmé, že u tohoto druhu není nutná organizace během embryonálního vývoje. Vyhasínání jednotlivých prvků chování je pomalejší, než by odpovídalo aktivační hypotéze. Samčí sexuální chování přetrvává u gekončíka nočního minimálně 10 týdnů po skončení aplikace, což odpovídá konceptu dočasné organizace. Na základě s posledních poznatků může být dočasná organizace rozšířená obecněji, než se předpokládalo, a mechanismus jejího působení by mohl být zásadní pro evoluci disociované reprodukční strategie.

Metoda kožní aplikace testosteronu rozpuštěného v oleji se ukázala jako úspěšná pro účely hormonálních manipulací, je jen málo invazivní a lze ji snadno modifikovat.

Ukázalo se, že pro správné závěry pocházející z manipulačních experimentů je nutné dlouhodobě sledovat nástup a vyhasínání znaků, aby se zachytily všechny významné momenty. Není proto možné srovnávat výsledky experimentů, ve kterých byly manipulované znaky sledovány jen během krátkého časového úseku.

Seznam použité literatury

- Andersen ML, Tufik S. 2006. Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Research Reviews* 51(1):136-143.
- Arnold AP, Breedlove SM. 1985. Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior - A reanalysis. *Hormones and Behavior* 19(4):469-498.
- Belliure J, Clobert J. 2004. Behavioral sensitivity to corticosterone in juveniles of the wall lizard, *Podarcis muralis*. *Physiology & Behavior* 81(1):121-127.
- Bull JJ. 1980. Sex determination in reptiles. *Quarterly Review of Biology* 55(1):3-21.
- Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. 1978a. Conversion of androgen to estrogen and other steroids in vertebrate brain. *American Zoologist* 18(3):511-523.
- Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. 1978b. Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in central nervous-system. *Endocrinology* 103(6):2283-2290.
- Camazine B, Garstka W, Tokarz R, Crews D. 1980. Effects of castration and androgen replacement on male courtship behavior in the red-sided garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*). *Hormones and Behavior* 14(4):358-372.
- Coomer P, Crews D, GonzalezLima F. 1997. Independent effects of incubation temperature and gonadal sex on the volume and metabolic capacity of brain nuclei in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*), a lizard with temperature-dependent sex determination. *Journal of Comparative Neurology* 380(3):409-421.
- Cooper WE, Mendonca MT, Vitt LJ. 1987. Induction of orange head coloration and activation of courtship and aggression by testosterone in the male broad-headed skink (*Eumeces laticeps*). *Journal of Herpetology* 21(2):96-101.
- Cooper WE, Steele LJ. 1997. Pheromonal discrimination of sex by male and female leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Journal of Chemical Ecology* 23(12):2967-2977.
- Crews D. 1984. Gamete production, sex-hormone secretion, and mating behavior uncoupled. *Hormones and Behavior* 18(1):22-28.
- Crews D. 1991. Trans-seasonal action of androgen in the control of spring courtship behavior in male red-sided garter snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(9):3545-3548.

- Crews D, Camazine B, Diamond M, Mason R, Tokarz RR, Garstka WR. 1984. Hormonal independence of courtship behavior in the male garter snake. *Hormones and Behavior* 18(1):29-41.
- Crews D, Coomber P, Baldwin R, Azad N, GonzalezLima F. 1996. Brain organization in a reptile lacking sex chromosomes: Effects of gonadectomy and exogenous testosterone. *Hormones and Behavior* 30(4):474-486.
- Crews D, Traina V, Wetzel FT, Muller C. 1978. Hormonal control of male reproductive behavior in lizard, *Anolis carolinensis* - Role of testosterone, dihydrotestosterone, and estradiol. *Endocrinology* 103(5):1814-1821.
- Deperno CS, Cooper WE. 1996. Labial-licking for chemical sampling by the leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *Journal of Herpetology* 30(4):540-543.
- Ferguson GW. 1966. Effect of follicle-stimulating hormone and testosterone propionate on reproduction of side blotched lizard *Uta stansburiana*. *Copeia*(3):495-&.
- Flores D, Tousignant A, Crews D. 1994. Incubation temperature affects the behavior of adult leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Physiology & Behavior* 55(6):1067-1072.
- 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. *Hormones and Behavior* 29(4):458-473.
- Golinski A, Kubicka L, Brynildsen T, Kratochvil L, John-Alder H. 2011a. Androgen-dependence of Male-typical Sexual and Aggressive Behavior in *Paroedura picta*; A Comparative Study in Gecko Lizards – poster
- Golinski A, John-Alder H, Kratochvil L. 2011b. Male sexual behavior does not require elevated testosterone in a lizard (*Coleonyx elegans*, *Eublepharidae*). *Hormones and Behavior* 59(1):144-150.
- Gutzke WHN, Crews D. 1988. Embryonic temperature determines adult sexuality in a reptile. *Nature* 332(6167):832-834.
- Harvey LA, Propper CR. 1997. Effects of androgens on male sexual behavior and secondary sex characters in the explosively breeding spadefoot toad, *Scaphiopus couchii*. *Hormones and Behavior* 31(1):89-96.
- Holmes MM, 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):439-445.

- Kirschener A, Seufer H, Kaverkin Y. 2005. The eyelash geckos: Care, breeding and natural history. Kirschener and Seufer-Verlag, Germany
- Krohmer RW. 2004. The male red-sided garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*): Reproductive pattern and behavior. *Illar Journal* 45(1):65-74.
- Kubicka L, Golinski A, John-Alder H, Kratochvil L. 2013. Ontogeny of pronounced female-biased sexual size dimorphism in the Malaysian cat gecko (*Aeluroscalabotes felinus*: Squamata: Eublepharidae): A test of the role of testosterone in growth regulation. *General and Comparative Endocrinology* 188:183-188.
- Mason P, Adkins EK. 1976. Hormones and social behavior in lizard, *Anolis carolinensis*. *Hormones and Behavior* 7(1):75-86.
- Mason RT, Gutzke WHN. 1990. Sex recognition in the leopard gecko, *Eublepharis macularius* (Sauria, Gekkonidae) possible mediation by skin-derived semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology* 16(1):27-36.
- Meylan S, Dufty AM, Clobert J. 2003. The effect of transdermal corticosterone application on plasma corticosterone levels in pregnant *Lacerta vivipara*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 134(3):497-503.
- Moore MC. 1987. Castration affects territorial and sexual behavior of free living male lizards, *Sceloporus jarrovi*. *Animal Behaviour* 35:1193-1199.
- Moore MC. 1991. Application of organization activation theory to alternative male reproductive strategies - A review. *Hormones and Behavior* 25(2):154-179.
- Moore MC, Kranz R. 1983. Evidence for androgen independence of male mounting behavior in white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Hormones and Behavior* 17(4):414-423.
- Noble GK, Greenberg B. 1941. Effects of seasons, castration and crystalline sex hormones upon the urogenital system and sexual behavior of the lizard (*Anolis carolinensis*) I The adult female. *Journal of Experimental Zoology* 88(3):451-479.
- Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65(3):369-382.
- Putz O, Crews D. 2006. Embryonic origin of mate choice in a lizard with temperature-dependent sex determination. *Developmental Psychobiology* 48(1):29-38.

- Rhen T, Crews D. 1999. Embryonic temperature and gonadal sex organize male-typical sexual and aggressive behavior in a lizard with temperature-dependent sex determination. *Endocrinology* 140(10):4501-4508.
- Rhen T, Crews D. 2000. Organization and activation of sexual and agonistic behavior in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Neuroendocrinology* 71(4):252-261.
- 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):119-128.
- Rhen T, Sakata IT, Crews D. 2005. Effects of gonadal sex and incubation temperature on the ontogeny of gonadal steroid concentrations and secondary sex structures in leopard geckos, *Eublepharis macularius*. *General and Comparative Endocrinology* 142(3):289-296.
- Rhen T, Sakata JT, Zeller M, Crews D. 2000. Sex steroid levels across the reproductive cycle of female leopard geckos, *Eublepharis macularius*, from different incubation temperatures. *General and Comparative Endocrinology* 118(2):322-331.
- Sakata JT, Crews D. 2003. Embryonic temperature shapes behavioural change following social experience in male leopard geckos, *Eublepharis macularius*. *Animal Behaviour* 66:839-846.
- Sakata JT, Gupta A, Chuang CP, Crews D. 2002. Social experience affects territorial and reproductive behaviours in male leopard geckos, *Eublepharis macularius*. *Animal Behaviour* 63:487-493.
- Steele LJ, Cooper WE. 1997. Investigations of pheromonal discrimination between conspecific individuals by male and female leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Herpetologica* 53(4):475-484.
- Tokarz RR. 1986. Hormonal regulation of male reproductive behavior in the lizard *Anolis sagrei* - A test of the aromatization hypothesis. *Hormones and Behavior* 20(3):364-377.
- Tousignant A, Crews D. 1995. Incubation temperature and gonadal sex affect growth and physiology in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*), a lizard with temperature-dependent sex determination. *Journal of Morphology* 224(2):159-170.
- Tousignant A, Viets B, Flores D, Crews D. 1995. Ontogenic and social factors affect the endocrinology and timing of reproduction in the female leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *Hormones and Behavior* 29(2):141-153.

- Trompeter WP, Langkilde T. 2011. Invader danger: Lizards faced with novel predators exhibit an altered behavioral response to stress. *Hormones and Behavior* 60(2):152-158.
- Viets BE, Ewert MA, Talent LG, Nelson CE. 1994. Sex determining mechanisms in Squamate reptiles. *Journal of Experimental Zoology* 270(1):45-56.
- Viets BE, Tousignant A, Ewert MA, Nelson CE, Crews D. 1993. Temperature dependent sex determination in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Journal of Experimental Zoology* 265(6):679-683.
- Woolley SC, Sakata JT, Crews D. 2004. Evolutionary insights into the regulation of courtship behavior in male amphibians and reptiles. *Physiology & Behavior* 83(2):347-360.