

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Vliv teploty na pohlaví plazů během inkubace

Bakalářská práce

Tereza Kalcsová

Zootechnika – Speciální chovy

Ing. Tomáš Husák

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv teploty na pohlaví plazů během inkubace" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Tomáši Husákovi za vedení mé bakalářské práce, a také mojí rodině za neustálou a vytrvalou podporu při studiu.

Vliv teploty na pohlaví plazů během inkubace

Souhrn

Plazi jsou široce diverzifikovanou skupinou živočichů, není tedy divu, že právě u nich bylo poprvé objeveno několik způsobů determinace pohlaví. Kromě genotypového určení lze pozorovat i ovlivnění prostředím, z nichž za nejvýznamnější můžeme považovat vliv teploty. Od objevu teplotní determinace v roce 1966 bylo zpracováno mnoho studií, snažících se tento fenomén objasnit, avšak konkrétní mechanismy zpracování teploty jako biologického signálu ke spuštění vývoje určitého pohlaví zůstávají neodhalené.

Tato bakalářská práce byla zpracována jako literární rešerše nejvýznamnějších a nejnovějších poznatků z této oblasti, které mezi sebou porovnává a uceluje. Čtenáře uvedla do problematiky určení pohlaví. Zabývala se možnou funkcí genů a steroidních hormonů při determinaci pohlaví a způsobem zpracování teploty jako biologického signálu buněčnými receptory. Získaná data dala do souvislosti s evolučním významem určení pohlaví teplotou a představila hlavní teorii jeho vzniku. Nastínila také možné scénáře, které do rozmnožování plazů může přinést změna okolního prostředí, jako je například globální oteplování či znečištění. Z nasbíraných výsledků vyplynulo, že v porozumění mechanismu pohlavní determinace došlo k výraznému pokroku, stále však existují mezery, které je třeba vyplnit dalším výzkumem.

Klíčová slova: plazi, vliv prostředí, TSD, determinace pohlaví, rozmnožování

Effects of temperature on reptile sex determination during incubation

Summary

Reptiles represent a widely diversified group of animals. It should not come as a surprise that multiple mechanisms of sex determination were discovered for the first time in this group. In addition to genotypic sex determination, effects of the surrounding environment can be observed, from which the effect of temperature is considered the most significant. Since the first discovery of temperature sex determination, many studies have been conducted to try and explain this phenomenon. Despite this, the specific mechanisms behind processing temperature as a biological signal to initiate specific gonadal differentiation remain undiscovered.

This bachelor thesis was compiled as a literary research paper of recent and most significant findings, which were then compared and unified. The reader was introduced into the aspects of sex determination. It explored possible roles of genes and steroid hormones in sex determination, as well as ways of perceiving temperature as biological signal on cellular level. The gathered data were then put into context with the evolutionary significance of temperature sex determination and introduced the most significant theory of its origins. It then foreshadowed the possible scenarios of environmental changes that can affect reptile breeding, such as global warming or pollution. From the collected results it appears that there has been significant advance of understanding the mechanisms of sex determination, however there are still many unknown aspects which will require further research.

Keywords: reptiles, environmental effects, TSD, sex determination, reproduction

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce.....	8
3 Literární rešerše.....	9
3.1 Determinace pohlaví	9
3.2 Teplotně určené pohlaví	10
3.3 Mechanismus TSD	12
3.3.1 Teplota během TSD	12
3.3.2 Geny podílející se na TSD v plazech.....	13
3.3.3 Steroidní hormony u TSD a jejich vliv	15
3.3.4 Monitorování teploty pomocí buněčného systému	15
3.4 Teorie vzniku TSD	16
3.5 Změny okolních podmínek a vliv na TSD.....	18
4 Závěr	20
5 Literatura.....	21

1 Úvod

Teplota představuje v životě plazů významnou roli. Jako ektotermní živočichové jsou odkázáni na okolní teplotu k zajištění všech fyziologických potřeb - rychlosti jejich metabolismu, frekvence dýchání nebo výkonnosti vnitřních orgánů, jako jsou například ledviny (Pough 1980). Tato závislost se promítá do způsobů chování, rychlosti růstu a také rozmnožování (Vitt & Caldwell 2014).

Dle Bootha (2006) ovlivňuje teplota během inkubace výsledný fenotyp mláďat, jako je velikost, rychlost růstu, chování a poměr pohlaví. Experimentálně bylo například zjištěno, že rychlost růstu mláďat haterie novozélandské (*Sphenodon punctatus* Gray, 1842) po vylíhnutí závisí na výši teploty během inkubace. Mláďata z vajec inkubovaných při nižší teplotě rostla pomaleji a v 10 měsících byla menší než mláďata inkubovaná při teplotách vyšších (Nelson et al. 2004).

Pohlaví je další z faktorů, které u plazů může být ovlivněno teplotou. U obratlovců obecně rozlišujeme dva typy determinace pohlaví – genotypově, tedy kombinací pohlavních chromozomů v karyotypu jedince, a environmentálně, kdy k určení dojde na základě vnějších vlivů prostředí, například právě teploty. Mechanismy, jak k tomuto jevu dochází, nejsou ještě zcela prozkoumány. Od roku 1966, kdy teplotní determinaci pohlaví objevila Charnier (1966) u agamy osadní (*Agama agama* Linnaeus, 1758), vzniklo množství dalších studií, snažících se objasnit, co tento mechanismus vyvolává a jaké jsou jeho implikace na vývojové a ekologické úrovni. Tato práce shrnuje nejvýznamnější současné hypotézy a poukazuje na mezery ve znalostech, které se zatím nepodařilo objasnit. Další výzkum může napomoci nejen pochopení principu určení pohlaví pomocí teploty u plazů, ale také mechanismům pohlavní determinace na molekulární úrovni u obratlovců všeobecně.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo zpracování vědecké, převážně zahraniční literatury zabývající se problematikou vlivu teploty na pohlaví plazů. Shrnuty byly nejvýznamnější poznatky o významu determinace pohlaví. Rozebrány byly jednotlivé způsoby teplotní determinace u plazů včetně zkoumaných mechanismů, jako jsou genové exprese a steroidní hormony. Vypsán byl základní přehled teorií zaměřujících se na důvody, proč se teplotně určené pohlaví vyvinulo. Důraz byl kladen i na zmínku možných dopadů environmentálních změn na ekologii a rozmnožování plazů.

3 Literární rešerše

3.1 Determinace pohlaví

Pod pojmem determinace pohlaví rozumíme moment, kdy dojde k určení či rozhodnutí, jakým směrem se bude pohlaví daného jedince vyvíjet. V okamžiku determinace se spouští kaskáda dějů, známá jako pohlavní diferenciacie, při které se embryonální gonáda začne vyvíjet do vaječnicků nebo varlat (Lance 1997).

U obratlovců rozlišujeme dva základní způsoby determinace pohlaví. Prvním je genotypové určení pohlaví (anglicky genotypic sex determination, GSD), kdy je pohlaví určeno genetickou informací. Druhým typem determinace je environmentální určení pohlaví (environmental sex determination, ESD), kdy rozhodují vlivy vnějšího prostředí. U plazů je nejprobádanějším typem ESD takzvaná teplotní determinace pohlaví (temperature sex determination, TSD) (Pokorná & Kratochvíl 2009).

U savců, ptáků a některých druhů plazů je pohlaví určeno genotypově. V jejich karyotypu se nachází pár pohlavních chromozomů, na základě jejichž kombinace rozlišujeme samce a samice. Existují dva typy chromozomálního určení pohlaví – savčí typ (*Drosophila*) se systémem chromozomů XX/XY, kde jsou samci heterogametními jedinci, a ptačí typ (*Abraxas*) se systémem ZZ/ZW, kde jsou heterogametními jedinci samice (Warner 2011). U savců rozhoduje o pohlaví gen SRY, umístěný na chromozomu Y, který je zodpovědný za započítí vývinu varlat a při jeho absenci dojde k vývinu vaječnicků (Lance 1997). Jak uvádí Crews et al. (2009), u druhů plazů s GSD byly pozorovány oba typy chromozomálního určení pohlaví. Dle Lance (1997) se předpokládá, že za diferenciací gonád stojí podobné geny a hormony, jako u savců.

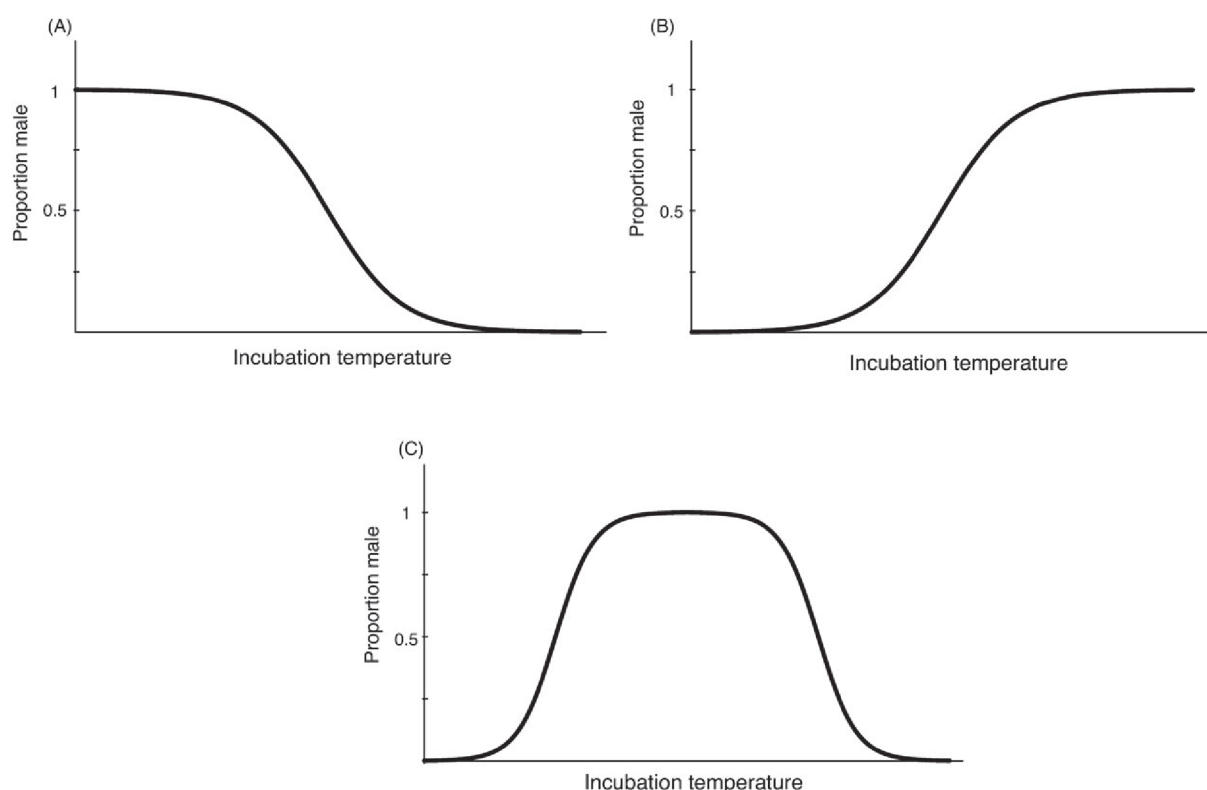
U určitých skupin plazů (krokodýlů, některých sladkovodních želv, všech mořských a suchozemských želv, některých ještěřů, jak uvádí Viets et al. 1994) je pohlaví určeno až po snesení vejce, během inkubace vlivem teploty okolního prostředí. Poprvé bylo TSD objeveno u agamy osadní (Charnier 1966) při pokusu určit optimální teplotu inkubace vajec. Tento objev otevřel dveře dalším výzkumům, které TSD postupně objevily u dalších druhů.

Někteří plazi (například agama vousatá, *Pogona vitticeps* Ahl, 1926) mají pohlaví ovlivněné jak genotypem, tak i okolní teplotou. Za normálních okolností je pohlaví agamy určeno chromozomy ZZ/ZW, jejich vliv však může být přebit extrémní teplotou během inkubace (nad 32°C). Vystavení vajec takovýmto teplotám má za následek pohlavní reverzi, kdy genotypově určení samci s chromozomy ZZ vykazují samičí fenotyp (Whiteley et al. 2021). Tento fakt prostor pro studium nových proteinů a jejich funkce v plazích gonádách a mechanismu pohlavní reverze.

3.2 Teplotně určené pohlaví

U plazů lze najít několik typů TSD. Tyto typy jsou popsány pomocí „samčích“ a „samičích“ teplot, tedy takových hodnot, při kterých se líhne 100 % samců nebo samic. Teplota, při které se líhnou pohlaví v poměru 1:1, se nazývá prahová teplota (pivotal temperature, PT) (Pezaro 2016). Hodnoty PT se mohou lišit v závislosti na tom, zda jsou vejce inkubována v laboratorních či přírodních podmínkách, mohou být ovlivněny okolním prostředím a dokonce mohou být různé i v rámci jednotlivých hnízdišť, jak pozorovala Dodd et al. (2006) u želvy nádherné (*Trachemys scripta* Thunberg & Schoepff, 1792). Dalším příkladem vlivu přírodních podmínek je pozorování hnízdních míst kajmanky dravé (*Chelydra serpentina* Linnaeus, 1758). Samice si v přírodě volily při vyšší nadmořské výšce místa v otevřeném prostoru, zatímco v nižší nadmořské výšce vybíraly místa ve stínu, aby nedošlo k přehřátí vajec. Bylo objeveno, že PT vajec inkubovaných v laboratorních podmínkách se lišila od teploty takto nakladených vajec v přírodě (Ewert et al. 2005).

Pozorováním bylo zjištěno, že teplota pohlaví ovlivňuje pouze v krátkém časovém úseku během inkubace. Tento úsek se označuje jako TSP (temperature sensitive period) a začíná zhruba ve druhé třetině inkubace, v závislosti na druhu (Bull 1980; Martínez-Juárez & Moreno-Mendoza 2019).



Obrázek 1: Grafy znázorňující tři typy TSD vyskytující se u plazů. Graf A představuje typ Ia, graf B typ Ib a graf C typ II. (Pezaro 2016).

Na základě hodnot samčích a samičích teplot rozlišujeme tři typy TSD – Ia, Ib a II (Valenzuela & Lance 2004). U typu Ia (MF) jsou za nízkých teplot produkováni samci, u typu

Ib (FM) se za nízkých teplot vyvíjejí samice. U typu II (FMF) se samice vyvíjejí při vysokých i nízkých teplotách a samci ve středních. Dle Pezara (2016) jsou typy Ia a Ib odvozeny z původního typu II vlivem evolučních procesů. Na Obrázku 1 jsou typy TSD znázorněny.

U želv se primárně vyskytuje typ Ia (Janzen & Paukstis 1991). Pokusy to bylo prokázáno například u želvy nádherné (Wibbels et al. 1994) nebo želvy myší (*Gopherus polyphemus* Daudin, 1802) (Burke et al. 1996)

U hatérií byl experimentálně zjištěn výskyt typu Ib (Cree et al. 1995), potvrzený pokusy v laboratorních podmínkách i sledováním přírodních hnízdišť.

U gekončíka nočního (*Eublepharis macularius* Blyth, 1854) bylo původně TSD určeno jako typ Ib, dalšími pokusy bylo však zjištěno, že samice jsou produkovány při vysokých i nízkých teplotách a správným typem TSD je typ II (Viets et al. 1993; Gamble 2010). Stejně tak u krokodýlovitých byl novým výzkumem (González et al. 2019) určen typ II; původně se mělo za to, že některé druhy spadají pod Ia (aligátor americký, *Alligator mississippiensis* Daudin, 1802) (Ferguson & Joanen 1982; Lang & Andrews 1994) a Ib (krokodýl nilský, *Crocodylus niloticus* Laurenti, 1768) (Hutton 1987)).

3.3 Mechanismus TSD

Od prvotního objevení teplotní determinace pohlaví (Charnier 1966) proběhlo mnoho dalších studií, které se snaží objasnit mechanismy stojící za TSD (Warner 2011). Objevilo se několik hypotéz, zaměřujících se především na hormonální, epigenetické a genetické spouštěče pohlavně-diferenční kaskády (Ramsey & Crews 2009; Matsumoto & Crews 2012; Matsumoto et al. 2013). Navzdory vynaloženému úsilí však nebyla stále objevena jasná odpověď, jakým způsobem teplota spouští diferenciaci embryonální gonády (Georges & Holleley 2018).

3.3.1 Teplota během TSD

Inkubační teplota závisí na mnoha externích faktorech souvisejících s okolním prostředím, mimo jiné na množství světla, které se k hnízdu dostává, materiálu, ze kterého je hnízdo postaveno, přítomnosti vody v okolí či jeho samotné lokaci (Mitchell et al 2013). Teploty uvnitř hnízda kolísají vlivem embryonálního metabolismu a umístěním vajec v hnízdě (Deeming & Ferguson 1989; Noble et al. 1990). Podle některých studií je dokonce embryo schopné se ve vejci pohybovat, a nejvíce aktivity projevuje během TSP (Cordero et al. 2017). Všechny tyto vlivy mají za následek kolísavou teplotu během inkubace, která se může projevit na výsledné determinaci pohlaví.

U organismů s genotypově určeným pohlavím je pohlaví dáno okamžikem splynutí gamet; u organismů s TSD se genotyp jedinců neliší až do okamžiku spuštění exprese genů zodpovědných za determinaci pohlaví za pomoci vnějšího stimulu (teploty). Podle toho, zda se jedná o samčí nebo samičí teplotu se poté začnou vyvíjet buď varlata nebo vaječníky (Warner 2011). Teplota dále ovlivňuje velikost zárodku a moment, kdy se začne vyvíjet (Deeming & Ferguson 1989). Jev, kdy okolní prostředí ovládá geny produkující rozdílné fenotypy, se nazývá fenotypová plasticita a existují domněnky, že má vliv na výsledný fitness jedinců (Flores et al 1994).

Co stojí za schopností využít teplotu jako signál pro tvorbu výsledného fenotypu, není zatím zcela jasné. Je možné ovšem zkoumat geny spouštějící samotnou diferenciaci pohlaví. Tyto geny jsou u obratlovců evolučně zachovány a u savců důkladně prozkoumány. Analogicky je možné aplikovat tyto znalosti i na plazy (Shoemaker et al. 2007, She & Jang 2014).

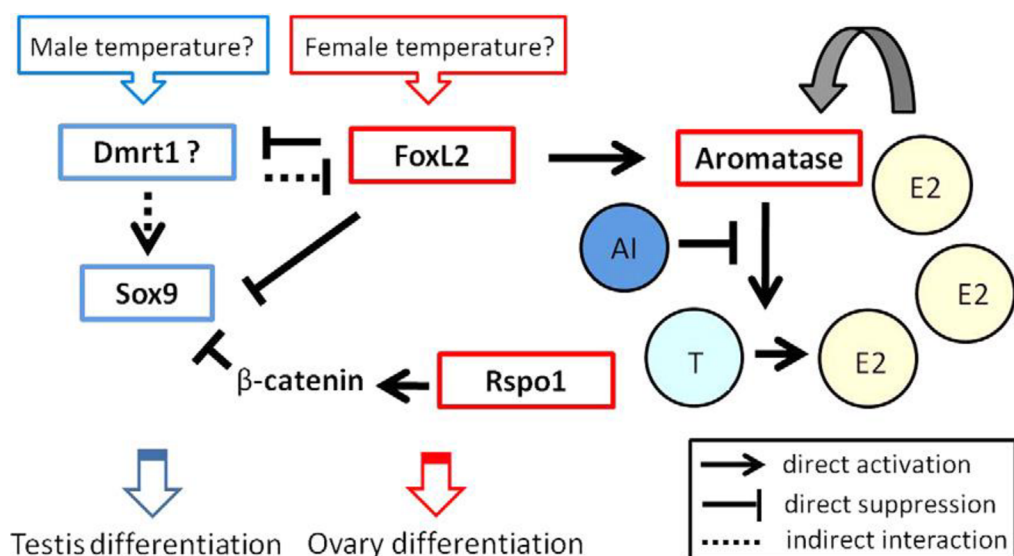
3.3.2 Geny podílející se na TSD v plazech

U savců za projevem pohlaví stojí gen Sry, umístěný na chromozomu Y a podílející se na přeměně gonády do varlete. U plazů tento gen doposud nalezen nebyl, avšak v modelových organismech došlo k expresi genu Sox9 (Kent et al 1996; Shoemaker et al. 2010). Gen Sox9 se podílí na diferenciaci Sertoliho buněk, které jsou nezbytné pro správné vytvoření a funkční udržení varlat (Martínez-Juárez et al. 2018).

U želvy nádherné byl pozorován gen Dmrt1, který potlačuje tvorbu vaječnicků. V této želvě během TSP při samčích teplotách umožňuje vyvinutí dimorfních znaků (Murdock & Wibbels 2003). Následnými pokusy u želvy bylo odhaleno, že ten samý gen se podílí na TSD a projevuje se během vývoje varlat, společně s genem Sox9.

Další významný gen podílející se na diferenciaci varlat je gen Amh. Tento gen je klíčovým regulátorem formování Sertoliho buněk a produkci testosteronu. U savců a želvy nádherné dochází k jeho expresi po genu Sox9, ale u dalšího modelového organismu, aligátora amerického, tato posloupnost zachována není; exprese genu Amh se projevuje první, stejně jako u kura bankivského (*Gallus gallus* Linnaeus, 1758) (Shoemaker et al. 2007; She & Yang 2014).

Dle She & Yang (2014) a Ge et al (2017) je možné gen Sox9 považován za jakýsi „primární“, „hlavní“ gen, který následně ovládá projevy ostatních genů. Důkazem je předložen fakt, že Sox9 je, na rozdíl od ostatních genů, zachován naskrz celou evoluci obratlovců.



Obrázek 2: Schéma exprese genů využitých pro determinaci pohlaví a diferenciaci gonád. Při samičích teplotách gen FoxL2 přímo aktivuje efekt aromatázy a potlačuje hormony Dmrt1 a Sox9, vedoucí k diferenciaci gonády do vaječnicku. Množství aromatázy vyvažuje množství pohlavních hormonů v samotné gonádě, které mohou ve výsledku reagovat s výše zmíněnými geny. Plná čára značí přímou interakci, přerušovaná nepřímou. AI značí inhibitor aromatázy, T testosteron a E2 estradiol (Matsumoto & Crews 2012).

Pro diferenciaci vaječníků je důležitý gen Foxl2 (She & Yang 2014). U želvy nádherné byla pozorována jeho exprese během TSP při samičích teplotách (Shoemaker et al. 2010). Tento gen se podílí na rovnováze produkce steroidních hormonů a diferenciaci folikulárních buněk a primárních folikulů (Bertho et al. 2016). Na obrázku 2 je zobrazeno schéma mechanismu exprese genů v této želvě podle Matsumota & Crewse (2012).

Výše popsané geny hrají při TSD významnou roli, ale samotný mechanismus, na jehož základě by byla zahájena jejich počáteční exprese, zůstává stále neznámý a probíhá snaha o jeho objasnění. Jako vhodný kandidát se jeví například přítomnost steroidních hormonů.

3.3.3 Steroidní hormony u TSD a jejich vliv

Steroidní hormony jsou syntetizovány z mastných kyselin cholesterolu a jsou charakterizovány jako lipofilní. Estrogeny, progesterony a androgeny řadíme mezi steroidní hormony; lze je také nalézt ve vaječném žloutku (Bowden et al. 2000). Mezi kandidáty molekul, které by byly aktivované teplotou a regulovaly množství těchto hormonů ve vajíčku, se řadí teplotně citlivé enzymy aromatáza a 5 α -reduktáza (Lance 2009). Tyto hormony jsou důležité pro produkci estrogenu a konverzi testosteronu na dihydrotestosteron (Jeyasuriya & Place 1998).

Vliv těchto hormonů byl poprvé zkoumán na želvách; bylo zjištěno, že při aplikaci steroidních hormonů na povrch vejce je možné potlačit TSD – například při aplikaci estrogenu je možné z vajec inkubovaných při samčích teplotách líhnout samice (Pieau et al. 1999). Steroidní hormony mají tedy na determinaci pohlaví nepopíratelný vliv. Naskytá se tak otázka, zda na snůšku nemůžou mít vliv hormony předávané ze samotné matky (Radder 2007). S touto teorií pracoval Bowden et al (2000), avšak v dalších studiích tuto teorii nepotvrdil.

Studie vlivu steroidních hormonů na pohlaví jsou důležité ještě z jednoho hlediska: znečišťování prostředí a jeho vlivu na pohlavní determinaci. U krokodýlů bylo například pozorováno, že molekula 17 α -methyl-testosteron zastupuje funkci androgenu a mláďata ze samičích teplot se tak líhnou jako samci (Murray et al. 2016). Znečišťování prostředí tak společně s globálním oteplováním (kdy se stoupající teplotou klesá aktivita aromatázy) představuje nebezpečí pro determinaci pohlaví.

3.3.4 Monitorování teploty pomocí buněčného systému

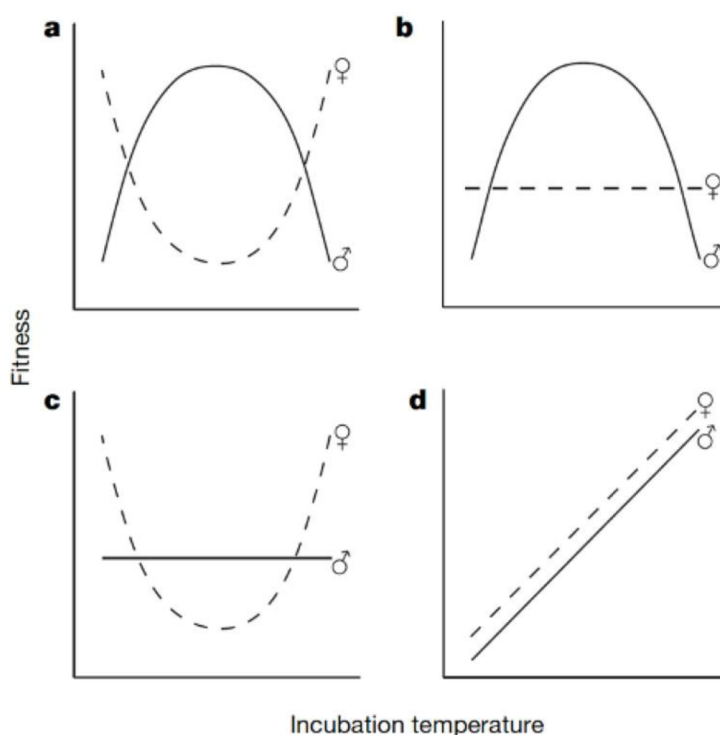
Dle studie od Castelli et al. (2020) stojí za detekcí teploty okolí samotná buňka disponující biologickým „čidlem“. Takové čidlo by mělo být citlivé na podmínky okolí, schopné reagovat se známými mechanismy determinace pohlaví a schopné vnímat různé signály v závislosti na výsledném fenotypu.

Výzkum představuje teorii univerzálního buněčného senzoru skládajícího se z molekul Ca²⁺ a reaktivních forem kyslíku, nazývaného „CaRe“, který má za úkol spustit kaskádu dějů, na jejíž základě dojde k expresi výše zmíněných pohlavních genů. Vápník hraje významnou roli jako signální molekula v těle, zatímco reaktivní formy kyslíku mohou ovlivňovat funkce proteinů prostřednictvím oxidace. Hodnoty obou molekul jsou ovlivňovány množstvím environmentálních faktorů a jsou schopné započít buněčnou odpověď na daný stimul. Z těchto důvodů se systém CaRe zatím pokládá za nejpravděpodobnější buněčný senzor, s prostorem pro další, detailnější výzkum.

3.4 Teorie vzniku TSD

První a zároveň nejvýznamnější teorií, proč došlo k evoluci TSD, je model Charnov-Bull.

Aby se mohla TSD v plazech vyvinout, je zapotřebí, aby prostředí ovlivňovalo fitness jedince různými způsoby. Samice těží z vyšší teploty více než samci; vyšší teplotou dojde ke zkrácení doby inkubace (Vitt & Caldwell 2014) a dřívějšímu líhnutí. Na konci rozmnožovacího období jsou takoví jedinci větší než normálně. Pro samice to může znamenat možnost klást jejich první snůšku již v prvním roce života. Pro samce však nemusí být větší rozměry dostatečné k tomu, aby mohli soupeřit s ostatními samci, tím pádem s vyšší teplotou ke zvýšení fitness samců nedojde. Tento model předpokládá, že každé pohlaví má svoji vlastní teplotu, při které jeho vlastní fitness vzroste, a přirozeným výběrem dojde k vývinu TSD. Podle Charnov-Bullova modelu může během roku docházet k proměnlivosti poměru pohlaví z důvodu teplotních výkyvů, tento rozdíl je ale nepatrný. (Charnov & Bull 1977).



Obrázek 3: Grafy zobrazující predikci modelu Charnov-Bull u agamy *Amphibolurus muricatus* (Warner & Shine 2008).

Tato teorie byla později ověřena studií Warnera & Shinea (2008), ve které byly využity agamy *Amphibolurus muricatus* (White, 1790). Tato agama má typ TSD II, samice se tedy líhnou na obou koncích teplotního spektra.

Na obrázku 3 jsou zobrazeny grafy predikcí Charnov-Bullova modelu aplikované na typ TSD testovaných agam, při kterých dojde ke zvýšení fitness daného pohlaví. V případě A jsou

samčí teploty optimální pro samce, a samičí teploty pro samice; v případě B je fitness samic neovlivněna teplotou, ale fitness samců je optimální při středních teplotách; v případě C je fitness samců neovlivněna teplotou, ale fitness samic je optimální při teplotách na obou koncích spektra ; a v případě D teplota inkubace neovlivňuje pohlaví rozdílně a TSD není preferováno výběrem.

Polovině snůšky těchto agam byl aplikován inhibitor aromatázy, v důsledku čehož nedošlo k diferenciaci vaječníků a ze samičích teplot se líhli samci – obě pohlaví se tedy líhla při stejné teplotě. Agamy byly poté zkoumány v přírodních výbězích po dobu 3,5 let. Výsledky ukázaly, že v druhém roce byly nejuspěšnější samice z vysokých teplot, které byly schopné naklást vejce už v první reprodukční sezóně; celkově nakladly vajíček nejvíc a jejich fitness se tím zvýšilo. U samců byly úspěšnější jedinci z teplot středních, jelikož dříve vylíhli samci nebyli dostatečně velcí, aby mohli zápasit o teritorium se staršími samci, a tudíž se nemohli rozmnožovat. Výsledky tohoto pokusu tedy potvrdily, že u agamy dochází u obou pohlaví vlivem teploty k různému fitness, což koresponduje s teorií, kterou předložili Charnov & Bull.

Zajímavostí je, že u scinka *Carinascincus ocellatus* (Gray, 1845) lze najít jak pohlavní chromozomy (Pen et al. 2010), tak sklon produkovat samice při zvýšených teplotách (Cunningham et al. 2017). Populace žijící v nižších nadmořských výškách disponuje TSD, zatímco populace z vyšších nadmořských výšek mají pohlaví určeno geneticky. Vysvětlení pro tento jev je pravděpodobně takové, že podmínky ve vyšších nadmořských výškách jsou proměnlivější a existuje větší pravděpodobnost extrémních výkyvů. Evoluce GSD má tedy za úkol minimalizovat vliv nestálého prostředí na poměr pohlaví.

Na tento objev navázali Cornejo-Páramo et al. (2020). Pracovali s teorií, že populace žijící v proměnlivých či extrémních podmínkách by měly vyvinout GSD, aby se vyhnuly vlivům větších výkyvů teplot. Bylo testováno 213 druhů plazů, z nichž 101 disponovalo TSD a 112 GSD. Testovány byly dvě teorie: a) za selekčními vlivy pro preferenci TSD stojí faktory jako teplejší podnebí, vejcorodost, delší doba dožití a větší variace teplot během reprodukční sezóny a její délka a b) proti selekci TSD stojí chladnější podnebí, živorodost, kratší doba dožití a kratší reprodukční sezóna.

Z výsledků vyplynulo, že způsob determinace pohlaví je vázán na teplotu okolí; jedinci s TSD obecně obývají teplejší oblasti než jedinci s GSD. U živorodých plazů je větší pravděpodobnost výskytu GSD a tito jedinci zároveň žijí v obecně chladnějších podmínkách. Zároveň se nepotvrdila předchozí teorie o preferenci GSD v oblastech s proměnlivými teplotami – kolísání teplot během reprodukční sezóny se výrazněji nelišilo u pozorovaných druhů s TSD ani GSD. Dle Cornejo-Párama tato data poukazují na to, že TSD se vyvinulo několikrát nezávisle na sobě u více druhů s ohledem na průměrnou teplotu okolí oblastí, kam se rozšířili; objev TSD není tedy výsledkem adaptivní evoluce na výkyvy teplot během reprodukční sezóny.

3.5 Změny okolních podmínek a vliv na TSD

Vzhledem k tomu, že TSD je závislé na okolních podmínkách, existují obavy, že environmentální změny mohou mít vážný dopad na výsledný poměr pohlaví. Mezi hlavní zkoumané faktory se řadí především globální oteplování a přítomnost polutantů v životním prostředí.

Otázkou možných dopadů manipulace s rozmnožováním plazů s TSD se začal zabývat Morreale et al. (1982). Ve snaze napomoci konzervaci různých druhů želv (například karety obrovské, *Chelonia midas* Linnaeus 1758) se jejich vejce začala sbírat a líhnout v uměle vytvořených líhních. Ty se zařizovaly buď v naturalistickém stylu ve vybraných chráněných oblastech, nebo uměle s využitím polystyrenových boxů. Morreale et al. zkoumal pohlaví vylíhnutých mláďat inkubovaných ve čtyřech různých umělých líhních umístěných v rozdílných teplotních zónách. Výsledky ukázaly, že v závislosti na poloze líhni a proměnlivém vnějším prostředí se lišil poměr vyprodukovaného pohlaví.

Tento fakt upozornil na možný problém umělých odchovů; pokud nebude umístění líhni vybíráno s ohledem na biologii daného druhu, může dojít k nerovnoměrné produkci a následnému vypuštění převahy jednoho pohlaví. Na základě tohoto zjištění se doporučuje důrazně dbát na výběr lokací pro líhne, nebo ještě lépe snahu směřovat k ochraně přírodních hnízd již vytvořených divokými želvami.

Globální oteplování může představovat nebezpečí pro budoucnost plazů s TSD. Dle Hawkesa et al. (2007) v posledních 1000 letech došlo ke zvýšení teploty okolí o 0,6°C. Hawkes et al. aplikoval predikční model pro globální oteplování na rozmnožování karety obecné (*Caretta caretta* Linnaeus 1758). Dle tohoto modelu by měla teplota v následujících 100 letech dále vzrůst o 0,3 – 7,5°C. K nárustu by však nemělo dojít rovnoměrně; některé oblasti budou oteplením zasaženy méně. Pokud teploty vzrostou o maximální hodnotu modelu (tedy 7,5°C), bude docházet ke 100% produkci samic a zároveň strmému zvýšení mortality; pokud vzrostou pouze o 1°C, poměr bude stále preferovat samice. Při tomto stavu se nesmírně důležitými stanou populace z oteplením méně zasažených částí světa, ve kterých bude stále možné dosáhnout vyrovnaného poměru pohlaví.

Hawkes spekuluje, že plazi se s rostoucí teplotou okolí mohou vyrovnat třemi způsoby: změnou hodnoty prahové teploty, změnou lokací, kde želvy umísťují svá hnízdiště (například preferencí jiné nadmořské výšky nebo hloubky zahrabání vajec), nebo změnou doby kladení vajec (vejce nakladená dříve se vyhnou vyšším teplotám během roku). Změna prahové teploty se nejvíce pravděpodobně, jelikož její hodnota je často evolučně zachována. Změny chování tak byly označeny za možné východisko vedoucí k zachování druhů. Důraz by měl být kladen na ochranu populací z míst, která oteplování ovlivňuje méně.

Změny v chování plazů v závislosti na změnách okolního prostředí dále studovali Schwanz & Janzen u želvy ozdobné (*Chrysemys picta* Schneider 1783). Zkoumali, zda jsou želvy schopné se přizpůsobit rychlosti oteplování prostřednictvím posunu snůšek na dřívější dobu. Pozorované želvy snášely první snůšku sezóny vždy v závislosti na klimatu z loňské sezóny. Tato adaptace však nestačila pokrýt rychlost zvyšování teplot, a nezachovávala se mezi

jedinci. Navíc dřívější snůška zvyšuje pravděpodobnost druhé snůšky později během roku, kdy jsou okolní teploty vyšší. Posun doby snůšky se tak nejeví jako pravděpodobné řešení; v úvahu připadají spíše změny umístování hnízdišť do zastíněných a chladnějších míst.

Oteplování také představuje hrozbu pro plazy s GSD, u kterých lze teplotou přepsat geneticky určené pohlaví. Modelovým zvířetem je agama vousatá, kde samice nesou geny ZW a samci geny ZZ. Při vysokých teplotách se geneticky určení ZZ samci líhnou s fenotypem samic. Pokud se tyto samice páří s genetickými ZZ samci, jejich potomci mají opět pouze ZZ geny. Tímto by došlo k vymizení pohlavních chromozomů jako determinantů pohlaví u agam a reverzi zpět k teplotně určenému pohlaví (Whiteley et al. 2021).

Dalším z faktorů, které mohou mít na TSD vliv, jsou polutanty v životním prostředí. Některé molekuly vypouštěné jako odpadní látky mají schopnost vázat se na estrogenové receptory a funkčně je zastoupit (Bergeron et al. 1994). Mezi takové sloučeniny řadíme například polychlorované bifenyly (PCB), používané v průmyslu jako aditiva. Bergeron et al. aplikoval PCB na vejce želvy pestré. Při pokusu došlo až ke 100% změně pohlaví, i přesto, že teploty inkubace odpovídaly samčím hodnotám.

Z výše uvedených výzkumů vyplývá, že změna okolních podmínek může mít zásadní vliv na mechanismus rozmnožování plazů s TSD. Pokud v budoucnu dojde k dalšímu zvýšení teplot, může dojít k výraznému nepoměru mezi pohlavími a v extrémním případě až k vyhynutí daného druhu. Zvířata nemusí být schopna adaptovat se dostatečně rychle, je tedy nutné začít směřovat ochranné činnosti do zachování populací z méně zasažených oblastí. Snížení míry znečištění prostředí může také významně přispět k snahám o konzervaci druhů.

4 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí literární rešerše zpracovat aktuální, převážně zahraniční literaturu zabývající se problematikou teplotního určení pohlaví u plazů. V práci byl zmíněn význam teploty jako zásadního faktoru pro biologii plazů. Proběhlo rozebrání typů determinace pohlaví u plazů v kontextu s ostatními živočichy a specifikovány byly jednotlivé typy teplotní determinace, ke kterým byly uvedeny příklady. Rozebraly se možné mechanismy, které za teplotně určeným pohlavím stojí; popsána byla funkce genů, které by jsou pravděpodobnými kandidáty na spouštěče pohlavně-diferenciační kaskády a jejich vliv na diferenciaci gonád, a také efekt steroidních hormonů přítomných ve vaječném žloutku. Zmíněn byl buněčný mechanismus, který by byl schopný registrovat teplotu jako biologický signál k nastartování samotné determinace a diferenciaci gonád. Nastíněna byla hlavní teorie, proč se teplotně určené pohlaví vyvinulo. Práce se na konci zabývala možnými dopady změn okolního prostředí na determinaci pohlaví a problémy, které přináší znečišťování či globální oteplování.

Ze zpracované literatury vyplynulo, že v porozumění mechanismů teplotní determinace došlo k výraznému posunu, stále je však mnoho oblastí, ve kterých je třeba provést další výzkum. Není například stále jednoznačné, co přesně stojí za prvotním signálem, který spouští celou pohlavně-diferenciační kaskádu, ani jakým způsobem zpracovává teplotu okolí jako signál. Současný trend testování hypotéz na krátkověkých zvířatech může vést k rozšíření poznatků mezi větší množství studovaných druhů, což může napomoci odhalení skrytých mechanismů. Z nasbíraných dat také vyplynula důležitost ochrany životního prostředí z hlediska oteplování i znečišťování; do budoucna bude stále důležitější péče o populace žijící v méně ovlivněných oblastech.

5 Literatura

- Bergeron JM, Crews D, McLachlan JA. 1994. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environmental Health Perspectives* **102**: 780–781.
- Bertho S, Pasquier J, Pan Q, Le Trionnaire G, Bobe J, Postlethwait JH, Pailhoux E, Scharl M, Herpin A, Guiguen Y. 2016. Foxl2 and Its Relatives Are Evolutionary Conserved Players in Gonadal Sex Differentiation. *Sexual Development* **10**: 111–129.
- Booth DT. 2006. Influence of Incubation Temperature on Hatchling Phenotype in Reptiles. *Physiological and Biochemical Zoology* **79**: 274–281.
- Bowden RM, Ewert MA, Nelson CE. 2000. Environmental sex determination in a reptile varies seasonally and with yolk hormones. *Proceedings of the Royal Society B* **267**: 1745–1749.
- Bull JJ. 1980. Sex Determination in Reptiles. *The Quarterly Review of Biology* **55(1)**: 3–21.
- Burke RL, Ewert MA, McLemore JB, Jackson DR. 1996. Temperature-dependent sex determination and hatching success in the gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). *Chelonian Conservation and Biology* **2**: 86–88.
- Castelli MA, Whiteley SL, Georges A, Holleley CE. 2020. Cellular calcium and redox regulation: the mediator of vertebrate environmental sex determination? *Biological Reviews*. DOI: 10.1111/brv.12582
- Charnier M. 1966. Action of temperature on the sex ratio in the *Agama agama* (Agamidae, Lacertilia) embryo. *Comptes Rendus Des Seances de La Societe de Biologie et de Ses Filiales* **160**: 620—622.
- Charnov EL, Bull J. 1977. When is sex environmentally determined? *Nature*, **266**: 828–830.
- Cordero GA, Telemeco RS, Gangloff EJ. 2017. Reptile embryos are not capable of behavioral thermoregulation in the egg. *Evolution & Development* **20**: 40–47.
- Cornejo-Páramo P, Lira-Noriega A, Ramírez-Suástegui C, Méndez-de-la-Cruz FR, Székely T, Urrutia AO, Cortez D. 2020. Sex determination systems in reptiles are related to ambient temperature but not to the level of climatic fluctuation. *BMC Evolutionary Biology* **20**. DOI: 10.1186/s12862-020-01671-y
- Cree A, Thompson MB, and Daugherty CH. 1995. Tuatara sex determination. *Nature* **375**: 543.

- Crews D, Sanderson N, Dias BG. 2009. Hormones, brain, and behavior in reptiles. Pages 771-816 in Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, and Rubin RT, editors. Academic Press, San Diego.
- Cunningham GD, While GM, Wapstra E. 2017. Climate and sex ratio variation in a viviparous lizard. *Biology Letters* **13**: 20170218. DOI: 10.1098/rsbl.2017.0218
- Deeming DC, Ferguson MWJ. 1989. Effects of incubation temperature on growth and development of embryos of *Alligator mississippiensis*. *Journal of Comparative Physiology* **159**: 183–193.
- Dodd KL, Murdock C, Wibbels T. 2006. Interclutch Variation in Sex Ratios Produced at Pivotal Temperature in the Red-eared Slider, a Turtle with Temperature-dependent Sex Determination. *Journal of Herpetology* **40**: 544–549.
- Ewert MA, Lang JW, Nelson CE. 2005. Geographic variation in the pattern of temperature-dependent sex determination in the American snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Journal of Zoology* **265**: 81–95.
- Ferguson MWJ, Joanen T. 1982. Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. *Nature* **197**: 850–853.
- Flores D, Tousignant A, Crews D. 1994. Incubation temperature affects the behavior of adult leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Physiology & Behavior* **55**: 1067–1072.
- Gamble T. 2010. A review of sex determining mechanisms in geckos (Gekkota: Squamata). *Sexual Development* **4**: 88–103.
- Ge C, Ye J, Zhang H, Zhang Y, Sun W, Sang Y, Capel B, Qian G. 2017. *Dmrt1* induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination. *Development* **144**: 2222–2233.
- Georges A, Holleley CE. 2018. How does temperature determine sex? *Science* **360**: 601–602.
- González EJ, Martínez-López M, Morales-Garduza MA, García-Morales R, Charruau P, Gallardo-Cruz JA. 2019. The sex-determination pattern in crocodylians: A systematic review of three decades of research. *Journal of Animal Ecology*. DOI: 10.1111/1365-2656.13037
- Hawkes LA, Broderick AC, Godfrey MH, Godley BJ. 2007. Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Global Change Biology* **13**: 923–932.
- Hutton JM. 1987. Incubation temperatures, sex ratios and sex determination in a population of Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Journal of Zoology* **211**: 143-155.

- Janzen FJ, Paukstis G. 1991. Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution, and experimental design. *Quarterly Review of Biology* **66**: 149–179.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P. 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* **122**: 2813–2822.
- Lance VA. 1997. Sex Determination in Reptiles: An Update. *American Zoologist* **37**: 504–513.
- Lance VA. 2009. Is regulation of aromatase expression in reptiles the key to understanding temperature-dependent sex determination? *Journal of Experimental Zoology* **311A**: 314–322.
- Lang JW, Andrews HV. 1994. Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology* **270**: 28–44.
- Martínez-Juárez A, López-Luna MA, Porrás-Gómez TJ, Moreno-Mendoza N. 2018. Expression of the Sox9, Foxl2, Vasa, and TRPV4 genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, *Crocodylus moreletii*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **330**: 148–164.
- Martínez-Juárez A, Moreno-Mendoza N. 2019. Mechanisms related to sexual determination by temperature in reptiles. *Journal of Thermal Biology* **85**: 102400. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2019.102400
- Matsumoto Y, Buemio A, Chu R, Vafae M, Crews D. 2013. Epigenetic Control of Gonadal Aromatase (*cyp19a1*) in Temperature-Dependent Sex Determination of Red-Eared Slider Turtles. *PLoS ONE* **8**: e63599. DOI: 10.1371/journal.pone.0063599
- Matsumoto Y, Crews D. 2012. Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Molecular and Cellular Endocrinology* **354**: 103–110.
- Mitchell TS, Maciel JA, Janzen FJ. 2013. Does sex-ratio selection influence nest-site choice in a reptile with temperature dependent sex determination? *Proceedings of the Royal Society B* **280**: 20132460. DOI:10.1098/rspb.2013.2460
- Morreale SJ, Ruiz GJ, Spotila JR, Standora EA. 1982. Temperature-dependent sex determination: Current practices threaten conservation of sea turtles. *Science* **216**: 1245–1247.
- Murdock C, Wibbels T. 2003. Expression of *Dmrt1* in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenetic and Genome Research* **101**: 302–308.
- Murray CM et al. 2016. Methyltestosterone alters sex determination in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *General and Comparative Endocrinology* **236**: 63–69.

- Nelson NJ, Thompson MB, Pledger S, Keall SN, Daugherty CH. 2004. Egg mass determines hatchling size, and incubation temperature influences post-hatching growth, of tuatara *Sphenodon punctatus*. *Journal of Zoology* **263**: 77–87.
- Noble RC, Deeming DC, Ferguson MWJ, McCartney R. 1990. Changes in the lipid and fatty acid composition of the yolk during embryonic development of the alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **96**: 183–187.
- Pen I, Uller T, Feldmeyer B, Harts A, While GM, Wapstra E. 2010. Climate-driven population divergence in sex-determining systems. *Nature* **468**: 436–438.
- Pezaro N, Doody JS, Thompson MB. 2016. The ecology and evolution of temperature-dependent reaction norms for sex determination in reptiles: a mechanistic conceptual model. *Biological Reviews*, **92**: 1348–1364.
- Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N. 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**: 887-900.
- Pokorná M, Kratochvíl L. 2009. Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zoological Journal of the Linnean Society* **156**: 168–183.
- Pough FH. 1980. The Advantages of Ectothermy for Tetrapods. *The American Naturalist* **115**: 92–112.
- Radder RS. 2007. Maternally derived egg yolk steroid hormones and sex determination: Review of a paradox in reptiles. *Journal of Biosciences* **32**: 1213–1220.
- Ramsey M, Crews D. 2009. Steroid signalling and temperature-dependent sex determination—Reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**: 283–292.
- She ZY, Yang WX. 2014. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *Journal of Molecular Endocrinology* **53**: 21–37.
- Shoemaker C, Ramsey M, Queen J, Crews D. 2007. Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Developmental Dynamics* **236**: 1055–1063.
- Shoemaker-Daly CM, Jackson K, Yatsu R, Matsumoto Y, Crews D. 2010. Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* gonads. *Developmental Dynamics* **239**: 1061–1075.

- Schwanz LE, Janzen FJ. 2008. Climate Change and Temperature-Dependent Sex Determination: Can Individual Plasticity in Nesting Phenology Prevent Extreme Sex Ratios? *Physiological and Biochemical Zoology* **81**: 826–834.
- Valenzuela N, Lance V. 2004. *Temperature Dependent Sex Determination in Vertebrates*. Smithsonian Institution, Washington.
- Viets BE, Ewert MA, Talent LG, Nelson CE. 1994. Sex determining mechanisms in squamate reptiles. *Journal of Experimental Zoology* **270**: 45–56.
- Viets BE, Ewert MA, Talent LG, Nelson CE. 1994. Sex-determining mechanisms in squamate reptiles. *Journal of Experimental Zoology* **270**: 45–56.
- Viets BE, Tousignant, A., Ewert, M. A., Nelson, C. E., & Crews, D. 1993. Temperature-dependent sex determination in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Journal of Experimental Zoology* **265**: 679–683.
- Vitt LJ, Caldwell JP. 2014. *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Warner DA, Shine R. 2008. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature* **451**: 566–568.
- Warner DA. 2011. Sex determination in reptiles. Pages 1-38 in Norris DO, Lopez K, editors. *Hormones and reproduction of vertebrates Vol. 3*. Academic Press, San Diego.
- Whiteley SL, Holleley CE, Wagner S, Blackburn J, Deveson IW, et al. 2021 Two transcriptionally distinct pathways drive female development in a reptile with both genetic and temperature dependent sex determination. *PLOS Genetics* **17**: e1009465. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009465
- Wibbels T, Bull JJ, Crews D. 1994. Temperature dependent sex determination: A mechanistic approach. *Journal of Experimental Zoology* **270**: 71–78.