

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Ekologie

Studijní obor: Terestrická ekologie



Bc. Tomáš Palata

Environmentální určení pohlaví plazů: role reaktivních forem kyslíku a hypoxie
Environmental sex determination in reptiles: The role of reactive oxygen species and hypoxia

Diplomová práce

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

Konzultanti: Mgr. Barbora Straková a RNDr. Lukáš Kubička, Ph.D.

Praha, 2024

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především prof. Mgr. Lukáši Kratochvílovi, Ph.D., mému školiteli, který mi po celou dobu zpracovávání této práce poskytoval cenné rady a byl kdykoliv otevřen diskuzím, díky čemuž mohla být tato práce dokončena. Stejně tak děkuji své konzultantce Mgr. Báře Strakové za její ochotu kdykoliv a s čímkoliv poradit, optimistický přístup a nadšení pro vědu, což pro mě vždy bylo velkou motivací. Bára zároveň přinesla své know-how ohledně manipulací gekoních vajec, takže jsem při experimentech nemusel tolik tápat. Děkuji RNDr. Lukáši Kubičkovi, Ph.D., který poskytoval odborné rady při plánování experimentů a jejich prvním provádění. RNDr. Jan Červenka, Ph.D. mi důvěřoval při péči o experimentální zvířata a kdykoliv rád předal cenné rady a s čímkoliv pomohl, díky Honzo. Za pomoc se zvířaty děkuji Mgr. Anně Bauerové. Děkuji Mgr. Daniele Novákové za velkou ochotu provést měření oxidativního poškození gekoních embryí a za poskytnutí veškerých protokolů.

Až sem bych se rozhodně nedostal nebýt mých nejbližších přátel, rodiny a přítelkyně. Všichni jste mi obrovskou oporou. Díky!

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 8. 2024

Podpis

Handwritten signature of Tomáš Poláček in blue ink.

Abstrakt:

U amniotických obratlovců může být pohlaví určeno genotypem, nebo podmínkami okolního prostředí, především teplotou, během rané fáze ontogeneze. Nejen velkou druhovou diverzitu, ale i diverzitu ve způsobech určení pohlaví nalezneme u parafyletické skupiny plazů, u kterých se vyskytují oba zmíněné typy určení pohlaví. Zaměříme-li se na environmentální určení pohlaví, zjistíme, že ohledně jeho fungování panuje stále mnoho nejasností. Například není jasné, jakým způsobem dokáže embryo zachytit teplotní signál, na jehož základě se diferencují gonády. Nedávno byl navržen teoretický model, který předpokládá, že zásadní roli v tomto procesu hrají reaktivní formy kyslíku (ROS) a vápenaté ionty. Tato práce představuje experimentální otestování role ROS pomocí ošetření vajec gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*) a gekona *Pachydactylus tigrinus* paraquatem. Kromě toho byl u těchto druhů otestován také vliv hypoxie, která je ekologicky relevantním faktorem při inkubaci plazích vajec a mimo jiné může mít vliv i na produkci ROS. Získané výsledky vliv paraquatu ani hypoxie nepodporují, přesto však hypotézy jejich vlivu nelze jednoznačně zamítnout a je třeba další studium.

Klíčová slova:

určení pohlaví, ESD, gekoni, paraquat, hypoxie, reaktivní formy kyslíku

Abstract:

In amniotes, sex can be determined either by genotype or by environmental conditions, primarily temperature, during early development. Reptiles exhibit remarkable diversity not only at the species level but also in terms of sex determination mechanisms, encompassing both genotypic and environmental sex determination. Despite significant advances in our understanding of environmental sex determination over the past ten years, there are still gaps in our knowledge regarding its molecular mechanisms and evolution. Recently, a theoretical model has been proposed suggesting that reactive oxygen species (ROS) and calcium ions play an essential role in capturing temperature cues by the embryo during the crucial process of sex determination. In this thesis, I tested the role of ROS in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*) and the tiger gecko (*Pachydactylus tigrinus*) by treating their eggs with paraquat. Additionally, the effect of hypoxia was also tested. Hypoxia seems to be an ecologically important factor during the incubation of many reptile eggs and could possibly affect environmental sex determination, e.g. by increasing ROS production. The results do not support the effects of either ROS or hypoxia on sex determination. Nevertheless, based on these results, the hypothesis regarding the influence of ROS (or paraquat) and hypoxia cannot be definitively rejected and requires further investigation.

Key words:

sex determination, ESD, geckos, paraquat, hypoxia, reactive oxygen species

Obsah

1	Úvod	1
2	Environmentální určení pohlaví plazů	3
3	Molekulární mechanismy ESD	6
3.1	Role vápenatých iontů a reaktivních forem kyslíku	7
3.2	Jak s tím souvisí hypoxie?	9
4	Cíle práce	11
5	Metodika	12
5.1	Zvířata a jejich chov	12
5.1.1	Gekončík noční (<i>Eublepharis macularius</i>)	12
5.1.2	Gekon <i>Pachydactylus tigrinus</i>	13
5.2	Sbírání a inkubace vajec	14
5.3	Určení začátku termosenzitivní periody	14
5.4	Experimentální manipulace	15
5.4.1	Paraquat	16
5.4.2	Hypoxie	17
5.5	Měření míry oxidativního poškození	18
5.6	Identifikace pohlaví mláďat	18
5.7	Analýza dat	20
6	Výsledky	21
6.1	Začátek termosenzitivní periody	21
6.2	Paraquat a hypoxie	24
6.2.1	Gekončík noční (<i>Eublepharis macularius</i>)	24
6.2.2	Gekon <i>Pachydactylus tigrinus</i>	31
7	Diskuze	35
7.1	Termosenzitivní perioda	35

7.2	Vedlejší efekty manipulací	36
7.3	Efekt na pohlaví.....	38
8	Závěr.....	43
9	Literatura.....	44
10	Přílohy	55
10.1	Protokol na měření markerů oxidativního poškození	55

1 Úvod

Určení pohlaví je důležitým okamžikem v životě organismů s oddělenými pohlavími, který rozhodne, zda se gonadální tkáň začne vyvíjet jako vaječník, nebo varle. U některých linií je pohlaví určeno již během oplození a závisí na genotypu, který jedinec získal od svých rodičů (**GSD – genotypic sex determination**). Jiní však postrádají genetickou kontrolu nad vývojem gonád a k rozhodnutí o určení jejich pohlaví dochází později během senzitivní fáze vývoje v závislosti na podmínkách okolního prostředí. V tomto případě pak mluvíme o environmentálně určeném pohlaví (**ESD – environmental sex determination**). Jelikož je typ určení pohlaví zásadním faktorem, který může kromě samotného života jedince ovlivnit i poměry pohlaví v populaci, a tím i sociální interakce jedinců, populační dynamiku a evoluční potenciál druhů, je tak s podivem, že evoluce nenašla jedno ideální řešení určení pohlaví a objevujeme v přírodě značnou variabilitu (Wright 1931, Wedekind 2002, Bókony et al. 2019, Kappeler et al. 2023).

Zaměříme-li se na variabilitu určení pohlaví amniot, GSD spojené s přítomností pohlavních chromozomů nacházíme u všech savců a ptáků a většiny plazů. Savci mají až na několik výjimek stabilní pohlavní chromozomy XX/XY (tedy samčí heterogametnost), přičemž hlavní roli při určení pohlaví hraje přítomnost samčího chromozomu Y, na kterém se nachází gen *Sry* jehož produktem je transkripční faktor iniciující vývoj varlat (Sinclair et al. 1990, Sekido & Lovell-Badge 2008). V rámci živorodých savců tvoří výjimky někteří hlodavci z rodů *Tokudaia* a *Ellobius*, u nichž došlo k úplné ztrátě Y chromozomu a současně tak i genu *Sry* (Kuroiwa et al. 2010, Mulugeta et al. 2016). Jak se se ztrátou hlavního genu determinujícího pohlaví vypořádali víme zatím u druhu *Tokudaia osimensis*, u kterého byl nalezen nový lokus určující pohlaví, který se nachází na autozomu a patrně podobně jako *Sry* zvyšuje expresi genu *Sox9*, který je nezbytný pro vývoj varlat (Terao et al. 2022). Standardnímu způsobu determinace pohlaví živorodých savců se vymykají i další hlodavci – myška africká (*Mus minutoides*), lumíci *Myopus schisticolor* a *Dicrostonyx torquatus*, hraboš *Lasiopodomys mandarinus* a některé druhy rodu *Akodon*. U těchto druhů se kromě pohlavních chromozomů X a Y vyskytuje i chromozom označovaný jako X*, který má feminizující efekt, takže v jejich populacích nacházíme samice s genotypem XX, XX* a X*Y (samci mají XY), což může vést i k vychýlenému poměru pohlaví ve prospěch samic (review Saunders & Veyrunes 2021). Speciálním případem jsou ptakořitní s mnohačetnými pohlavními chromozomy (Grützner et al. 2004, Rens et al. 2007).

Ptáci mají evolučně velmi konzervovaný systém ZZ/ZW pohlavních chromozomů (samičí heterogametnost) napříč celým fylogenetickým stromem (Mazzoleni et al. 2021). Určení pohlaví ptáků závisí na dávce genu *dmrt1* nacházejícího se na Z chromozomu, který tak samci mají na rozdíl od samic ve dvou kopiích (Smith et al. 2009).

U plazů¹ je situace o poznání komplikovanější, poněvadž jsou ve způsobech určení pohlaví ze všech amniot nejvariabilnější. Většina plazů má pohlaví určeno genotypově přítomností pohlavních chromozomů. Jsou známy systémy jak XX/XY, tak i ZZ/ZW pohlavních chromozomů, a tyto mohou být mikroskopicky rozlišitelné od autozomů (heteromorfní), ale i nerozlišitelné (homomorfní) (Bull 1980). Hlavní geny determinující pohlaví u GSD linií plazů však zatím nebyly zcela jednoznačně určeny (Thépot 2021). Část plazů má pohlaví určeno environmentálně. Tyto druhy postrádají pohlavní chromozomy, samci a samice se neliší ve svých genomech, a tak jeden genotyp může vytvořit oba pohlavní fenotypy (Johnson Pokorná & Kratochvíl 2016). Hlavním faktorem, který rozhoduje o určení pohlaví, je v tomto případě teplota, ve které se embryo nachází během senzitivní fáze vývoje (Valenzuela & Lance 2004).

Ačkoliv bývá na GSD a ESD nahlíženo jako na dva oddělené mechanismy určení pohlaví, někteří autoři namítají, že by se mohlo jednat spíše o dva opačné konce kontinua (Sarre et al. 2004). Známe totiž druhy plazů, které sice mají pohlavní chromozomy, avšak některé environmentální faktory dokáží zastínit jejich vliv, a tím vznikne jedinec, jehož pohlaví neodpovídá jeho genotypu. Tento jev nazýváme pohlavní reverze a známým příkladem je agama vousatá (*Pogona vitticeps*) s pohlavními chromozomy ZZ/ZW, u které vysoké inkubační teploty indukují vznik samic s genotypem ZZ (Quinn et al. 2007). Naopak u scinka *Bassiana duperreyi* s pohlavními chromozomy XX/XY nízké inkubační teploty vedou ke vzniku XX samců (Shine et al. 2002, Radder et al. 2008). I přesto ale předpokládáme, že lze rozlišit, zda se jedná o GSD, pravé ESD, GSD s pohlavní reverzí, nebo teplotní vliv na pohlavně specifickou mortalitu embryí GSD druhů.

¹ Plazi jsou v této práci chápáni jako parafyletická skupina, tedy všichni zástupci linie Sauropsida kromě ptáků

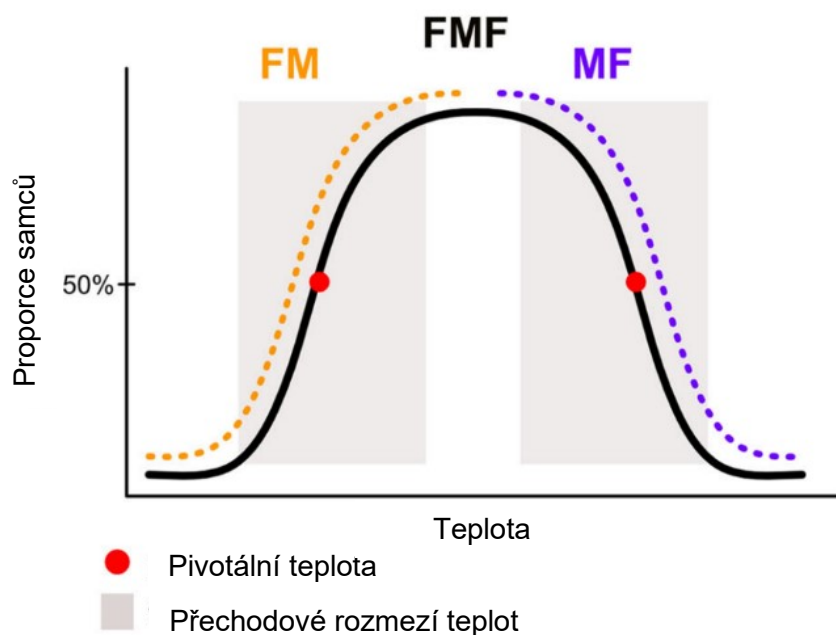
2 Environmentální určení pohlaví plazů

Přestože bylo ESD plazů objeveno již před více než půl stoletím (Charnier 1966), je náš celkový pohled na prevalenci tohoto typu určení pohlaví do značné míry neúplný. Dřívější představy o rozšíření ESD se ukázaly být velmi nadhodnocené a náš dnešní pohled usměrnily molekulární metody, které u mnoha linií s předpokládaným ESD, napomohly objevit pohlavní chromozomy. Například žádní scinci, ještěrky, ani varani, u kterých se dřív výskyt ESD předpokládal, jej s největší pravděpodobností nemají (Rovatsos et al. 2016, Iannucci et al. 2019, Kostmann et al. 2021). Dnes si myslíme, že se ESD vyskytuje pouze zhruba u 5 % všech žijících druhů plazů (Kostmann et al. 2021). Mezi linie, ve kterých byli zástupci s dobře zdokumentovaným ESD zaznamenáni, patří krokodýli, želvy, hatérie a z šupinatých plazů gekoni a agamy.

U krokodýlů je ESD dobře zdokumentováno u 9 druhů a je předpokládáno u všech 27 recentních druhů (Ferguson 1985, González et al. 2019, Uetz et al. 2023). Stejně tak jediný žijící druh hatérie *Sphenodon punctatus* má ESD (Cree et al. 1995). U želv byla zatím z hlediska typu určení pohlaví prozkoumána zhruba třetina z 365 žijících druhů a až na 5 nezávislých vzniků GSD u předka čeledí Chelidae, Trionychidae a uvnitř čeledí Kinosternidae, Geoemydidae a Emydidae má většina z prozkoumaných druhů ESD (Bista & Valenzuela 2020). Komplikovaná je situace v rámci šupinatých plazů, kde bylo ESD zaznamenáno v rámci agam a gekonů, avšak v těchto liniích byl z hlediska typu určení pohlaví prozkoumán jen zlomek současně žijících druhů (viz Straková et al. 2024). Zaměříme-li se gekony (Gekkota), jimiž se tato práce zabývá, je známo celkem pouze 10 druhů s ESD patřících do čeledí Eublepharidae (*Eublepharis macularius* a *Hemitheconyx caudicinctus*, Viets et al. 1993, Viets et al. 1994), Sphaerodactylidae (*Pristurus carteri*, Straková et al. 2024), Phyllodactylidae (*Tarentola mauritanica* a *Tarentola boettgeri*, Nettmann & Rykena 1985, Marques et al. 2023) a Gekkonidae (*Phelsuma grandis*, *P. laticauda*, *P. nigristriata*, *Pachydactylus tigrinus* a *Chondrodactylus laevigatus*, Viets et al. 1994, Peš et al. 2024, Straková et al. 2024).

Teplota ale neovlivňuje poměry pohlaví mláďat všech druhů stejně. Jsou rozeznávány 3 typy ESD založené na odlišném vztahu mezi inkubační teplotou a poměrem pohlaví mláďat (tzv. norma reakce, viz Obr. 1). U druhů s ESD typu FMF (též nazývaném typ II) se líhnou samice v nízkých a vysokých teplotách, zatímco samci v prostředích. Příkladem druhu s tímto typem je gekončík noční (*Eublepharis macularius*, Viets et al. 1993), nebo někteří krokodýli (González et al. 2019). Typ MF (nebo také Ia) se vyznačuje líhnutím sameců v nižších teplotách

a samic ve vyšších, jako to je například u karet (Standora & Spotila 1985). Naopak pro typ FM (také Ib) je typické líhnutí samic v nižších teplotách a samců ve vyšších. Příkladem je hatérie novozélandská (Cree et al. 1995), nebo gekon s recentně popsaným ESD *Pristurus carteri* (Straková et al. 2024). Jednotlivé normy reakce lze pak dále popsat pomocí dalších parametrů, jako je přechodové rozmezí teplot (TRT – *transitional range of temperatures*, rozmezí teplot, ve kterém se líhnou obě pohlaví) nebo pivotální teplota (T_{piv} , teplota, ve které se líhne poměr pohlaví 1:1). Normy reakce mohou být poměrně variabilní, mohou se lišit v rámci jednotlivých typů, nebo dokonce i napříč populacemi jednoho druhu (Ewert et al. 2005).



Obrázek 1 – znázornění tří typů ESD (FM, FMF, MF) s naznačenou pivotální teplotou a přechodovým rozmezím teplot, převzato ze Straková et al. (2024), upraveno

Jakým způsobem ale evoluce normy reakce probíhá, je stále předmětem debat, stejně jako evoluce samotných typů určení pohlaví amniot. Někteří autoři se domnívají, že se ESD amniot vyvinulo z ancestrálního GSD, což podkládají existencí teplotně podmíněné pohlavní reverze GSD druhů popsané v předchozí kapitole, která může za určitých podmínek vést ke vzniku populace s ESD (Quinn et al. 2007). Tomuto scénáři ale stojí v cestě několik okolností, které nelze opomenout. Pohlavní chromozomy po svém vzniku mají tendenci akumulovat pohlavně antagonistické alely, tedy ty, které jsou výhodné pro jedno pohlaví, zatímco druhému škodí, a proto mohou být pohlavně revertovaní jedinci znevýhodněni absencí pohlavně specifického genotypu (Johnson Pokorná & Kratochvíl 2016). Stejně tak by za snížením fitness

pohlavně revertovaných jedinců mohly být velmi vysoké inkubační teploty způsobující reverzi, které mohou zároveň mít na škodlivý efekt na vylíhnuté jedince a překážkou by mohly být i vychýlené poměry pohlaví během přechodu (Johnson Pokorná & Kratochvíl 2016). I v případě, že by zmíněné problémy nebyly tak zásadní, jako se ukázalo u agamy vousaté, u které jsou pohlavně revertované samice životaschopné a během jedné generace se v laboratorních podmínkách podařilo provést přechod z GSD na ESD, v přírodě žádná populace s ESD nebyla nalezena (Holleley et al. 2015).

Johnson Pokorná & Kratochvíl (2016) navrhli alternativní scénář, který předpokládá ancestrální určení pohlaví amniot ESD. Tento scénář je nejvíce parsimonním vysvětlením výskytu jednotlivých typů určení pohlaví amniot. Zároveň jsou poměrně dobře zdokumentované evoluční přechody z ESD na GSD – především u želv s ancestrálním ESD a pěti nezávislými vznikly pohlavních chromozomů (Bista & Valenzuela 2020) a podobná situace je předpokládána i u gekonů (Gamble et al. 2015). Hypotéza ancestrálního ESD zároveň předpokládá, že jednotlivé linie s ESD sdílí molekulární mechanismy, které se na něm podílí, a proto je třeba tyto mechanismy detailněji zkoumat.

3 Molekulární mechanismy ESD

Zatímco geny podílející se na vývoji gonád plazů s ESD jsou do značné míry evolučně konzervované napříč studovanými taxony obratlovců (Weber & Capel 2021), mechanismy odpovědné za jejich aktivaci pro následnou diferenciaci bipotenciálních gonád byly po dlouhou dobu neprozkoumané. Navzdory výraznému pokroku, které přineslo do značné míry studium gonadálních transkriptomů v posledním desetiletí, jsou stále v našem poznání značné mezery, jelikož zatím v tomto ohledu byla detailněji zkoumána jen část linií plazů s ESD. Mezi doposud zkoumané ESD druhy patří především želvy *Trachemys scripta* (Czerwinski et al. 2016, Ge et al. 2018, Weber et al. 2020), *Mauremys mutica* (Yuan et al. 2021), *Chelydra serpentina* (Schroeder et al. 2016), *Chrysemys picta* (Radhakrishnan et al. 2017), *Mauremys reevesii* (Dong et al. 2020, Ye et al. 2019, Toyota et al. 2023), dále dva druhy aligátorů *Alligator sinensis* (Lin et al. 2018) a *Alligator mississippiensis* (Yatsu et al. 2015, Yatsu et al. 2016) a pozornost byla věnována i agamě vousaté (*Pogona vitticeps*), GSD druhu se zmiňovanou teplotně indukovanou pohlavní reverzí (Deveson et al. 2017, Whiteley et al. 2021, Whiteley et al. 2022). Kromě agamy vousaté, která nemá pravé ESD, byli šupinatí plazi přehlíženi, výjimku tvoří dvě práce provedené na gekončikoví nočním (*Eublepharis macularius*), které se ale zabývaly jen několika geny (Valleley et al. 2001, Pallotta et al. 2022).

Nejvíce informací doposud přineslo studium želvy *Trachemys scripta*. Zásadní byl objev vlivu demetylázy *kdm6b* exprimované v teplotě produkující samce (Ge et al. 2018). Tato demetyláza odstraňuje methylové značky z promotoru genu *dmrt1*, který je důležitý pro vývoj varlat (Ge et al. 2018). Zda bude tato demetyláza exprimovaná, je závislé na fosforylaci transkripčního faktoru STAT3, která je řízena vtokem vápenatých iontů do buňky (Weber et al. 2020). Pokud se embryo nachází ve vyšší teplotě (produkující samice u želvy *Trachemys scripta*) dochází ke vtoku vápenatých iontů do buněk a následné fosforylaci STAT3, který dimerizuje, dostává se do jádra, kde inhibuje expresi demetylázy *kdm6b* a dochází tak k vývoji vaječnicků (Weber et al. 2020).

Exprese *kdm6b* byla nalezena i u jiných ESD druhů, avšak funkce není tak prozkoumaná jako u želvy *T. scripta*. Například u aligátora severoamerického (*Alligator mississippiensis*) byla exprese na rozdíl od předchozího druhu zvýšená v teplotě produkující samice (Yatsu et al. 2016). Kromě *kdm6b* byla detekována také teplotně závislá transkripce genu *jarid2*, který pochází ze stejné genové rodiny (Czerwinski et al. 2016, Yatsu et al. 2016, Deveson et al. 2017, Whiteley et al. 2021). *Jarid2* je součástí metylačního komplexu PRC2

(van Mierlo et al. 2019), což naznačuje důležitost epigenetických procesů při environmentálním určení pohlaví.

Dalším kandidátním procesem podílejícím se na ESD je alternativní sestřih RNA, a to především skrze teplotně závislou aktivitu kináz CLK1 a CLK4 (Haltenhof et al. 2020). Tyto kinázy forforylují SR proteiny, které se váží na RNA a regulují sestřih (Ghosh & Adams 2011). Předpoklad role alternativního sestřihu je v souladu s postřehem Deveson a kolegů (2017), kteří si všimli u želvy *T. scripta*, aligátora severoamerického a agamy vousaté teplotně závislé retence intronu v transkriptech *kdm6b* a *jarid2*, o nichž byla řeč výše.

Recentně byl popsán u želvy *T. scripta* i vliv počtu germinálních buněk při ESD (Tezak et al. 2023). Vyšší teplota produkující samice u této želvy zvýšila počet germinálních buněk v nediferencovaných gonádách na začátku termosenzitivní periody. Po chemické ablaci germinálních buněk v teplotě produkující vyrovnaný poměr pohlaví se ukázalo, že jejich počet se i přímo podílí na určení pohlaví, tedy že vyšší počet germinálních buněk vede k vývoji vaječníků (Tezak et al. 2023).

Byl také předpokládán vliv glukokortikoidů na ESD, avšak experimentální manipulace kortikosteronem ve vejcích druhů s ESD nepřinesly průkazné výsledky (Warner et al. 2009). Stejně tak měření obsahu kortikosteronu v embryích kajmana šíronosého (*Caiman latirostris*) napříč různými teplotami neukázalo vztah mezi teplotou a koncentrací tohoto hormonu (Marcó et al. 2015).

Obecně se ale zdá, že neexistuje jeden hlavní mechanismus zajišťující ESD, ale spíše jde o souhru více mechanismů najednou. Otázkou však zůstává, jakým způsobem buňky dokáží detekovat teplotní signál a přenést ho těmto mechanismům.

3.1 Role vápenatých iontů a reaktivních forem kyslíku

Komplexní teoretický model vysvětlující, jakým způsobem jsou buňky embryí schopné zachytit teplotní signál při ESD, představila práce Castelli et al (2020). V tomto modelu hrají ústřední roli vápenaté ionty a reaktivní formy kyslíku (**ROS** – *reactive oxygen species*). ROS představují širokou skupinu molekul zahrnující molekuly odvozené od kyslíku O₂, které jsou ale samy o sobě reaktivnější než samotný O₂ (př. superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál) (Murphy et al. 2022). Jejich důležitým zdrojem v buňce je mitochondriální respirace produkující superoxid O₂^{•-}, který dává vzniknout peroxidu vodíku H₂O₂ (Loschen et al. 1974,

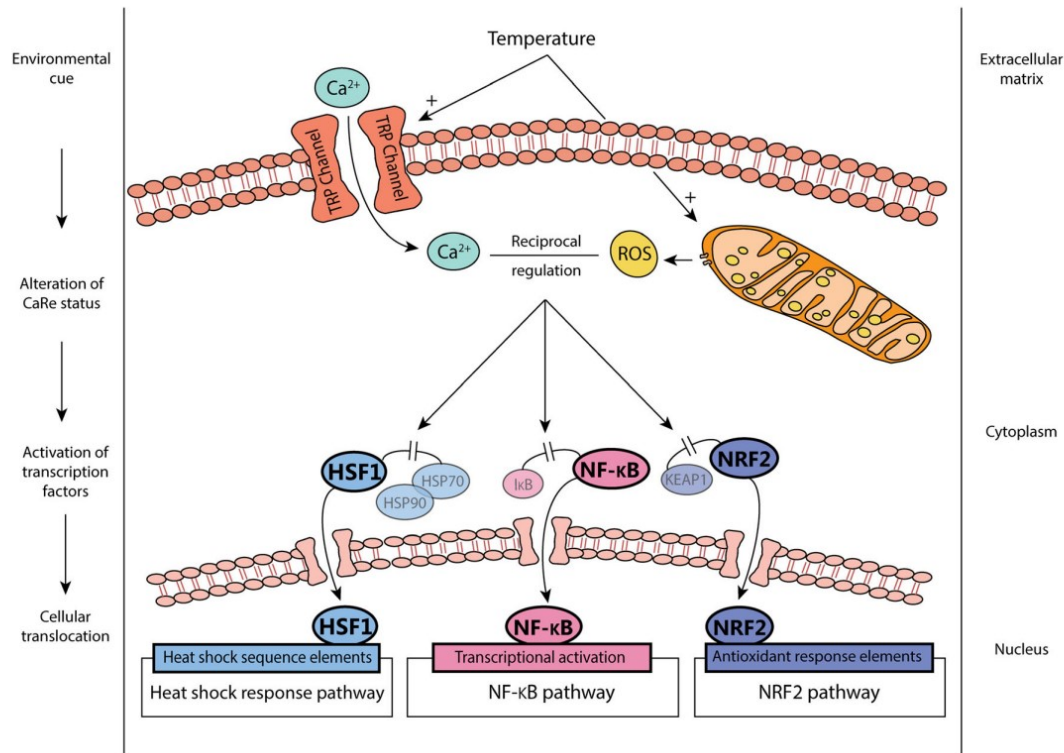
Murphy 2009). ROS mohou fungovat jako pleiotropní signalizační molekuly a při zapojení do signalizace mohou měnit konformaci proteinů oxidací cysteinových reziduí v proteinech a reverzibilním narušením disulfidických můstků, čímž se může změnit aktivita cílového proteinu (Paulsen & Carroll 2010, Sies & Jones 2020). Pokud ale koncentrace ROS překročí antioxidační kapacitu buňky, může dojít k poškození buněčných struktur a oxidativnímu stresu (Sies et al. 2017). Podobně jako ROS se i vápenaté ionty podílí na mnohých signalizačních procesech v buňkách a jejich zásadní role při fosforylaci STAT3 želvy *T. scripta* byla výše popsána (review Clapham 2007, Weber et al. 2020).

Jak je ale zajištěna teplotní senzitivita těchto signálních molekul? Pro signalizaci skrze vápenaté ionty jsou zřejmě u ESD plazů klíčové teplotně senzitivní kanály skupiny TRP propouštějící vápenaté ionty (Benham et al. 2003, Clapham 2003). TRP kanály byly nalezeny v transkriptomech studovaných druhů (Yatsu et al. 2016, Lin et al. 2018, Ye et al. 2019). Experimentální aplikace inhibitorů kanálů TRPV1 a TRPM8 u želvy *Mauremys reevesii* změnila poměr pohlaví potomků oproti očekávanému poměru v dané teplotě (Ye et al. 2019). Avšak záměrem této práce bylo zablokování behaviorální termoregulační schopnosti embryí, takže výsledek není tak snadno interpretovatelný. Nicméně i inhibice kanálu TRPV4 ve vejcích aligátora *A. mississippiensis* ovlivnila vývoj gonád (Yatsu et al. 2015). Dokonce bylo zjištěno, že oxidace cysteinových reziduí kanálů TRPA1 a TRPV1 způsobí jejich aktivaci (viz Ogawa et al. 2016a, Ogawa et al. 2016b), čímž se propojuje signalizace skrze vápenaté ionty a ROS.

Teplotní závislost je předpokládána i u produkce ROS, jelikož jejich hlavním zdrojem je mitochondriální respirace a zvyšující se teplota zvyšuje intenzitu metabolismu a rychlost vývoje plazů (Abele et al. 2002, Sun et al. 2015). Zapojení ROS a oxidativního stresu indikuje i exprese genu *ucp2* u aligátora severoamerického v teplotě produkující samce (Yatsu et al. 2016). Protein *ucp2* se podílí na regulaci produkce mitochondriálních ROS během oxidativního stresu (Chan et al. 2009). A také byl ukázán vliv oxidativního stresu na pohlavní reverzi GSD druhu kostnaté ryby medaky *Oryzias latipes* v práci Mukai et al. (2022).

Castelli et al. (2020) také navrhuje potenciálně důležité signalizační dráhy a molekuly, které by při ESD mohly být ovlivněny souhrou ROS a vápenatých iontů a jejich aktivace by vedla k ovlivnění procesu určení pohlaví. Mezi největší kandidáty patří NF- κ B dráha, HSPs (*heat shock proteins*) a antioxidační odpověď buňky (skrze NRF2, či poměr redukováného a oxidovaného glutathionu) – viz Obr. 2, detailní popis nabízí práce Castelli et al. (2020). Kromě těchto kandidátů nelze opomenout protein CIRBP (*cold-inducible RNA-binding protein*). CIRBP je protein stabilizující molekuly mRNA a jeho aktivita může být řízena

faktory, jako je teplota, produkce ROS, hypoxie, nebo UV záření (Zhong & Huang 2017). Existují důkazy, že CIRBP může ovlivnit i výše zmíněnou NF- κ B dráhu a fosforylaci STAT3 – ano, přesně toho transkripčního faktoru, který je tak důležitý při určení pohlaví želvy *T. scripta* (Brochu et al. 2013, Sun et al. 2018). Připomínám, že se ale jedná o teoretický model, který vyžaduje další testování.



Obrázek 2 – model Castelli et al. (2020) představující zapojení ROS a vápenatých iontů při ESD a následný přenos signálu na další potenciálně důležité molekuly, převzato z Castelli et al. (2020)

Na rozdíl od funkce TRP kanálů a vápníku při ESD ale role ROS a oxidativního stresu doposud nebyla experimentálně zkoumána. Tato práce proto představuje první experimentální otestování vlivu ROS na ESD plazů.

3.2 Jak s tím souvisí hypoxie?

Hypoxické podmínky mohou ovlivnit fungování organismu na mnoha úrovních (review Bickler & Buck 2007). Z hlediska ESD je hypoxie zajímavá hned z několika důvodů. Především je důležité zjištění, že při hypoxických podmínkách může organismus produkovat

ve zvýšené míře ROS (Hermes-Lima & Zenteno-Savín 2002, Bickler & Buck 2007, Clanton 2007). Hypoxie také může aktivovat CIRBP, nebo dráhu NF- κ B (D'Ignazio & Rocha 2016, Zhong & Huang 2017), tedy již zmíněné potenciální hráče při ESD. Experimentální otestování vlivu hypoxických podmínek na ESD je navíc ekologicky velmi relevantní, protože vejce plazů mohou být vystavena hypoxickým podmínkám během inkubace i v přírodě (Ackerman 1977, Booth & Dunstan 2018). Bylo také zjištěno, že hypoxie může mít maskulinizační vliv na vývoj gonád GSD druhů ryb dánia pruhovaného (*Danio rerio*) a medaky japonské (*Oryzias latipes*) (Shang et al. 2006, Cheung et al. 2014). To vše vybízí i k otestování vlivu hypoxických podmínek na embrya plazů s ESD.

4 Cíle práce

V této práci si kladu za hlavní cíl otestovat na základě teoretických předpokladů publikovaných v práci Castelli et al. (2020) vliv ROS na ESD u dvou druhů gekonů. Za tímto účelem je nejdříve třeba u obou druhů určit začátek termosenzitivní periody, kdy je embryo citlivé na teplotu, podle které se začnou diferencovat gonády. Začátek termosenzitivní periody bude určen u obou druhů ve dvou teplotách – v teplotě produkující samice a teplotě produkující největší podíl samců. Poté bude nasbíráno adekvátní množství vajec obou druhů, která budou v těchto teplotách inkubována a na začátku termosenzitivní periody budou ošetřena paraquatem, látkou indukující vznik superoxidu. Po vylíhnutí mláďat bude posouzen vliv aplikace paraquatu na mortalitu embryí, délku inkubace, hmotnost mláďat při vylíhnutí a především pohlaví.

Cílem této práce je také otestovat vliv hypoxických podmínek na ESD. Proto bude dostatečný počet vajec stejných druhů gekonů po celou délku inkubace umístěn do hypoxických podmínek. Stejně jako po ošetření paraquatem bude posouzen vliv hypoxie na mortalitu embryí, délku inkubace, hmotnost mláďat při vylíhnutí a hlavně pohlaví.

5 Metodika

5.1 Zvířata a jejich chov

Pro tuto práci byla během roku 2023 sbírána a experimentálně manipulována vejce dvou nepříbuzných druhů gekonů s prokázaným environmentálním určením pohlaví (Viets et al. 1993, Straková et al. 2024). Jedná se o gekona *Pachydactylus tigrinus* (Gekkonidae) a velmi běžně laboratorně využívaného gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*: Eublepharidae). Obrázek 3 ukazuje normy reakce těchto druhů – závislost poměru pohlaví mláďat na inkubační teplotě. Všechna zvířata, od kterých byla vejce sbírána, byla chována v akreditovaném zařízení PřF UK Experimentální chovy obratlovců (č. akreditace 435/2021-MZE-18134).

5.1.1 Gekončík noční (*Eublepharis macularius*)

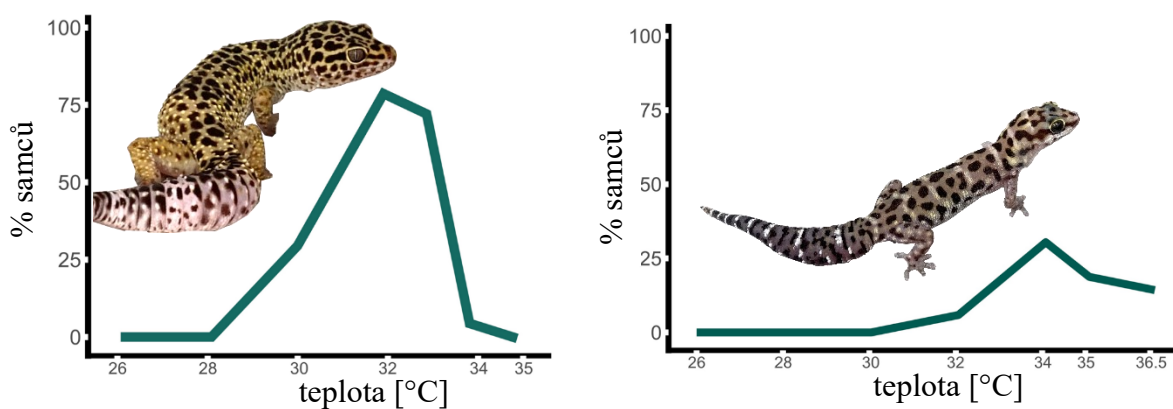
Celkem bylo zapojeno 78 adultních samic, které jsou potomky F1 a F2 generace legálně importovaných jedinců z Pákistánu. Tyto samice byly pářeny s co nejméně příbuznými samci stejného původu. Ubytování všech zvířat probíhalo individuálně v teráriích s rozměry 15 x 20 x 45 cm (délka x výška x hloubka). Terária byla zařízena bentonitovým substrátem na dně, úkrytem, kladištěm s pravidelně vlhčeným lignocelem a dvěma miskami – na vodu a mletý vápenec. Nastavená teplota v chovné místnosti dosahovala přes den na maximálních 26 °C, v noci klesala na 23 °C a lokální ohřev terárií byl zajištěn topnou fólií umístěnou pod zadní třetinou terárií, díky čemuž vznikl gradient teplot umožňující termoregulaci zvířat. Přírozená dvanáctihodinová fotoperioda byla napodobena zářivkovými svídky v chovné místnosti s režimem postupného rozsvícení a zhasínání. Krmení probíhalo jednou týdně cvrčky banánovými (*Gryllus assimilis*) odpovídající velikosti v počtu 15 až 17 kusů na jedince. Krmní cvrčci byli při každém krmení obaleni vitaminovou směsí Roboran. Zvířata měla přístup k vodě a mletému vápenci *ad libitum*, přičemž voda byla v průběhu snášení vajec samicemi jednou za dva týdny obohacena směsí vitamínů A a D₃.

Jelikož jsou gekončíci noční sezónními živočichy, je pro jejich zdárné rozmnožení důležité napodobit zimní období klidu snížením teploty a omezením příjmu potravy. To bylo zajištěno postupným snižováním teplot i krmných dávek v listopadu 2022 po dobu tří týdnů a následné snížení teploty až na konečných 17 °C bez možnosti lokálního ohřevu. V takových podmínkách bez potravy (ale se stálým přístupem k čerstvé vodě) byla zvířata zimována po dobu dvou měsíců až do konce ledna 2023, kdy byly teploty a krmné postupně zvyšovány po dobu tří týdnů až na standardní letní teplotní a krmný režim zmiňovaný v předchozím odstavci.

Po odzimování byly v únoru samice pářeny se samci. Opakované páření pak proběhlo ještě v dubnu pro zajištění optimální fertility samic. Mláďata byla chována individuálně v plastových dózách, podmínky chovu byly stejné jako u dospělců, avšak nebyla zimována.

5.1.2 Gekon *Pachydactylus tigrinus*

Chovní gekoni *Pachydactylus tigrinus* využití pro potřeby této práce byli potomky jedinců legálně importovaných z Mozambiku. Na rozdíl od gekončků nočních byli tyto gekoni chováni ve skupině jednoho samce a dvou až devíti samic v teráriích o rozměrech 15 x 20 x 35 cm (délka x výška x hloubka). Jelikož tento druh dosahuje maximální velikosti s ocasem nepřesahující 12 cm a je v rámci chovných skupin snášenlivý vůči ostatním jedincům svého druhu, nečiní takový chov obtíže. Na dně terárií byla umístěna 2 – 3 cm vrstva praného písku, kam gekoni i kladli vejce, a úkryty tvořily horizontálně i vertikálně situované kartónové proložky na slepičí vejce. V teráriích byly stále umístěny i misky s vodou a mletým vápencem. Nastavená teplota v chovné místnosti dosahovala přes den na maximálních 27 °C a v noci na 23 °C. Lokální ohřev terárií byl opět zajištěn topnou fólií pod zadní třetinou terária. Světelný režim byl stejný jako u gekončika nočního. Gekoni byli krmeni se stejnou frekvencí a stejným způsobem jako předchozí druh, pouze velikost krmných cvrčků byla přizpůsobena menšímu věku. Na rozdíl od gekončků nočních nevyžadují pro zdárné rozmnožení tyto gekoni sezónní změnu podmínek, a tak byly podmínky chovu neměnné po celou dobu sběru dat pro tuto práci. Mláďata byla chována individuálně v plastových krabičkách a později byla přendána do skleněných terárií o stejných rozměrech jako terária dospělců. Podmínky byly stejné jako u dospělců, pouze krmení probíhalo dvakrát až třikrát týdně.



Obrázek 3 – normy reakce gekončika nočního (vlevo) a gekona *P. tigrinus*, dle Viets et al. 1993 a Straková et al. 2024, fotografie gekonů jsou vlastní

5.2 Sběrání a inkubace vajec

Důležité pro tuto práci bylo načasování experimentálních manipulací, proto bylo třeba znát stáří nakladených vajec. Vejce tak byla sbírána z terárií v průběhu období kladení samic jednou za 1 – 2 dny, aby byla co nejčerstvější po naklazení. Vejce gekončků byla očištěna od ulpívajícího substrátu a zvážena pomocí laboratorní váhy Vibra AJH 320CE. Jelikož vejce gekonů *P. tigrinus* byla často kladena slepená ve dvojici, nebylo mnohdy možné je zvážit individuálně a zároveň většinou vážení ztěžoval písek přilepený na vejcích, který nebylo možné odstranit bez poškození vejce, proto nebyla vejce vážena a na základě předchozích úspěšných vážení jednotlivých vajec byla určena průměrná hmotnost jednoho vejce na 0,4 g (Straková 2023, nepublikováno) se zanedbáním individuální variability. Vejce obou druhů byla následně individuálně (případně slepená ve dvojici) přemístěna do krabiček vhodných na inkubaci. Inkubační krabičky byly perforované, aby se do nich mohl dostávat vzduch, a na jejich dně byl umístěn substrát vhodný pro inkubaci vajec daného druhu. Ten pro gekončíka nočního představuje vlhký lignocel, do kterého jsou vejce zahrabána, zatímco vejce gekonů *P. tigrinus* byla inkubována položena na suchém praném písku. Připravené inkubační krabičky s vejci byly přeneseny do osvědčených na míru vyrobených inkubátorů. Tyto inkubátory opatřené dataloggerem udržovaly přednastavenou teplotu s přesností na 0,1 °C. Experimentální vejce byla inkubována v teplotě produkující pouze samice (28 °C pro oba druhy) a teplotě produkující samce (32 °C u gekončíka nočního a 34 °C u gekonů *Pachydactylus*, viz normy reakce Obr. 3). V průběhu inkubace byl inkubační substrát s vejci gekončků nočních pravidelně dle potřeby jednou za 7 – 14 dní vlhčen pro zajištění optimální inkubační vlhkosti.

5.3 Určení začátku termosenzitivní periody

Během termosenzitivní periody embryo zpracovává teplotní signál z prostředí, na základě kterého se následně začnou diferencovat gonády. Nejdříve na začátku této periody je tak vhodná doba pro provádění experimentálních manipulací vajec, jejichž cílem je ovlivnit potenciálně zásadní molekuly podílející se na percepci teplotního signálu embryem. Díky inkubačním experimentům bylo doposud zjištěno, že k otevření termosenzitivního okna dochází na konci první třetiny embryonálního vývoje a toto načasování je podobné u všech zkoumaných skupin plazů s ESD (Bull 1987, Mrosovsky & Pieau 1991). U gekonů tato doba nastává ve vývojovém stádiu 32, které morfologicky zhruba odpovídá stádiu 15 želv a stádiu 13 – 14 aligátorů (Bull 1987, embryonální stadialita dle Yntema 1968, Ferguson 1985, Wise et

al. 2009, Griffing et al. 2019). Zaměříme-li se na gekony, je pro stádium 32 z hlediska vnějších morfologických znaků typický především počínající rozvoj mandibuly, která ale nedosahuje dále než do poloviny délky kraniofaciální oblasti. Dále rozvoj hrudních i pánevních končetin a jejich diferenciaci na stylopodium, zeugopodium a autopodium, avšak na autopodiu nejsou ani náznakem viditelné prsty (Wise et al. 2009, Griffing et al. 2019). Stádium 32 je dosaženo v různé době po snesení v závislosti na stupni vývoje embrya během snášení a teplotě inkubace, která zásadním způsobem ovlivňuje rychlost vývoje (Noble et al. 2018). Jelikož se mezi sebou mohou jednotlivé druhy gekonů lišit ve stupni vývoje při snesení (Griffing et al. 2019) a zároveň byla vejce druhů využitých v této práci inkubována ve třech teplotních režimech, bylo nejprve před prováděním experimentálních manipulací nutné prozkoumat, kdy u obou druhů v různých teplotách začíná termosenzitivní perioda.

Pro gekončíka nočního byla publikována vývojová řada v konstantní inkubační teplotě 28 °C a stádium 32 nacházíme 12. – 14. den po ovipozici (Wise et al. 2009). Pro gekona *P. tigrinus* nebyla publikovaná vývojová řada v žádné teplotě, a proto byla v tomto ohledu nejdříve podrobněji prozkoumána jeho embryonální stadiálníta ve 28 °C po dobu 4 týdnů, v rámci nichž je na základě vývojové řady gekončíka nočního v této teplotě předpokládáno, že se embrya vyvinou do stádia 32 (tedy nastane začátek termosenzitivní periody) i u tohoto druhu. Každý den po ovipozici tak byla otevřena minimálně 2 – 3 vejce, přičemž byla použita pouze vejce, u kterých bylo známé přesné stáří. Embrya byla vyjmuta, fixována ve 4% paraformaldehydu a vyfocena pomocí stereolupy Olympus SZX 12. Na základě vnější morfologie bylo určeno vývojové stádium embryí dle Wise et al. (2009) a Griffing et al. (2019). Podobně byl tento druh zkoumán i ve 34 °C, avšak byl brán zřetel spíše na otevření vajec mladších než 12 dní po snesení, jelikož je vývoj ve 34 °C rychlejší. Tato embrya nebyla focena. Stejně tak byla otevřena i vejce gekončíka v období okolo předpokládaného začátku termosenzitivní periody ve 32 °C. Musím podotknout, že cílem nebylo prozkoumat vývojovou řadu obou druhů v různých teplotách, ale spíše získat základní představu o začátku termosenzitivní periody pro efektivnější provedení následných experimentálních manipulací.

5.4 Experimentální manipulace

Za účelem otestování vlivu reaktivních forem kyslíku na environmentální určení pohlaví byla vejce obou druhů experimentálně manipulována pomocí paraquat. Na základě teoretických předpokladů byla otestována i role hypoxie.

5.4.1 Paraquat

Paraquat (v této práci též značen jako PQ) je látka, která dříve byla (a v některých zemích stále je) používaná jako účinný neselektivní herbicid. Později ale bylo zjištěno, že je paraquat toxický také pro živočichy a často i lidem, kteří s ním přijdou do úzkého kontaktu, způsobí závažné zdravotní potíže (Smith 1988). Po odhalení mechanismu jeho toxického působení se však stal velice významnou látkou v rukou výzkumníků. Paraquat totiž v organismu indukuje vznik superoxidových radikálů, které přirozeně jako vedlejší produkt produkují mitochondrie během aerobní respirace (Dinis-Oliveira et al. 2008, Murphy 2009), a je tak při vhodném použití doporučován pro studium vlivu ROS na organismy (Murphy et al. 2022).

Problémem při využití paraquatu pro účely experimentálních manipulací vajec byla absence jakýchkoliv informací týkajících se jeho koncentrace, dávkování a způsobu aplikace do vajec plazů. Proto byla dávka a koncentrace paraquatu odhadnuta na základě prací dostupných pro jiné organismy. Jednou ze zkoumaných skupin z hlediska toxického působení paraquatu byli v druhé polovině minulého století někteří vrubozobí a hrabaví ptáci, u kterých zájem badatelů směřoval i na působení paraquatu na vejce, do kterých byl vpravován různými metodami a v různých koncentracích (viz Dunachie & Fletcher 1970, Hoffman 1990). Mezi vyzkoušené metody aplikace patří ponořování vajec do vodného roztoku paraquatu, postřikání vodným roztokem paraquatu a jeho injekce přímo do žloutku vejce. Jelikož mezi standardní empiricky ověřené metody aplikace látek do plazích vajec patří injekce do žloutku a povrchová aplikace na skořápku, byly obě metody zvoleny i pro tuto práci.

Dunachie a Fletcher (1970) zjistili, že injekce paraquatu do vejce kura domácího na začátku inkubace po snesení při dosažení konečné koncentrace paraquatu ve vejci rovné a vyšší než 0,3 ppm (*parts per million*, koncentrace 1 ppm ve vejci znamená 1 µg paraquatu na 1 g vejce, dle Dunachie & Fletcher 1969) zahynula všechna embrya. Nejnižší koncentrace použitá Dunachiem a Fletcherem (1970) byla 0,1 ppm, která sice významně zvýšila mortalitu, avšak embrya ji dokázala přežít, proto na tuto koncentraci paraquatu ve vejci při injekční aplikaci bylo cíleno i v této práci.

Paraquat byl zakoupen u firmy Sigma-Aldrich (č. produktu 856177), jedná se o stejný typ paraquatu, který byl využit Dunachiem a Fletcherem (1970). Na základě předchozích zkušeností Strakové et al. (2023, nepublikováno) z pokusů s hormonálními manipulacemi vajec druhů využitých i v této práci pomocí injekční metody byl do vajec vpravován objem 0,5 µl

roztoku paraquatu na 1 g vejce. Pro dosažení koncentrace 0,1 ppm (= 0,1 µg na 1 g vejce) ve vejci byl připraven zásobní roztok paraquatu o koncentraci 200 µg/ml. Destilovaná voda byla použita jako ředidlo paraquatu.

Na samotné injekční aplikace byly používány injekce Hamilton o objemu 10 µl na vejce gekončků nočních a 5 µl na menší vejce gekonů *P. tigrinus*. Před vsunutím jehly byla vejce prosvícena kvůli ověření jejich oplození a zároveň tak mohlo být detekováno embryo, díky čemuž bylo možné se mu vyhnout jehlou při aplikaci. Následovalo očištění místa vpichu na vejci buničinou namočenou v ethanolu. Vpich byl proveden v místě, kde se nenacházelo embryo, do hloubky zhruba 0,5 cm u gekončků (u druhého druhu asi o polovinu méně) a byl vpraven požadovaný objem roztoku dle hmotnosti vejce. Poté byla jehla opatrně vysunuta a místo vpichu bylo potřeno lepidlem Super Glue Extra značky Samson, aby nedocházelo k vysychání, či infekcím vejce. S kontrolními vejci bylo zacházeno stejným způsobem, pouze s rozdílem, že do nich byla vpravována pouze destilovaná voda. Jelikož gekoni snášejí invariantní snůšky s dvěma (nebo i s jedním) vejci, bylo při injekční aplikaci vždy náhodně jedno vejce vybráno a manipulováno paraquatem, zatímco druhé vejce posloužilo pro kontrolní injekci.

Povrchová aplikace na skořápku vajec byla prováděna pomocí laboratorních pipet Eppendorf. Kvůli předpokládané horší propustnosti vaječné skořápky byl používán zásobní roztok paraquatu o koncentraci 2000 µg/ml. Aplikovaný objem pro gekončiky byl stejný jako při injekční aplikaci, zatímco na všechna vejce gekonů *P. tigrinus* bylo aplikováno 0,5 µl (tj. 1,25 µl roztoku na 1 gram vejce), kvůli nepřesnostem pipety při pipetování menšího objemu. Kontrolní manipulace nebyly prováděny z důvodu zanedbatelného objemu, který byl na vejce aplikován. Všechny manipulace byly provedeny na začátku termosenzitivní periody.

5.4.2 Hypoxie

Za účelem vystavení embryí hypoxickým podmínkám byla na míru vyrobena hypoxická komora. V této komoře bylo možné pomocí zabudovaných senzorů nastavit požadovanou míru hypoxie, která byla stabilně udržována řízeným vpouštěním dusíku. Dusík byl v tomto případě využit k vytlačení vzduchu z komory díky jeho inertnosti. Kromě koncentrace kyslíku v komoře bylo možné nastavit i požadovanou teplotu, obdobným způsobem jako v inkubátorech použitých pro inkubaci vajec. Hypoxická komora byla opatřena dataloggerem pro zaznamenávání teploty i koncentrace kyslíku. Na rozdíl od manipulací paraquatem byla vejce umístěna do hypoxické komory ihned po naklazení. Při provedení pilotního pokusu byla komora nastavena na 10 % kyslíku a 32 °C, aby bylo nejdříve otestováno, zda embrya dokáží

tyto podmínky přežít. Po provedení pilotního pokusu bylo naplánováno vystavit embrya v případě jejich přežívání teplotě 28 °C se stejnou koncentrací kyslíku a poté případně zkusit obě teploty znovu při vyšší 14% koncentraci kyslíku. Kvůli technickým potížím s hypoxickou komorou však proběhl pouze pilotní pokus ve 32 °C s 10 % kyslíku.

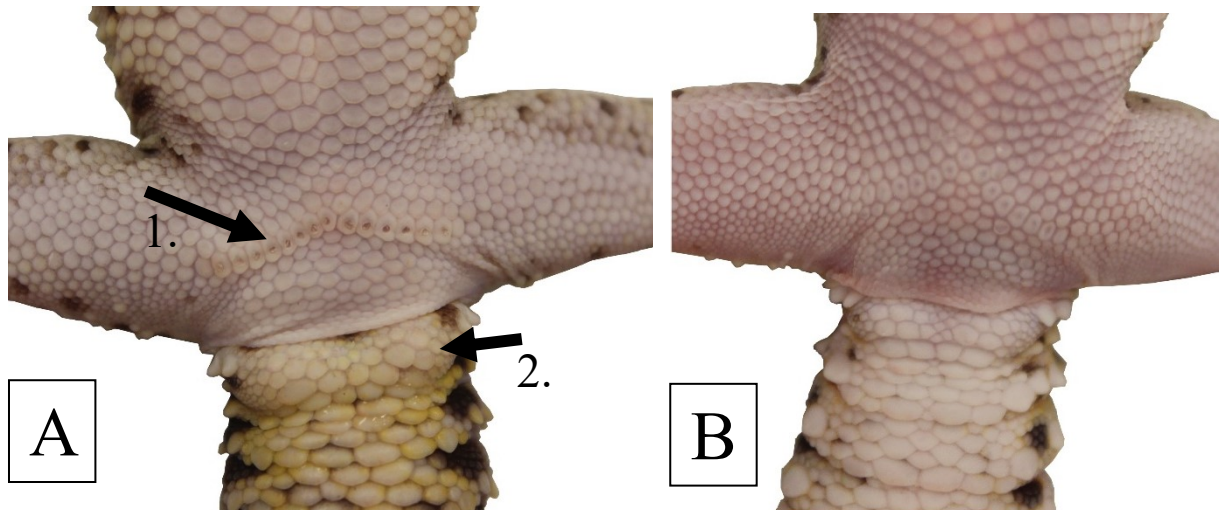
5.5 Měření míry oxidativního poškození

Aby bylo možné kromě samotného vlivu paraquatů na vývoj gonád gekonů zhodnotit i jeho biologické působení na embrya, byly u embryí gekončika nočního injikovaných paraquatem a kontrolně injikovaných měřeny využívané markery oxidativního poškození. V embryích byl po manipulaci stanoven redukováný glutathion, malondialdehyd (metodou TBARS), byly stanoveny karbonylové skupiny jako markery karbonylace proteinů a sledovány byly i konečné produkty pokročilé glykace (AGEs, *advanced glycation end products*). Celkem bylo změřeno 12 embryí z paraquatem a 10 embryí z kontrolně injikovaných vajec z 32 °C a 8 embryí z paraquatem a 9 embryí z kontrolně injikovaných vajec z 28 °C.

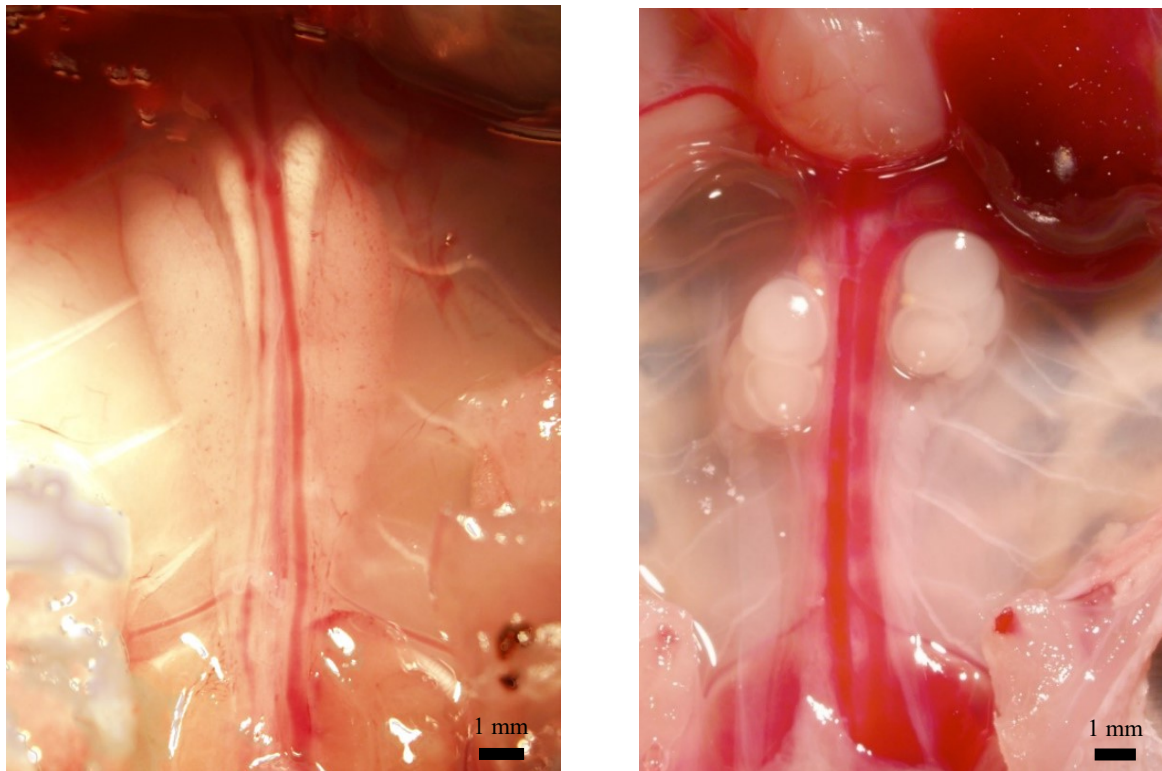
Jelikož je stanovení míry oxidativního poškození náchylné k metodickým chybám (review Murphy et al. 2022), všechna měření byla nejdříve konzultována a nakonec i provedena Mgr. Danielou Novákovou z katedry fyziologie PřF UK, která všechna zmíněná laboratorní měření rutinně provádí a pracuje v laboratoři s odpovídajícím vybavením. Má práce zahrnovala sběr všech využitých embryí, jejich přípravu na měření a skladování. Protokol přiložený v přílohách vypracovala a poskytla Mgr. Daniela Nováková.

5.6 Identifikace pohlaví mláďat

Identifikace pohlaví vylíhnutých mláďat probíhala dvěma metodami. První bylo vizuální prohlédnutí zvířat se zaměřením na přítomnost femorálních pórů, které jsou více viditelné u samců, a hemipenálních kapes samců (viz Obr. 4). Na tuto metodu bylo kvůli své nespolehlivosti u mladších zvířat spoléháno pouze v případě, že zvířata byla chována do jednoho roku věku. Druhou metodou, která byla použita na většinu zvířat, byla pitva s morfologickou inspekcí gonád (Obr. 5).



Obrázek 4 – kloakální oblast gekončíka nočního, A – samec (šipka 1. naznačuje femorální póry, šipka 2. zduřelou oblast hemipenálních kapes), B – samice



Obrázek 5 – gonády gekončíka nočního, vlevo samec – varlata, vpravo samice – vaječníky

5.7 Analýza dat

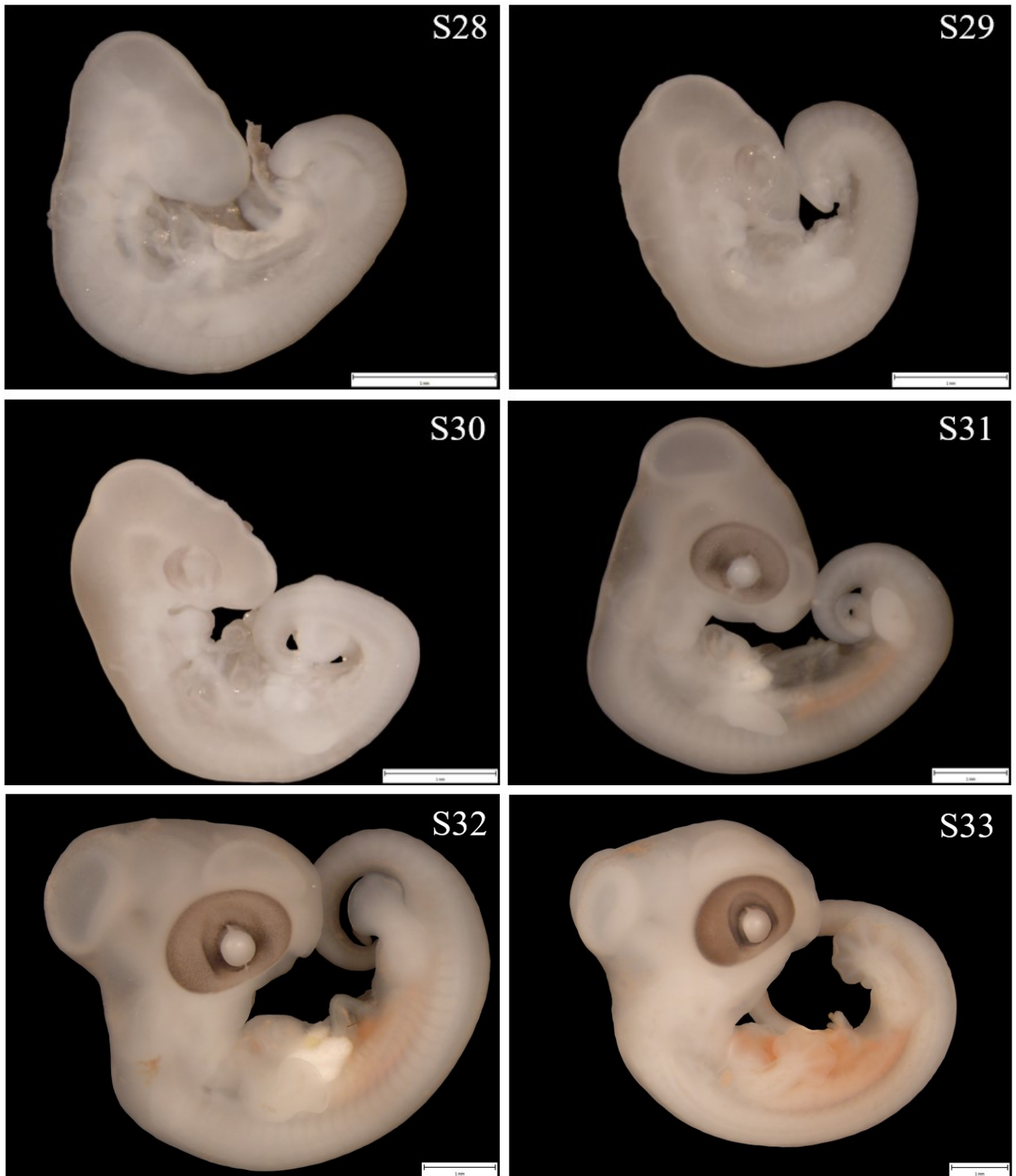
Analýza dat probíhala ve volně dostupném programu R (verze 4.2.3) s využitím balíčků ggplot2 a lattice pro grafy a emmenas pro provedení *post hoc* testů. Pro analýzu bylo využito zobecněných lineárních modelů (GLM) s definovaným rozložením dat v souladu s doporučeními pro analýzu tohoto typu dat dle Pekára a Brabce (2020). Modely s binomickým rozdělením byly kontrolovány na overdispersi. Nejvhodnějšího modelu bylo dosaženo metodou *backward selection*. Do analýzy vlivu manipulací na délku inkubace, hmotnost mlád'at při vylíhnutí a pohlaví byla přidána pro porovnání s manipulacemi i nemanipulovaná vejce a mlád'ata z roku 2022, která nasbírala konzultantka této práce Mgr. Barbora Straková. Tato vejce pochází od stejných samic, jejichž vejce byla použita při experimentech v této práci. S těmito samicemi a jejich vejci bylo zacházeno stejným způsobem jako během sezóny 2023, kdy byly prováděny všechny experimenty. Starší data však nebyla použita v analýze mortality, jelikož je mortalita v různých sezónách značně variabilní, což ztěžuje porovnání.

6 Výsledky

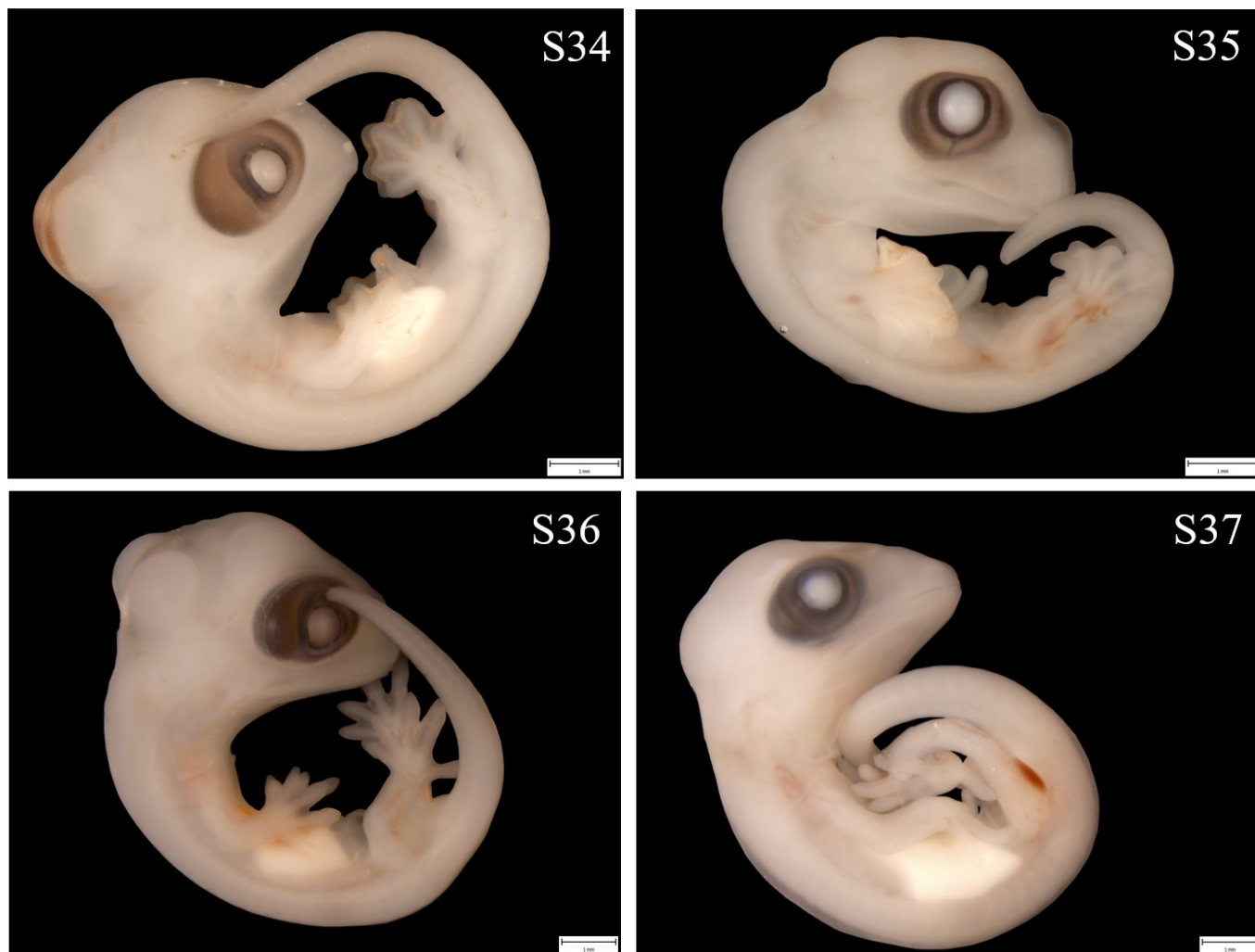
6.1 Začátek termosenzitivní periody

Bylo zjištěno, že gekon *P. tigrinus* snáší vejce s embryi ve stejném stupni vývoje (stádium 28) jako gekončík noční. Začátek termosenzitivní periody (vývojové stádium 32) gekona *P. tigrinus* ve 28 °C byl nalezen mezi 12. a 16. dnem inkubace, což zhruba odpovídá výskytu stádia 32 gekončíka nočního (stádium 32 mezi 12. – 14. dnem po snesení, dle Wise et al. 2009). Vejce obou druhů proto byla v teplotě 28 °C chemicky manipulována mezi 12. a 14. dnem po snesení. Grafy 1 a 2 zobrazují rozmezí, ve kterých byly pozorována jednotlivá vývojová stádia gekona *P. tigrinus* a gekončíka nočního od začátku inkubace až do konce termosenzitivní periody – stádia 28 až 37 (Bull 1987). Na obrázcích 6 a 7 jsou ukázána nasbíraná embrya v těchto stádiích u gekona *P. tigrinus*.

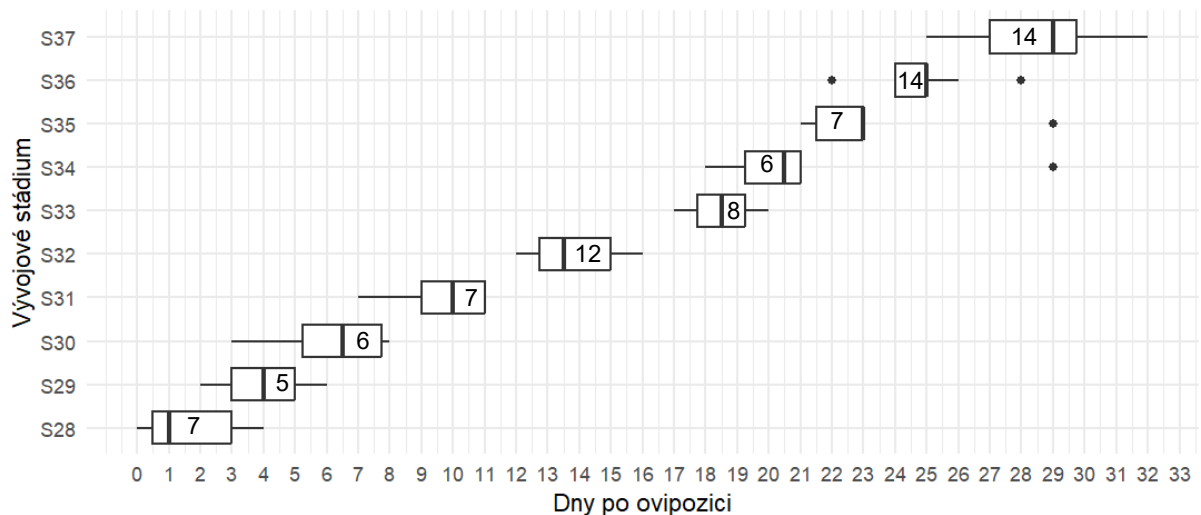
Stádium 32 bylo u gekona *P. tigrinus* inkubovaného ve 34 °C nalezeno mezi 7. až 9. dnem (prozkoumaná embrya v tomto stádiu $n = 4$) inkubace a u gekončíka nočního bylo stejné stádium v inkubační teplotě 32 °C nalezeno mezi 7. až 10. dnem inkubace (prozkoumaná embrya v tomto stádiu $n = 3$). V obou teplotách proto byla vejce obou druhů manipulována mezi 7. až 10. dnem inkubace.



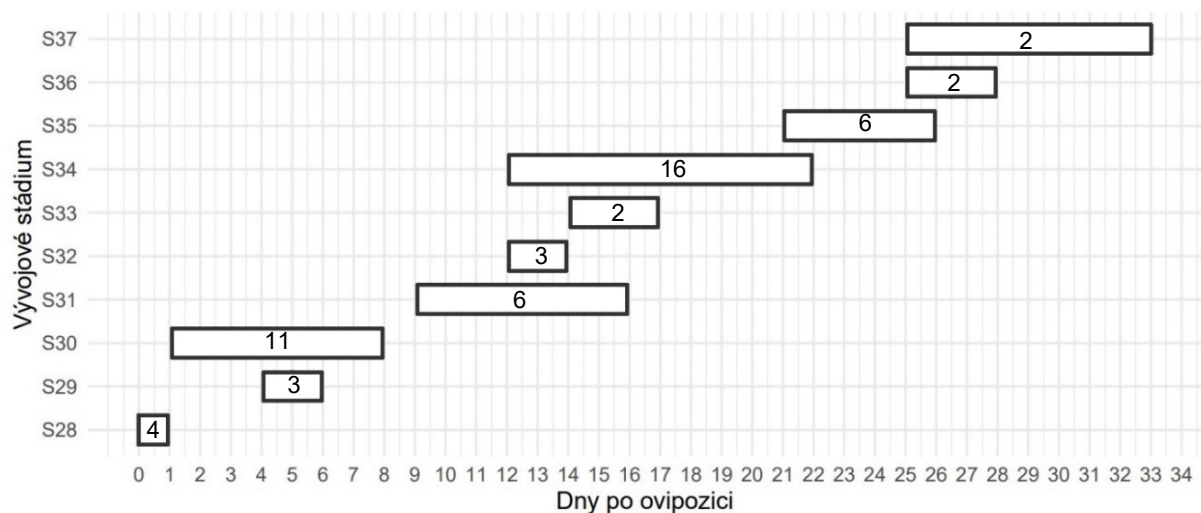
Obrázek 6 – vývojová stádia 28 až 33 gekona *Pachydactylus tigrinus*, ve stádiu 32 začíná termosenzitivní perioda, měřítko 1 mm



Obrázek 7 – vývojová stádia 34 až 37 gekona *Pachydactylus tigrinus*, ve stádiu 37 končí termosenzitivní perioda, měřítko 1 mm



Graf 1 – trvání jednotlivých vývojových stádií gekona *Pachydactylus tigrinus* inkubovaného ve 28 °C, čísla v boxech značí počet nalezených embryí v daném stádiu



Graf 2 – trvání jednotlivých vývojových stádií gekončika nočního inkubovaného ve 28 °C, rekonstruováno s využitím dat Wise et al. (2009). Na základě dat z této studie bylo možné pouze ukázat rozmezí dnů, kdy byla jednotlivá stádia pozorována. Číslo v boxu udává počet nalezených embryí v daném stádiu.

6.2 Paraquat a hypoxie

6.2.1 Gekončík noční (*Eublepharis macularius*)

Celkově bylo pro tuto práci v sezóně 2023 využito 335 vajec, z toho 39 bylo použito na měření míry oxidativního poškození (viz kapitola Měření míry oxidativního poškození) a 296

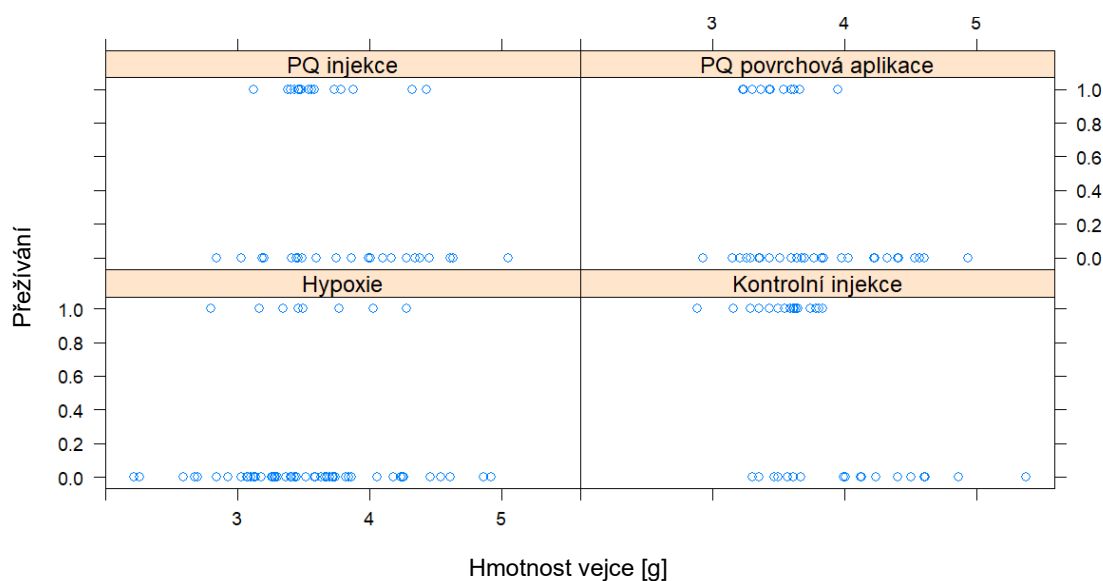
bylo manipulováno. Počty vajec v obou teplotách použité pro jednotlivé manipulace a mláďat, která se z těchto vajec vylíhla, zobrazuje tabulka 1.

	28 °C			32 °C		
	manipulováno	vylíhnuto	mortalita	manipulováno	vylíhnuto	mortalita
PQ injekce	41	26	36,6 %	38	16	57,9 %
Kontrolní injekce	37	19	48,6 %	37	18	51,4 %
PQ povrchová aplikace	40	37	7,5 %	38	11	71,1 %
Hypoxie	x	x	x	65	8	87,7 %

Tabulka 1 – počty manipulovaných vajec, vylíhnutých mláďat a embryonální mortalita gekončíka nočního

6.2.1.1 Vliv na mortalitu

Nejdříve byl testován vliv manipulací na mortalitu embryí ve 32 °C pomocí GLM s binomickým rozložením dat a do modelu byla přidána hmotnost vejce jako interakční člen. Tento model ukazuje významný vliv manipulace ($p < 0,001$), i hmotnosti vejce ($p < 0,001$), ale i interakce manipulace a hmotnosti vejce ($p = 0,0375$) na mortalitu embryí. Model tak nebyl dále zjednodušen. Prohlédnutí shrnující tabulky modelu pro prozkoumání vlivu hmotnosti a interakce hmotnosti a manipulace ale ukázalo pouze na signifikantní interakci mezi hmotností a kontrolní injekcí (hodnota koeficientu -3,49; $p = 0,0187$). Negativní hodnota tohoto koeficientu naznačuje vyšší mortalitu se zvyšující se hmotností vejce. To naznačuje i neformální grafické prozkoumání tohoto vztahu (viz graf 3). Z naměřených dat vyplývá, že v rámci kontrolních injekcí paraquat, je prahová hmotnost vejce 90% mortality 4,33 g. Model pro pravděpodobnost přežití v rámci této manipulace dle odhadnutých koeficientů vypadá takto $\frac{1}{1+\exp(-12.83369+3.47101*hmotnost\ vejce\ [g])}$ (vypočítáno dle Pekára a Brabce 2020, str.251). Je však třeba si uvědomit limity tohoto modelu, především nulovou vypovídající hodnotu pravděpodobnosti přežití velmi malých vajec. Pro samotné porovnání efektu manipulací na mortalitu bylo využito párového *post hoc* Tukeyho testu a ukázalo se, že se mezi sebou v rámci manipulací z hlediska mortality liší pouze hypoxie a kontrolní injekce ($p = 0,0065$) a také hypoxie a injekce paraquatem ($p = 0,011$).

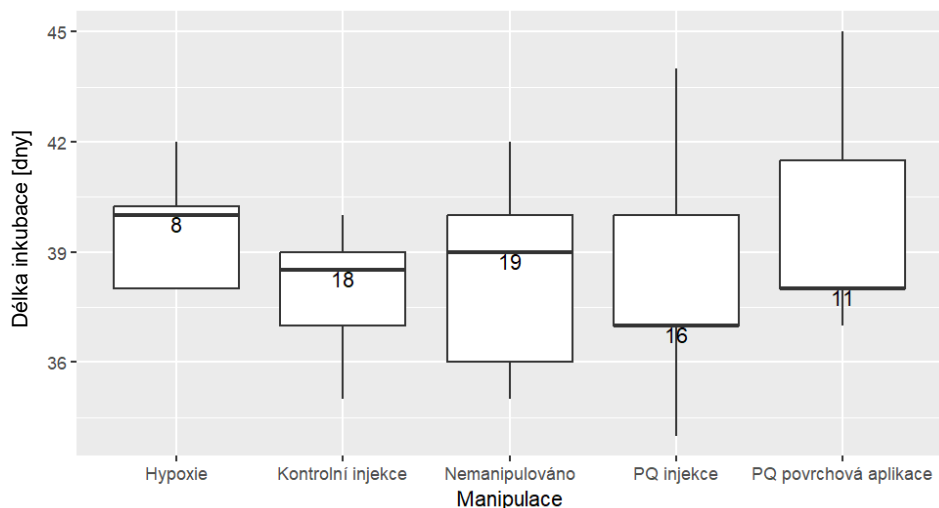


Graf 3 – porovnání přežívání embryí z různě velkých vajec v rámci jednotlivých manipulací ve 32 °C. Na ose x je hmotnost vejce v gramech a na ose y přežití embrya (1 = přežilo, 0 = nepřežilo)

Po prohlédnutí tabulky 1 je patrné, že byla mortalita ve 28 °C nižší než ve 32 °C a patrná je především pouze 7,5% mortalita embryí, kterým byl paraquat aplikován na skořápku. Analýza pomocí GLM s binomickým rozložením dat a hmotností vejce jako interakčním členem na rozdíl od 32 °C ukázala nevýznamný vliv jak interakce manipulace a hmotnosti vejce ($p = 0,18$), tak i samotné hmotnosti vejce ($p = 0,11$). Vliv manipulace na mortalitu byl významný ($p < 0,001$). Model byl dále zjednodušen odstraněním hmotnosti vejce. Po zjednodušení zůstal vliv manipulace stále signifikantní ($p < 0,001$). *Post hoc* srovnání Tukeyho testem ukázalo, že se efekt aplikace paraqatu na skořápku signifikantně liší jak od injekční aplikace ($p = 0,0112$), tak od kontrolní injekce ($p = 0,001$).

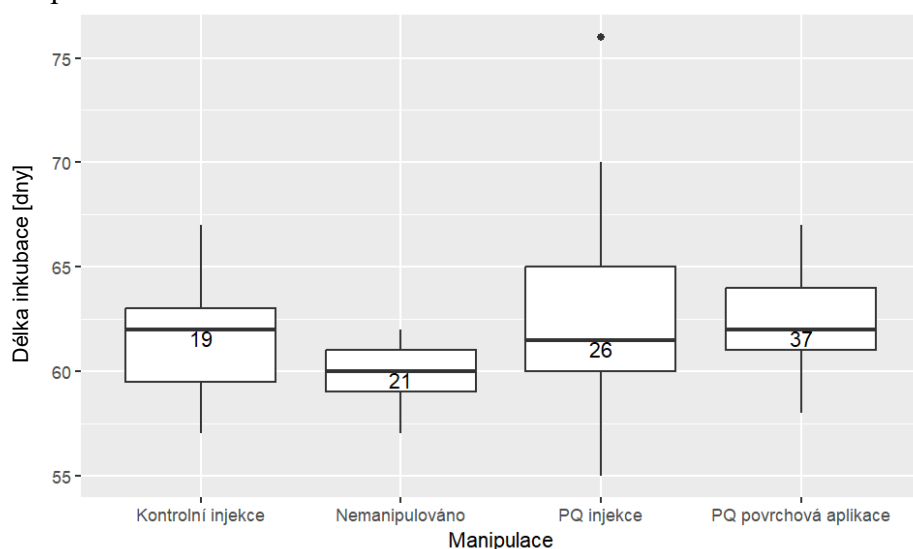
6.2.1.2 Vliv na délku inkubace vajec

Pro analýzu vlivu manipulací na délku inkubace byl jako nejvhodnější zvolen GLM s gamma rozložením dat. Analýza ukázala, že provedené manipulace neměly efekt na délku inkubace ve 32 °C i v porovnání s nemanipulovanými vejci ($p = 0,12$). Průměrná délka inkubace ve 32 °C byla 38,57 dní. Porovnání délek inkubace ve 32 °C znázorňuje graf 4.



Graf 4 – porovnání délky inkubace napříč manipulacemi ve 32 °C, číslo v boxu značí počet hodnot v jednotlivých kategoriích

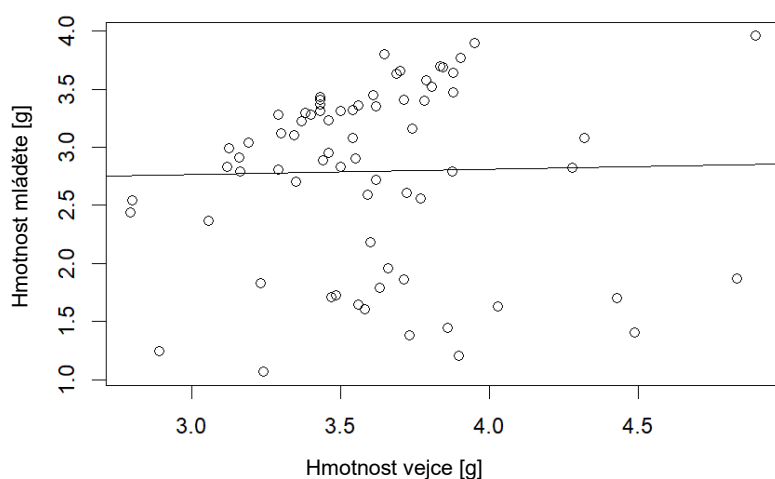
Stejný model byl použit i pro analýzu ve 28 °C. Ukázalo se, že manipulace se mezi sebou nelišily délkou inkubace ($p = 0,41$) a průměrná délka inkubace činila 62,41 dne. Byla-li však do modelu přidána pro porovnání i nemanipulovaná vejce (s průměrnou délkou inkubace 59,67 dne), ukázalo se, že byl vliv manipulací na délku inkubace signifikantní ($p = 0,0011$). *Post hoc* srovnání všech kategorií odhalilo, že se od nemanipulovaných vajec liší pouze vejce injikovaná paraquatem ($p = 0,0017$) a vejce, na která byl paraquat aplikován povrchově ($p = 0,0025$). Tento signifikantní rozdíl zůstal zachován i v případě, že z modelu byly odstraněny hodnoty s odlehlými residuálními hodnotami (76, 70 a 55 dní inkubace u vajec injikovaných paraquatem). Graf 5 ukazuje porovnání všech délek inkubace napříč manipulacemi.



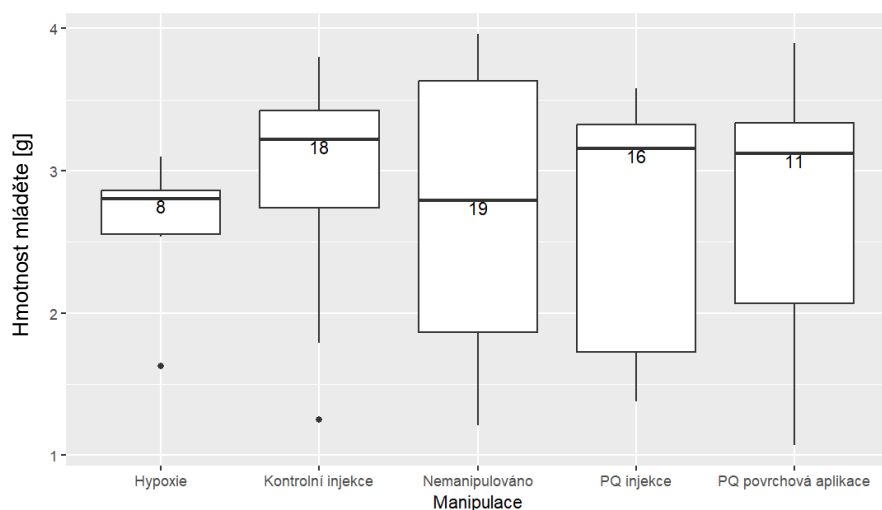
Graf 5 – porovnání délky inkubace napříč manipulacemi ve 28 °C, číslo v boxu značí počet hodnot v jednotlivých kategoriích

6.2.1.3 Vliv na hmotnost mlád'at při vylíhnutí

Vliv manipulací na hmotnost mlád'at ve 32 °C byl po prozkoumání rozložení závislé proměnné testován GLM s definovaným gamma rozložením dat a přidáním interakčního členu hmotnost vejce. Výsledek ukázal na nesignifikantní vliv jak interakce hmotnosti vejce a manipulace ($p = 0,16$), tak i samotné hmotnosti vejce ($p = 0,68$) a signifikantní vliv neměla ani samotná manipulace ($p = 0,78$). Jelikož nevýznamný vztah mezi hmotností vejce a mláděte nebyl očekáván, byly hmotnosti vejce a mláděte vyneseny do grafu a proloženy regresní křivkou pro vizuální prozkoumání tohoto vztahu viz graf 6. I přes nevýznamnost vztahu je patrný mírný trend. Model byl i tak proto dále zjednodušen úplným vynecháním proměnné hmotnost vejce. Zjednodušený model se signifikantně neliší od složitějšího ($p = 0,24$; AIC prvního modelu = 190,2 a AIC zjednodušeného modelu = 186,8) a byl ponechán jako konečný. Vliv manipulace na hmotnost mláděte však stále zůstala nesignifikantní ($p = 0,77$). Průměrná hmotnost mláděte činila 2,79 g. Graf 7 ukazuje hmotnosti mlád'at v jednotlivých kategoriích.



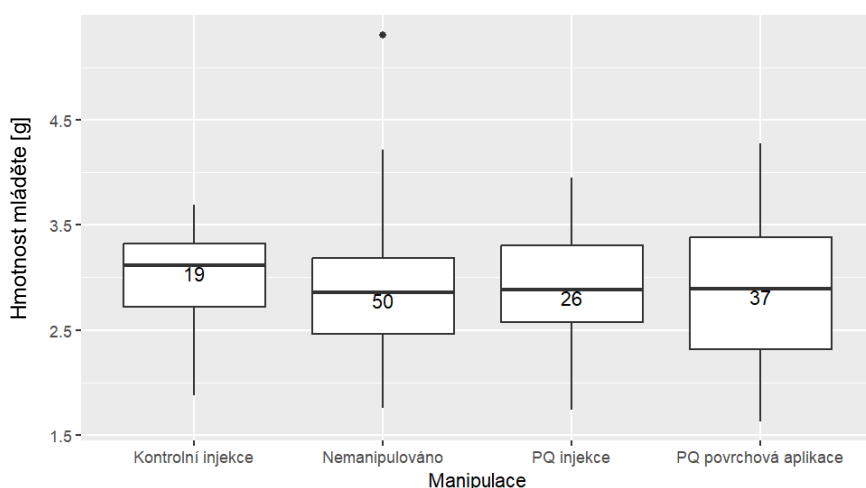
Graf 6 – vztah hmotnosti vejce a mláděte ve 32 °C



Graf 7 – hmotnost vylíhnutých mlád'at ve 32 °C, číslo v boxu značí počet mlád'at v kategorii

GLM s gamma rozložením dat s interakčním členem hmotnost vejce byl použit i pro 28 °C. Výsledek ukázal nesignifikantní vliv interakce hmotnosti vejce a manipulace ($p = 0,90$) a vliv manipulace ($p = 0,82$). Vliv samotné hmotnosti vejce na hmotnost mláděte byl v tomto případě signifikantní ($p = 0,0018$). Model byl proto zjednodušen odstraněním interakce hmotnosti vejce a manipulace a byla ponechána pouze samotná hmotnost vejce a manipulace bez interakce. Zlepšení modelu ale nic nezměnilo na významném vlivu hmotnosti vejce a nevýznamném vlivu manipulace. Průměrná hmotnost mláděte činila 2,88 g. Graf 8 zobrazuje hmotnosti mlád'at v jednotlivých kategoriích.

Porovnáme-li mezi sebou ve stejném modelu hmotnosti mlád'at inkubovaných ve 32 °C a 28 °C, zjistíme, že se hmotnost mlád'at napříč teplotami a manipulacemi signifikantně neliší ($p = 0,35$).



Graf 8 – hmotnost vylíhnutých mlád'at inkubovaných ve 28 °C, číslo v boxu značí počet mlád'at

6.2.1.4 Vliv na pohlaví mlád'at

Tabulka 2 znázorňuje pohlaví vylíhnutých mlád'at v jednotlivých teplotách a manipulacích. V důsledku uhynutí některých mlád'at, u kterých nebylo možné prozkoumat jejich pohlaví, jsou počty zvířat s identifikovaným pohlavím, které vstoupily do analýzy, menší než v případě analýzy embryonální mortality.

Nejdříve byl analyzován vliv manipulací na pohlaví mlád'at ve 32 °C. Za tímto účelem byl použit GLM s binomickým rozložením dat. Jako v předchozích případech byl nejprve uplatněn maximální model zahrnující i interakční člen hmotnost vejce. Výsledek ukázal nesignifikantní vliv manipulací ($p = 0,79$) a hmotnosti vejce ($p = 0,24$) na pohlaví mlád'at. Jako signifikantní se ukázala být interakce mezi manipulací a hmotností vejce ($p = 0,02626$). Po detailnějším prozkoumání shrnující (*summary*) tabulky tohoto modelu se ale ukázalo, že

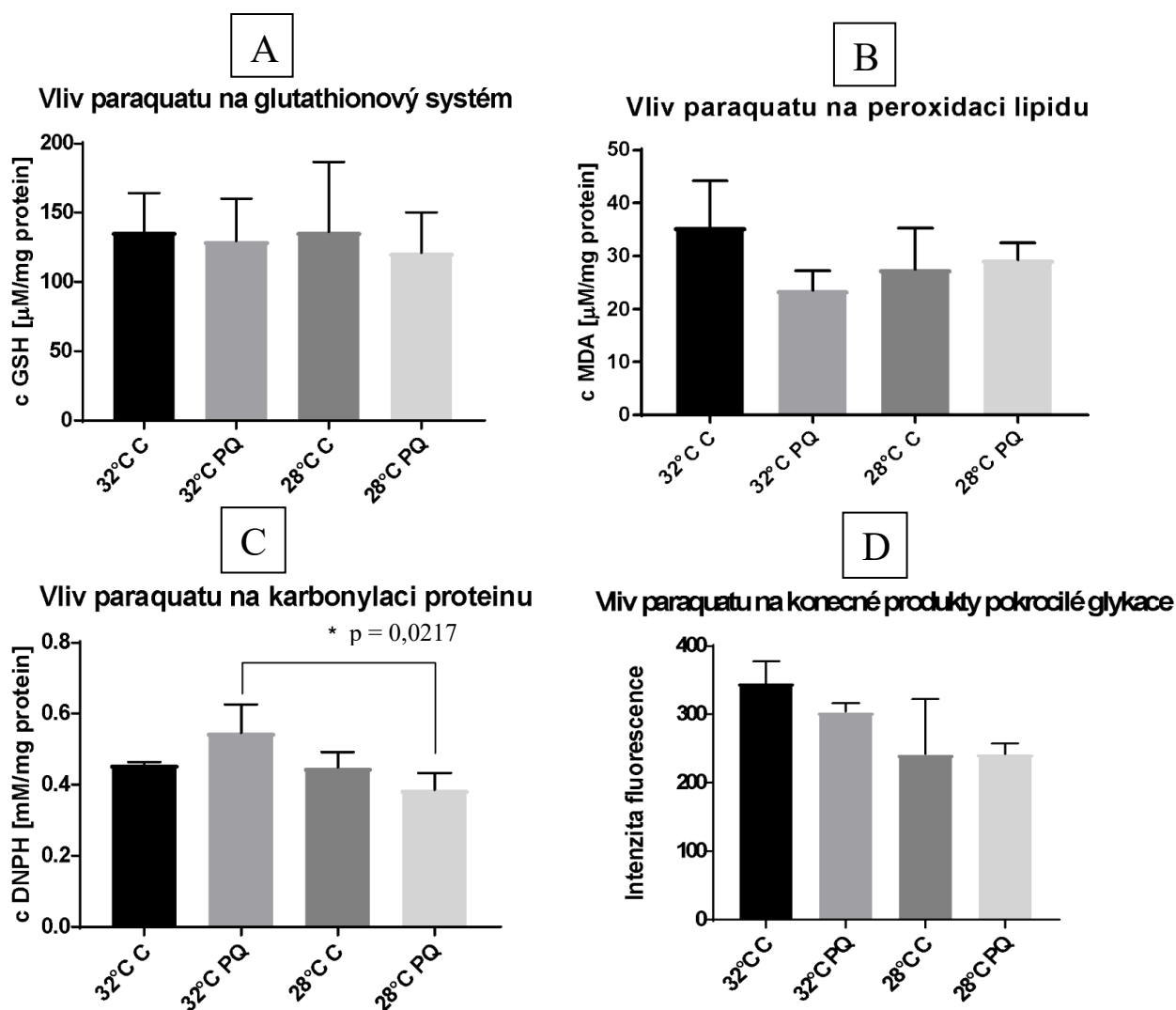
odhadnuté hodnoty jednotlivých koeficientů (včetně interakčních) nejsou signifikantní. To samé potvrdilo i párové srovnání jednotlivých manipulací při různých hodnotách hmotnosti vejce. Interakce mezi manipulací a hmotností vejce tak patrně bude slabá, i když ji ANOVA tabulka modelu vyhodnotila jako signifikantní. Jednotlivé odhady koeficientů tohoto modelu ve shrnující tabulce navíc vykazují hodnoty velmi blízké 0 a 1, což po aplikaci antilogitového vzorce (kvůli použití logitu jako link funkce modelu) a převedení hodnot na procentuální hodnoty ($\frac{1}{1+\exp(-\text{hodnota koeficientu})}$) není v souladu s reálně pozorovanými hodnotami poměrů pohlaví (viz tabulka 2) a mohlo se tak stát vlivem velké komplexity modelu. Bylo proto zváženo zjednodušení modelu a vytvoření nového, zahrnujícího pouze manipulaci jako vysvětlující proměnnou. Efekt manipulací na pohlaví v tomto modelu však stále zůstal nesignifikantní ($p = 0,79$). Ve 28 °C se nevylíhnul samec z žádné kategorie manipulací ani z nemanipulovaných vajec a nebyl tak zaznamenán žádný maskulinizující efekt manipulací.

	28 °C			32 °C		
	samci	samice	% samců	samci	samice	% samců
PQ injekce	0	26	0 %	8	8	50 %
Kontrolní injekce	0	18	0 %	11	6	64,7 %
PQ povrchová aplikace	0	34	0 %	5	5	50 %
Hypoxie	x	x	x	5	2	71,4 %
Nemanipulováno	0	50	0 %	10	9	52,6 %

Tabulka 2 – počty samců a samic gekončíka nočního v jednotlivých teplotách a manipulacích, procentuálně je vyjádřen podíl samců

6.2.1.5 Markery oxidativního poškození

Měření markerů oxidativního poškození u embryí injikovaných paraquatem a kontrolně injikovaných embryí v teplotách 28 °C a 32 °C ukázalo, že aplikace paraquatu neměla vliv na množství redukováného glutathionu, peroxidaci lipidů, ani konečné produkty pokročilé glykace (viz graf 9 – A až D). Signifikantně vyšší je pouze koncentrace karbonylových skupin u embryí inkubovaných ve 32 °C a injikovaných paraquatem oproti koncentraci karbonylových skupin u embryí inkubovaných ve 28 °C a injikovaných paraquatem (viz graf 9 – C).



Graf 9 – grafy A až D ukazují výsledky měření markerů oxidativního poškození embryí inkubovaných ve 28 °C a 32 °C, která byla ve vejcích injekčně ošetřených paraquatem (PQ), nebo destilovanou vodou (C)

6.2.2 Gekon *Pachydactylus tigrinus*

U gekonů *Pachydactylus tigrinus* bylo po prvotních injekčních aplikacích zjištěno, že je tento typ aplikace příliš invazivní, a proto byly finální experimenty prováděny pouze povrchovou aplikací. Počty manipulovaných vajec znázorňuje tabulka 3.

	28 °C			34 °C		
	počet vajec	vylíhnuto	mortalita	počet vajec	vylíhnuto	mortalita
PQ povrchová aplikace	33	19	42,4 %	55	25	54,5 %
Nemanipulováno*	64	42	34,4 %	44	25	43,2 %
	32 °C					
	počet vajec	vylíhnuto	mortalita			
Hypoxie	60	7	88,3 %			
Nemanipulováno*	56	43	23,2 %			

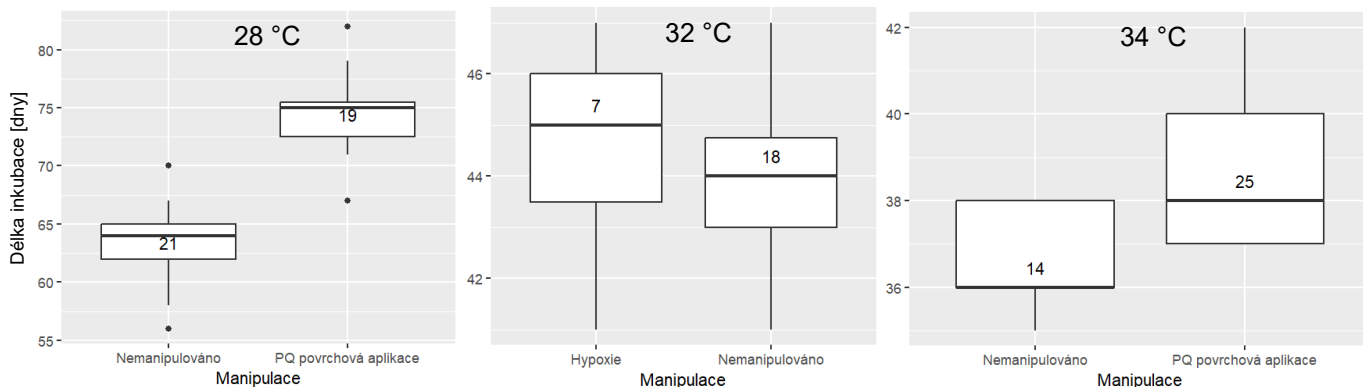
Tabulka 3 – počty manipulovaných vajec, vylíhnutých mláďat a embryonální mortalita gekona *P. tigrinus*, hvězdička (*) označuje data Strakové et al. (2024)

6.2.2.1 Vliv na mortalitu

Tabulka 3 shrnuje počty manipulovaných vajec a vylíhnutých mláďat v jednotlivých teplotách. Ačkoliv porovnání mortalit napříč různými sezónami nemusí být relevantní, jsou-li mortality experimentálních embryí ze sezóny 2023 porovnány s daty Strakové et al. (2024) pomocí GLM s binomickým rozložením, bylo zjištěno, že mortalita embryí manipulovaných v teplotách 34 °C a 28 °C se neliší od nemanipulovaných ($p = 0,26$ pro 34 °C, $p = 0,44$ pro 28 °C). Mortalita embryí ve vejcích inkubovaných ve 32 °C v hypoxické komoře je ale významně odlišná od mortality nemanipulovaných embryí ($p < 0,001$).

6.2.2.2 Vliv na délku inkubace

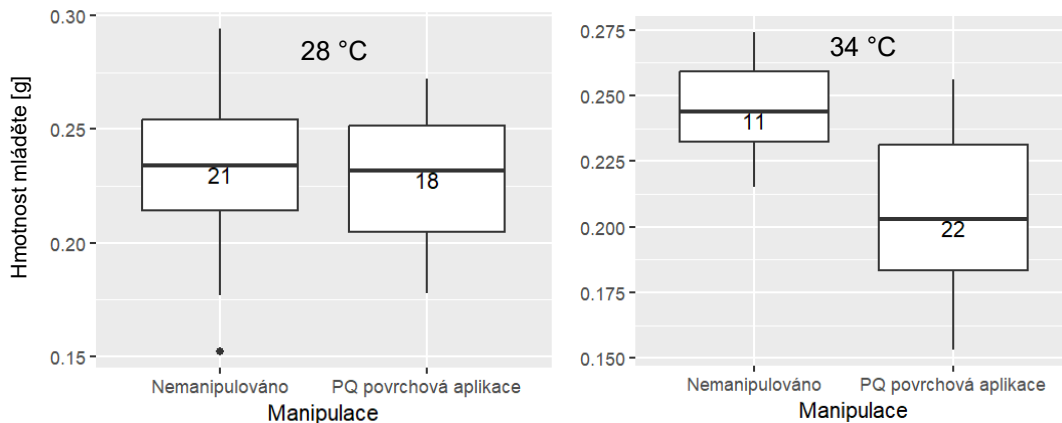
GLM s normálním rozdělením dat ukázal, že ve 34 °C trvala inkubace povrchově paraquatem ošetřených vajec delší dobu než vajec nemanipulovaných ($p < 0,001$), viz graf 10. To stejné platí pro povrchově paraquatem ošetřená vejce ve 28 °C v porovnání s nemanipulovanými vejci ve stejné teplotě ($p < 0,001$). Avšak vejce inkubovaná v hypoxických podmínkách ve 32 °C neměla signifikantně odlišnou délku inkubace ve srovnání s nemanipulovanými vejci ve 32 °C ($p = 0,30$).



Graf 10 – porovnání délek inkubace ve 28 °C (vlevo) a 32 °C (uprostřed) a 34 °C (vpravo), číslo v boxu značí počet zkoumaných mlád'at

6.2.2.3 Vliv na hmotnost mlád'at při vylíhnutí

Pomocí GLM byl testován vliv paraquatů na hmotnost mlád'at, obdobně jako v případě gekončků nočních. Mlád'ata vylíhnutá ve 34 °C z paraquatem ošetřených vajec měla signifikantně menší hmotnost než mlád'ata nemanipulovaná ($p < 0,001$), graf 11 ukazuje hmotnosti manipulovaných a nemanipulovaných mlád'at. Ve 28 °C nebyl signifikantní rozdíl mezi hmotnostmi manipulovaných a nemanipulovaných čerstvě vylíhnutých mlád'at ($p = 0,73$), což naznačuje i graf 11.



Graf 11 – hmotnosti mlád'at vylíhnutých ve 28 °C a 34 °C (vpravo), číslo v boxu značí počet zkoumaných mlád'at

6.2.2.4 Vliv na pohlaví mlád'at

Jelikož byla mortalita čerstvě vylíhnutých mlád'at velká, bylo možné určit pohlaví pouze u zlomku z nich. Jejich počty jsou zaznamenány v tabulce 4.

Ve 28 °C se z manipulovaných vajec nevylíhnul ani jeden samec, stejně jako z nemanipulovaných. Samec se nevylíhnul ani z hypoxie, ale bohužel bylo možné určit pohlaví pouze u jednoho zvířete. Ve 34 °C výsledek GLM s binomickým rozdělením ukázal,

že je rozdíl v poměrech pohlaví mláďat mezi manipulovanými a nemanipulovanými vejci nevýznamný ($p = 0,28$).

	28 °C			34 °C		
	samci	samice	% samců	samci	samice	% samců
PQ povrchová aplikace	0	11	0 %	1	7	12,5 %
Nemanipulováno*	0	40	0 %	6	13	31,6 %
	32 °C					
	samci	samice	% samců			
Hypoxie	0	1	0 %			
Nemanipulováno*	4	37	10 %			

Tabulka 4 – počty samců a samic gekona *P. tigrinus* v jednotlivých teplotách a manipulacích, procentuálně je vyjádřen podíl samců, (*) označuje data Strakové et al. (2024)

7 Diskuze

7.1 Termosenzitivní perioda

Tato práce představuje první experimentální otestování role reaktivních forem kyslíku při environmentálním určení pohlaví plazů, jak to navrhla Castelli et al. (2020). Za tímto účelem byla vejce dvou druhů gekonů manipulována pomocí paraquatu, který indukuje vznik superoxidových molekul, a vystavena hypoxickým podmínkám, které představují ekologicky relevantnější způsob manipulace. Pro efektivní načasování aplikací paraquatu však bylo nejdříve nutné zjistit, kdy začíná termosenzitivní perioda v teplotách 28 °C (oba druhy), 32 °C (gekončík noční) a 34 °C (gekon *Pachydactylus tigrinus*), které byly použity pro inkubaci. Bylo zjištěno, že oba druhy jsou při snesení vajec ve stejném vývojovém stádiu a do začátku termosenzitivní periody (stádium 32) dospějí mezi 12. a 16. dnem inkubace ve 28 °C a gekon *P. tigrinus* mezi 7. – 9. dnem ve 34 °C a gekončík noční mezi 7. – 10. dnem ve 32 °C. Rychlost vývoje obou druhů je poměrně podobná (detailnější srovnání ve 28 °C do stádia 37 grafy 1 a 2), což se zdá být nečekané vzhledem k tomu, že je gekončík noční mnohem větší a jeho vejce i mláďata mají přibližně desetkrát větší hmotnost než vejce a mláďata gekona *P. tigrinus*. Co se celkové délky inkubace nemanipulovaných zvířat týká, ta byla u menšího druhu podobná, nebo dokonce delší než u gekončíka nočního (viz srovnání grafy 4, 5 a 10). Metabolická teorie předpokládá že v dané teplotě bude (v log-log měřítku) relativní intenzita metabolismu škálovat s hmotností na $-1/4$ a ontogenetický růst s hmotností na $1/4$ (Brown et al. 2004). Tento vztah byl podpořen i empirickými daty na větším fylogenetickém měřítku (Gillooly & Dodson 2000, v potaz byla brána hmotnost mláďat při vylíhnutí vypočítaná na základě hmotnosti vejce). Pozitivní vztah hmotnosti vejce a délky vývinu byl nalezen i v práci věnované plazům, avšak s jiným škálovacím koeficientem – například gekoni škálují dle této studie s 0,152 a nikoliv 0,25 (Birchard & Marcellini 1996). Data zároveň vykazovala variabilitu a třeba u krokodýlů byla dle této studie závislost úplně jiná (škálovací koeficient -0,055 dle Birchard & Marcellini 1996). Celou situaci okolo vztahu mezi hmotností vejce a rychlostí vývinu mohou komplikovat další faktory, například hmotnost vajec při snesení nemusí být směrodatná, protože pokud mají druhy vejce s kožovitou skořápkou (jako gekončík noční), která mohou během inkubace nasávat vodu, hmotnost se tak mění a celá situace se stává složitější (Werner 1972). Data sbíraná pro tuto práci nebyla shromážděna za účelem testování vztahu rychlosti vývinu a hmotnosti vejce (data o vývoji jednotlivých stádií gekončíka nočního pochází z Wise et al. 2009), nebudu se proto touto otázkou více zabývat. Pro účely této práce však byl stanoven začátek termosenzitivní

periody u obou druhů v jednotlivých teplotách zhruba ve stejné době, ve které pak byly prováděny experimentální manipulace.

7.2 Vedlejší efekty manipulací

Co se týká samotného vlivu manipulací na embrya, nejdříve byl prozkoumán vliv na mortalitu. V tomto případě se ukázal být nejzásadnější efekt hypoxie, ve které se vylíhlo pouze 8 mlád'at gekončíka nočního z 65 inkubovaných vajec a 7 mlád'at gekona *P. tigrinus* z 60 inkubovaných vajec. Je známo, že hypoxie snižuje letální teplotu pro embrya, avšak embrya ve vejcích druhu *Sceloporus tristichus* byla schopná v 10 – 12% koncentraci kyslíku, které byla vystavena před začátkem druhé poloviny až do konce inkubační doby, přežít teploty až do rozmezí 39 – 41 °C (Smith et al. 2015). Experimentální jedinci druhu *Sceloporus tristichus* byli nachytáni ve výšce okolo 1000 m n.m. přirozeně se vyskytují až do 2750 m n.m. (Smith et al. 2015), takže je pravděpodobně jeho tolerance k hypoxii větší než u zde zkoumaných druhů. Nejspíše tak teplota 32 °C zvolená v této práci vedla k takové intenzitě metabolismu a potřebě kyslíku embryí, která při nastavené 10% koncentraci kyslíku v hypoxické komoře nemohla být pokryta, a tak většina embryí nebyla schopna zdárného dokončení vývoje. Kvůli technickým potížím zároveň docházelo ke kolísání koncentrace kyslíku v komoře (viz kapitola Efekt na pohlaví), což mohlo vytvořit pro embrya ještě více suboptimální podmínky, především z hlediska vyšší produkce ROS (Bickler & Buck 2007). V některých studiích bylo pozorováno i zpomalení vývoje a prodloužení celkové doby inkubace vajec při vystavení hypoxickým podmínkám (Andrews 2002, Adams et al. 2022), což v této práci pozorováno nebylo ani u jednoho druhu.

Poněkud překvapivé bylo pozorování zvyšující se mortality s hmotností vajec gekončků nočních kontrolně injikovaných vodou ve 32 °C. U jiných manipulací efekt hmotnosti vejce na mortalitu embryí nebyl nalezen, a to i přesto, že ho u gekonů *P. tigrinus* našla Straková et al. (2024), akorát byl opačný než u gekončíka – nižší hmotnost vajec byla asociována s větším rizikem mortality a stejný efekt našel například i Warner et al. (2010) u želvy *Chrysemys picta*. To mě zpět dostává k obecnější otázce, do jaké míry vůbec vhodné využívat hmotnost vejce po naklazení u druhů s kožovitou skořápkou, která mohou měnit hmotnost změnou obsahu vody, jako korelát pozorovaných veličin. Možná by bylo směřodatnější vejce vážit těsně před manipulací (mimo hypoxii, kam vejce byla umístěná od začátku až do konce inkubace), čímž by se eliminoval efekt variabilní vlhkosti kladišť

v teráriích samic. Ačkoliv tato varianta byla předem zvážena, nebyla uplatněna během experimentů, kvůli maximálnímu omezení času, kdy je s vejcem zacházeno během manipulace a vejce se nachází mimo inkubátor.

Z hlediska mortality je pak velmi překvapivá 7,5% mortalita embryí gekončika nočního ve vejcích, na které byl ve 28 °C povrchově aplikován paraquat, což se vymyká všem ostatním manipulacím včetně stejné manipulace u druhého experimentálního druhu. Hormetický efekt paraquatu byl ale již vícekrát pozorován u různých organismů od rostlin (Jalal et al. 2021), přes hád'átko *Caenorhabditis elegans* (Lee et al. 2010, Yang & Hekimi 2010) a hmyz (Lazarević et al. 2013, Krůček et al. 2015), až po ptáky (Losdat et al. 2018). Jelikož mají gekončík noční a gekon *P. tigrinus* jiný typ skořápky s odlišnou porozitou (viz Legendre et al. 2022), je možné, že se pouze do vajec gekončika nočního povrchovou aplikací dostal paraquat v takovém množství, aby byl jeho vliv na embrya pozitivní. Dle pozorování byl navíc tento efekt teplotně specifický. Pokud by totiž platil vztah, že zvyšující se teplota zvýší množství reaktivních forem kyslíku skrze zvýšenou respiraci (což ve skutečnosti nemusí být tak přímočaré, viz dále), je teoreticky možné, že embrya gekončika inkubovaná ve 32 °C měla vyšší koncentraci reaktivních forem kyslíku ještě před manipulací, ale to pouze spekuluji. Ačkoliv do určité míry v tomto případě může platit citát Fridricha Nietzscheho: „Co mě nezabije, to mě posílí.“, na základě tohoto pozorování bych si rozhodně netroufl poradit chovatelům gekončika nočního, aby zvyšovali přežívání embryí povrchovou aplikací paraquatu.

Efekt manipulací na délku inkubace je dle mého názoru do určité míry spekulativní. Ve 32 °C nebyl u gekončika nočního zaznamenán žádný rozdíl mezi manipulovanými a nemanipulovanými vejci a stejně ani u druhého druhu, který byl v této teplotě pouze vystaven hypoxii. Ve 28 °C byla délka inkubace nemanipulovaných i manipulovaných vajec všech kategorií obou druhů oproti 32 °C (a i 34 °C u gekona *P. tigrinus*) o poznání delší, což bylo v souladu s očekáváním. U gekončika se mezi sebou v této teplotě nelišily manipulace mezi sebou, avšak v porovnání s nemanipulovanými vejci z předchozí sezóny měla statisticky významně delší inkubační dobu vejce, do kterých byl vpraven paraquat oběma použitými způsoby. To by naznačovalo možný vliv paraquatu na prodloužení inkubační délky, avšak nebyl nalezen významný rozdíl mezi paraquatem injikovanými a kontrolně injikovanými vejci.

Vejce gekona *P. tigrinus* povrchově ošetřená paraquatem měla ve 28 °C i ve 34 °C významně delší dobu inkubace oproti nemanipulovaným vejcům z předchozí sezóny a odpovídající teploty. Připomínám, že na vejce tohoto druhu bylo povrchově aplikováno relativně více paraquatu (2,5 krát) než na vejce gekončika nočního (viz kapitola Metodika),

a tak mohl být efekt paraquatu výraznější. Zároveň měla paraquatem manipulovaná mláďata ze 34 °C při vylíhnutí významně nižší hmotnost než mláďata z nemanipulovaných vajec z 34 °C i z 28 °C. To by opět mohlo naznačovat, že se ROS akumulují v embryu více ve vyšší teplotě, a tak měla aplikace paraquatu větší efekt než v nižší teplotě. Vliv paraquatu na růstovou retardaci a vývojové poruchy byl pozorován u embryí obojživelníků (Vismara et al. 2000, Mussi & Calcaterra 2010). Ve zmíněných pracích ale byla pozorována i zvýšená mortalita paraquatem ošetřených embryí, zatímco v této práci u gekona *P. tigrinus* nebyla ani v jedné teplotě zaznamenána větší mortalita vajec povrchově ošetřených paraquatem oproti nemanipulovaným vejším z minulé sezóny, ani přítomnost vývojových vad vylíhnutých mláďat (porovnávání mortality napříč sezónami ale na rozdíl od ostatních parametrů nemusí být zcela relevantní, protože mortalitu může ovlivnit mnoho faktorů). Manipulace paraquatem ani hypoxií zároveň neovlivnily hmotnost vylíhnutých mláďat gekončíka nočního z 28 °C i 32 °C v porovnání s kontrolními injekcemi i nemanipulovanými vejci.

7.3 Efekt na pohlaví

Efekt manipulací na pohlaví mláďat byl tím hlavním, co bylo v této práci sledováno. Ani u jednoho druhu však v žádné teplotě nebyl pozorován vliv paraquatu ani hypoxie na pohlaví mláďat. Všechny vypitvané gonády nevykazovaly známky jakýchkoliv morfologických abnormalit a nelišily se od gonád zobrazených na obrázku 5. Jedinou výjimkou byla jediná samice gekončíka nočního injekčně ošetřená paraquatem ve 32 °C, která byla již po vylíhnutí velmi subtilní (pouze 1,61 g) a při pitvě byla pozorována volná tekutina v dutině břišní a levý vaječník byl edematózní, pravý vaječník bez viditelných abnormalit. U menšiny mláďat starších jednoho roku, jejichž pohlaví bylo určeno pouze vizuálně na základě vnější tělesné morfologie, nebyly pozorovány jakékoliv abnormality (viz obrázek 4). Některé samice gekona *P. tigrinus* ošetřené paraquatem dokonce již v červnu roku 2024 začaly snášet vejce, což svědčí o funkčnosti jejich gonád.

Neočekávané byly poměry pohlaví mláďat gekončíka nočního vylíhnutých ve 32 °C z manipulovaných i nemanipulovaných vajec. Podle studie Viets et al. (1993), ve které bylo popsáno ESD gekončíka nočního, by 32 °C měla být teplota produkující největší podíl samců ze všech zkoumaných teplot (87,2 % samců; počet vylíhnutých mláďat ve 32 °C n = 94). V této práci bylo v jednotlivých kategoriích zaznamenáno pouze 50 – 71,4 % samců v rámci vylíhnutých mláďat jednotlivých kategorií (viz tabulka 2). Z toho lze usoudit, že se liší norma

reakce v laboratorní populaci gekončků nočních na PřF UK využité k této práci. Pravděpodobně by mohla mít tato norma reakce „plošší“ charakter (žádná teplota nevyprodukuje více samců), případně posunutý vrchol největší produkce samců. To dle mého názoru není příliš překvapující, protože je známo, že normy reakce mohou být do určité míry plastické a mohou se lišit i mezi různými populacemi jednoho druhu (Ewert et al. 2005). Viets et al. (1993) neuvádí, odkud pochází zvířata z jejich práce. Podotýkám, že poměry pohlaví mláďat gekončika nočního z 32 °C se v mé práci signifikantně nelišily napříč manipulovanými i nemanipulovanými mláďaty.

Negativní výsledky provedených manipulací s sebou přináší úskalí spočívající v jejich interpretaci. V úvahu připadá několik možných vysvětlení pro takové pozorování:

- Vliv může mít jiná koncentrace paraquatu
- Načasování aplikací paraquatu nebylo správné
- Zvolené podmínky pro inkubaci v hypoxii nebyly vhodné
- ROS ani hypoxie nehrají klíčovou roli při environmentálním určení pohlaví

Použitá koncentrace paraquatu byla odhadnuta na základě toxikologické studie provedené na kuru domácím Dunachiem a Fletcherem (1970), kteří pro aplikaci využili injekční metodu. Je otázkou, do jaké míry lze předpokládat stejné působení injikovaného paraquatu na embrya gekonů ve srovnání s ptáky. Antioxidační kapacita embryí je do značné míry dána maternálně deponovanými antioxidačními látkami do žloutku (review Yigit et al. 2014 a Treidel et al. 2016) a jejich nedostatek může narušit zdárný vývoj (Noble et al. 1993). Vejce želv *Testudo hermanni* a *Emydura macquarii* i chameleona *Furcifer pardalis* obsahují méně karotenoidů než vejce ptáků (Speake et al. 2001, Dierenfeld et al. 2002). Antioxidanty jsou ale heterogenní skupinou molekul a karotenoidy jsou jen jedny z nich. Ptáci zároveň mají velmi rychlý embryonální vývoj a ukazuje se, že zrychlený vývoj souvisí s větší antioxidační kapacitou (Deeming & Pike 2013), což by naznačovalo, že by mohla být plazí embrya vůči oxidativnímu působení paraquatu více náchylná než embrya kura domácího využitá Dunachiem a Fletcherem (1970). V tomto případě by bylo vhodné provést přímé porovnání těchto dvou taxonů v kontrolovaných podmínkách, aby se ukázalo, zda je tento předpoklad správný.

Měření markerů oxidativního stresu ale poukázalo, že injekční aplikace paraquatu neovlivnila míru oxidativního poškození embryí gekončika nočního v porovnání s embryi z kontrolně injikovaných vajec. To ale nutně neznamená, že se paraquat do embryí vůbec nedostal. ROS mohou fungovat jako signalizační molekuly v malých koncentracích, kdy

nemusí nutně způsobit oxidativní poškození a koncentrace ROS potřebná ke spuštění signalizace například nezměnila poměr redukováného a oxidovaného glutathionu (review Schieber & Chandel 2014, Sies & Jones 2020), což byl i jeden z parametrů, který byl měřen v této práci. Co se týká měření dalších markerů oxidativního poškození, je třeba si při jejich využití uvědomovat limitace plynoucí z jejich možné nespecificity. Při měření peroxidace lipidů metodou TBARS problém spočívá v tom, že kyselina 2-thiobarbiturová může reagovat i s jinými molekulami než je zkoumaný malondialdehyd a stejně tak využitá metoda pro stanovení produktů pokročilé glykace nemusí být zcela přesná, jelikož produkty pokročilé glykace jsou heterogenní skupinou molekul a mohou vznikat i v jiném kontextu než je oxidativní stres (Perrone et al. 2020, Murphy et al. 2022). Jediný signifikantní výsledek byl pozorován po stanovení karbonylových skupin s významným rozdílem mezi embryi injekčně manipulovanými paraquatem ve 28 °C a 32 °C. Ani jedna manipulace se ale v dané teplotě nelišila od kontrolně injikovaných embryí. Spektrofotometrické stanovení karbonylových skupin reagujících s 2,4- dinitrofenylhydrazinem využitě v této práci také není úplně bezproblémové a může trpět nízkou reprodukovatelností výsledků a přítomností rušivého signálu jiných molekul (Murphy et al. 2022). Problém potenciálně nižší specificity použitých metod pro měření markerů oxidativního poškození byl kompenzován tím, že bylo použito vícero metod najednou a výsledky byly konzistentně negativní.

Negativní výsledky stanovení oxidativního poškození byly zaznamenány i v práci Losdat et al. (2018), ve které u mláďat sýkor koňder (*Parus major*) dva dny po orální aplikaci paraquatu (stejnou dobu jako v této práci) nebylo nezaznamenáno zvýšení markerů oxidativního poškození (využity ale byly jiné metody stanovení, malondialdehyd z krevní plazmy byl v této práci stanoven s využitím HPLC). I přesto byl ale na rozdíl od mé práce ve studii Losdat et al. (2018) dle interpretace autorů nalezen efekt paraquatu na sledované parametry starších sýkor. Efekt paraquatu bez detekce změn redukováného glutathionu byl nalezen i v práci Hausburg et al. (2005). Tím chci poukázat na fakt, že negativní výsledek měření markerů oxidativního poškození nemusí znamenat, že paraquat (a jím generovaný superoxid reagující s dalšími molekulami) nebude mít žádný efekt a nelze také vyloučit, že by měla měření markerů oxidativního poškození jiné výsledky, pokud by byla provedena později než dva dny po aplikaci.

Dalším možným vysvětlením negativních výsledků aplikace paraquatu a jeho efektu na pohlaví dvou druhů gekonů je špatné načasování aplikace. Teoreticky je možné, že by efekt na pohlaví byl zaznamenán, pokud by aplikace byla provedena opakovaně v průběhu

termosenzitivní periody. Standardem studií, ve kterých je podobným způsobem chemicky manipulováno s vejci plazů, je však jednorázová aplikace, a proto byla dle nejlepšího úsudku zvolena i v této práci. Vícenásobná aplikace by znamenala provést arbitrární rozhodnutí, kolikrát a s jakým intervalem jednotlivé aplikace provádět a možností je opravdu mnoho. Zároveň je počet vajec vyprodukovaný gekony za sezónu limitovaný, tudíž by v rámci tohoto diplomového projektu nebylo možné více variant vyzkoušet a raději bylo zvoleno vyzkoušení dvou typů aplikace paraquatu. Vyzkoušení vícenásobné aplikace, především té povrchové kvůli nižší invazivitě, lze doporučit v případě pokračujícího výzkumu. Teplotní signál zachycený při ESD má patrně kumulativní charakter, čemuž nasvědčuje i poměrně dlouhé trvání termosenzitivní periody, tak by vícenásobná aplikace mohla dávat smysl (Weber & Capel 2021).

Žádný vliv na pohlaví mláďat neměla ani inkubace v hypoxických podmínkách s nastavenou 10% koncentrací kyslíku a teplotou 32 °C. Technické potíže spočívající v nedokonalém těsnění hypoxické komory ale způsobily, že koncentrace kyslíku v komoře nebyla po celou dobu inkubace konstantní a krátkodobé výkyvy koncentrace kyslíku dosahovaly až k normoxii. V důsledku toho také nebyla všechna vejce vystavena identickým podmínkám (vejce byla snášena a do hypoxické komory přidávána postupně). Kolísání koncentrace kyslíku a způsobená reoxygenace tkání mohla být pro embrya více stresující než samotné hypoxické podmínky, a to především kvůli zvýšené produkci ROS (Hitka et al. 2003, Bickler & Buck 2007), což by i nahrávalo záměru otestovat vliv ROS na environmentální určení pohlaví. Rozhodně je ale na místě zopakovat tento experiment s kontrolovanými podmínkami a zaměřit se kromě teploty produkující samce i na teplotu produkující samice, případně na jinou koncentraci kyslíku, nebo provést i kontrolované fluktuační. I když nelze na základě získaných dat hypotézu vlivu hypoxie na ESD plazů vyloučit, tato práce přináší první vhled do studia hypoxie působící na vejce dvou druhů gekonů, na jejímž základu lze plánovat další experimenty.

Je také možné, že negativní výsledky získané v této práci byly pozorovány proto, že není zcela správný model předložený v práci Castelli et al. (2020), ve kterém jsou ROS, společně vápenatými ionty, považovány za klíčové signalizační molekuly zprostředkující teplotní stimul buňkám při ESD. Z hlediska ROS je základním předpokladem tohoto modelu jejich zvyšující se produkce s rostoucí teplotou skrze efekt teploty na intenzitu metabolismu (Sun et al. 2015). Vztah mezi teplotou, produkcí ROS a mírou oxidativního stresu ale nemusí být tak jednoznačný. V některých pracích vychází tento vztah poměrně jasně dle předpokladu

a s teplotou se zvyšovala produkce ROS, nebo míra oxidativního poškození (Abele et al. 1998, Abele et al. 2002). Naopak u čerstvě vylíhnutých mláďat želvy *Trachemys scripta* se při zkoumání peroxidace lipidů (jako markeru oxidativního poškození) a neenzymatické antioxidační kapacity po inkubaci v různých teplotních režimech ukázalo, že teplotní režim ovlivnil antioxidační kapacitu některých experimentálních skupin, ale v měřených markerech oxidativního poškození nebyl nalezen rozdíl (Treidel et al. 2016). V této práci nebyly použity konstantní teploty, nýbrž různé režimy teplotních fluktuací. Větší míra oxidativního poškození ve vyšší teplotě nebyla nalezena ani u dania pruhovaného (Malek et al. 2004). Nejednoznačné výsledky přineslo také studium produkce ROS u dospělých agam druhu *Ctenophorus pictus* v závislosti na vystavení různým teplotám (Ballen et al. 2012) a zcela přesvědčivé nejsou ani práce provedené na mouchách domácích (*Musca domestica*) (Sohal et al. 1985, Farmer & Sohal 1987). Ačkoliv není možné vědět, do jaké míry jsou získané výsledky výše citovaných prací zatíženy případnými metodickými chybami v prováděných měřeních (viz Murphy et al. 2022), je zcela na místě přehodnotit a pomocí velmi pečlivě zvolených metod experimentálně otestovat vztah mezi teplotou, produkcí ROS a mírou oxidativního stresu.

Pokud je tedy představa klíčové role ROS při ESD mylná, nabízí se otázka, jaké jiné molekuly se na přenosu teplotního signálu podílejí. Model Castelli et al. (2020) předpokládá, že ROS se na signalizaci teploty podílí v propojení s vápenatými ionty (viz kapitola Molekulární mechanismy ESD). Samotné vápenaté ionty, které se do buněk dostanou skrze teplotně senzitivní iontové kanály z rodiny TRP, jsou silným kandidátem, který by tuto roli mohl zastávat, o čemž svědčí i dobrá podpora experimentálními daty (Yatsu et al. 2015, Weber et al. 2020). Není zcela vyloučeno, že roli hraje i jiný, dosud nepopsaný mechanismus.

8 Závěr

V této práci byl experimentálně otestován vliv paraquatu, látky vyvolávající vznik ROS v buňkách, na ESD u dvou nepříbuzných druhů gekonů – gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*: Eublepharidae) a gekona *Pachydactylus tigrinus* (Gekkonidae). Na základě teoretického modelu navrženého v práci Castelli et al. (2020) jsou ROS považovány společně s vápenatými ionty za silné kandidáty, pomocí kterých by embryo mohlo zachycovat teplotní signál, na základě kterého poté dojde k diferenciaci gonád. I když aplikace paraquatu podle měřených markerů nezpůsobila oxidativní stres, nemuselo to znamenat, že se paraquat do embryí nedostal. Ostatně podobné výsledky měření markerů oxidativního stresu byly již zaznamenány v pracích využívajících paraquat, a i tak došlo k ovlivnění studovaných organismů. I přesto v mé práci paraquat neměl ani u jednoho ze zkoumaných druhů v obou teplotách žádný vliv na pohlaví mláďat. Tyto negativní výsledky však nelze zcela jednoznačně interpretovat a zamítnout model Castelli et al. (2020). Poukázal jsem také na důležitý fakt, že vztah mezi teplotou a produkcí ROS ve skutečnosti vůbec nemusí být tak jednoduchý, jako bývá někdy interpretován. Myslím si, že právě v tomto směru by měl pokračovat další výzkum.

Experimentálně byl také zkoumán vliv hypoxie, která může hrát důležitou roli i během inkubace plazích vajec v přírodě (Ackerman 1977, Booth & Dunstan 2018) a pohlaví plazů s ESD by mohla ovlivnit například právě skrze zvýšenou produkci ROS (Hermes-Lima & Zenteno-Savín 2002, Bickler & Buck 2007, Clanton 2007). Zvolená teplota a koncentrace kyslíku při inkubaci vajec sice vedla k vysoké mortalitě embryí obou druhů gekonů, ale jinak nebyl pozorován žádný vliv na pohlaví mláďat, stejně jako u aplikací paraquatu. Nutno podotknout, že experiment s hypoxií byl z důvodu technických potíží s hypoxickou komorou proveden pouze v jedné teplotě a podmínky inkubace nebyly zcela kontrolované, a tak by se nabízelo další důkladnější zkoumání.

I přes experimentálně získané negativní výsledky doufám, že tato práce bude sloužit jako odrazový můstek pro plánování dalšího výzkumu ESD plazů.

9 Literatura

- Abele, D., Burlando, B., Viarengo, A., & Pörtner, H. O. (1998). Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 120(2), 425-435.
- Abele, D., Heise, K., Portner, H. O., & Puntarulo, S. (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology*, 205, 1831-1841.
- Ackerman, R. A. (1977). The respiratory gas exchange of sea turtle nests (*Chelonia, Caretta*). *Respiration physiology*, 31, 19-38.
- Adams, D. M., Williamson, S. A., Evans, R. G., & Reina, R. D. (2022). Increasing hypoxia progressively slows early embryonic development in an oviparous reptile, the green turtle, *Chelonia mydas*. *Royal Society Open Science*, 9, 220709.
- Andrews, R. M. (2002). Low oxygen: A Constraint on the Evolution of Viviparity in Reptiles. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75, 145-154.
- Ballen, C., Healey, M., Wilson, M., Tobler, M., Wapstra, E., & Olsson, M. (2012). Net superoxide levels: steeper increase with activity in cooler female and hotter male lizards. *Journal of Experimental Biology*, 215, 731-735.
- Benham, C. D., Gunthorpe, M. J., & Davis, J. B. (2003). TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium*, 33(5-6), 479-487.
- Bickler, P. E., & Buck, L. T. (2007). Hypoxia Tolerance in Reptiles, Amphibians, and Fishes: Life with Variable Oxygen Availability. *Annual review of physiology*, 69, 145–170.
- Birchard, G. F., & Marcellini, D. (1996). Incubation time in reptilian eggs. *Journal of Zoology*, 240, 621-635.
- Bista, B., & Valenzuela, N. (2020). Turtle Insights into the Evolution of the Reptilian Karyotype and the Genomic Architecture of Sex Determination. *Genes*, 11, 416.
- Bókony, V., Milne, G., Pipoly, I., Székely, T., & Liker, A. (2019). Sex ratios and bimaturism differ between temperature-dependent and genetic sex-determination systems in reptiles. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 57.
- Booth, D. T., & Dunstan, A. (2018). A preliminary investigation into the early embryo death syndrome (EEDS) at the world's largest green turtle rookery. *PloS one*, 13(4), e0195462.
- Brochu, C., Cabrita, M. A., Melanson, B. D., Hamill, J. D., Lau, R., Pratt, M. C., & McKay, B. C. (2013). NF- κ B-dependent Role for Cold-inducible RNA Binding Protein in Regulating Interleukin 1 β . *PloS one*, 8(2), e57426.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., & West, G. B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85(7), 1771-1789.

- Bull, J. J. (1980). Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology*, 55(1), 3-21.
- Bull, J. J. (1987). Temperature-sensitive periods of sex determination in a lizard: similarities with turtles and crocodylians. *Journal of Experimental Zoology*, 241, 143-148.
- Castelli, M. A., Whiteley, S. L., Georges, A., & Holleley, C. E. (2020). Cellular calcium and redox regulation: the mediator of vertebrate environmental sex determination? *Biological Reviews*, 95, 680–695.
- Chan, S. H., Wu, C. A., Wu, K. L., Ho, Y. H., Chang, A. Y., & Chan, J. Y. (2009). Transcriptional Upregulation of Mitochondrial Uncoupling Protein 2 Protects Against Oxidative Stress-Associated Neurogenic Hypertension. *Circulation research*, 105, 886–896.
- Charnier, M. (1966). Action de la temperature sur la sex-ratio chez l'embryon d'Agama agama (Agamidae, Lacertilien). *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 160, 620–622.
- Cheung, C. H. Y., Chiu, J. M. Y., & Wu, R. S. S. (2014). Hypoxia turns genotypic female medaka fish into phenotypic males. *Ecotoxicology*, 23, 1260-1269.
- Clanton, T. L. (2007). Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 102, 2379-2388.
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426, 517-524.
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131, 1047-1058.
- Cree, A., Thompson, M. B., & Daugherty, C. H. (1995). Tuatara sex determination. *Nature*, 375, 543-543.
- Czerwinski M, Natarajan A, Barske L, Looger LL, Capel B. (2016). A timecourse analysis of systemic and gonadal effects of temperature on sexual development of the red-eared slider turtle *Trachemys scripta elegans*. *Developmental Biology*, 420, 166–177
- Deeming, D. C., & Pike, T. W. (2013). Embryonic growth and antioxidant provision in avian eggs. *Biology letters*, 9, 20130757.
- Deveson, I. W., Holleley, C. E., Blackburn, J., Marshall Graves, J. A., Mattick, J. S., Waters, P. D., & Georges, A. (2017). Differential intron retention in *Jumonji* chromatin modifier genes is implicated in reptile temperature-dependent sex determination. *Science advances*, 3, e1700731.
- Dierenfeld, E. S., Norkus, E. B., Carroll, K., & Ferguson, G. W. (2002). Carotenoids, Vitamin A, and Vitamin E Concentrations During Egg Development in Panther Chameleons (*Furcifer pardalis*). *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 21, 295-303.
- Dinis-Oliveira, R., Duarte, J. A., Sánchez-Navarro, A., Remião, F., Bastos, M. L., & Carvalho, F. (2008). Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Critical reviews in toxicology*, 38(1), 13-71.
- Dong, J., Xiong, L., Ding, H., Jiang, H., Zan, J., & Nie, L. (2020). Characterization of deoxyribonucleic methylation and transcript abundance of sex-related genes during tempera

- ture-dependent sex determination in *Mauremys reevesii*. *Biology of Reproduction*, 102(1), 27-37.
- Dunachie, J. F., & Fletcher, W. W. (1969). An investigation of the toxicity of insecticides to birds' eggs using the egg-injection technique. *Annals of Applied Biology*, 64, 409-423.
- Dunachie, J. F., & Fletcher, W. W. (1970). The toxicity of certain herbicides in hens' eggs assessed by the egg-injection technique. *Annals of Applied Biology*, 66, 515–520.
- D'Ignazio, L., & Rocha, S. (2016). Hypoxia Induced NF- κ B. *Cells*, 5(1), 10.
- Ellman G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82, 70–77.
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*, 186, 407–421.
- Ewert, M. A., Lang, J. W., & Nelson, C. E. (2005). Geographic variation in the pattern of temperature-dependent sex determination in the American snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Journal of Zoology*, 265, 81-95.
- Farmer, K. J., & Sohal, R. S. (1987). Effects of ambient temperature on free radical generation, antioxidant defenses and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Experimental Gerontology*, 22, 59-65.
- Ferguson, M.W.J. (1985) Reproductive biology and embryology of the crocodylians. In: *Biology of the Reptilia*. Gans, C., Billet, F., & Maderson, P.F.A, eds. John Wiley & Sons, New York, Vol. 14, 329-491.
- Gamble, T., Coryell, J., Ezaz, T., Lynch, J., Scantlebury, D. P., & Zarkower, D. (2015). Restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) reveals an extraordinary number of transitions among gecko sex-determining systems. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 1296- 1309.
- Ge, C., Ye, J., Weber, C., Sun, W., Zhang, H., Zhou, Y., Cai, C., Qian, G., & Capel, B. (2018). The histone demethylase KDM6B regulates temperature-dependent sex determination in a turtle species. *Science*, 360, 645–648.
- Ghosh, G., & Adams, J. A. (2011). Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *The FEBS journal*, 278, 587-597.
- Gillooly, J. F., & Dodson, S. I. (2000). The relationship of neonate mass and incubation temperature to embryonic development time in a range of animal taxa. *Journal of Zoology*, 251, 369-375.
- González, E. J., Martínez-López, M., Morales-Garduza, M. A., García-Morales, R., Charruau, P., & Gallardo-Cruz, J. A. (2019). The sex-determination pattern in crocodylians: A systematic review of three decades of research. *The Journal of Animal Ecology*, 88, 1417–1427.
- Griffing, A. H., Sanger, T. J., Daza, J. D., Nielsen, S. V., Pinto, B. J., Stanley, E. L., & Gamble, T. (2019). Embryonic development of a parthenogenetic vertebrate, the mourning gecko (*Lepidodactylus lugubris*). *Developmental Dynamics*, 248, 1070-1090.

- Grützner, F., Rens, W., Tsend-Ayush, E., El-Mogharbel, N., O'Brien, P. C., Jones, R. C., Ferguson-Smith, M. A., & Marshall Graves, J. A. (2004). In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature*, *432*(7019), 913–917.
- Haltenhof, T., Kotte, A., De Bortoli, F., Schiefer, S., Meinke, S., Emmerichs, A. K., Petermann, K. K., Timmermann, B., Imhof, P., Franz, A., Loll, B., Wahl, M. C., Preußner, M., & Heyd, F. (2020). A Conserved Kinase-Based Body-Temperature Sensor Globally Controls Alternative Splicing and Gene Expression. *Molecular cell*, *78*, 57–69.
- Hausburg, M. A., DeKrey, G. K., Salmen, J. J., Palic, M. R., & Gardiner, C. S. (2005). Effects of paraquat on development of preimplantation embryos in vivo and in vitro. *Reproductive toxicology*, *20*, 239-246.
- Hermes-Lima, M., & Zenteno-Savín, T. (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*, *133*, 537–556.
- Hitka, P., Vizek, M., & Wilhelm, J. (2003). Hypoxia and reoxygenation increase H₂O₂ production in rats. *Experimental lung research*, *29*, 585-592.
- Hoffman, D. J. (1990). Embryotoxicity and Teratogenicity of Environmental Contaminants to Bird Eggs. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *115*, 39-89.
- Holleley, C. E., O'Meally, D., Sarre, S. D., Marshall Graves, J. A., Ezaz, T., Matsubara, K., Azad, B., Zhang, X., & Georges, A. (2015). Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature*, *523*, 79–82.
- Iannucci, A., Altmanová, M., Ciofi, C., Ferguson-Smith, M., Milan, M., Pereira, J. C., Pether, J., Rehák, I., Rovatsos, M., Stanyon, R., Velenský, P., Ráb, P., Kratochvíl, L., & Johnson Pokorná, M. (2019). Conserved sex chromosomes and karyotype evolution in monitor lizards (Varanidae). *Heredity*, *123*, 215–227.
- Jalal, A., de Oliveira Junior, J. C., Ribeiro, J. S., Fernandes, G. C., Mariano, G. G., Trindade, V. D. R., & Dos Reis, A. R. (2021). Hormesis in plants: Physiological and biochemical responses. *Ecotoxicology and environmental safety*, *207*, 111225.
- Johnson Pokorná, M., & Kratochvíl, L. (2016). What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates? *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *91*, 1–12.
- Kappeler, P. M., Benhaiem, S., Fichtel, C., Fromhage, L., Höner, O. P., Jennions, M. D., Kaiser, S., Krüger, O., Schneider, J. M., Tuni, C., van Schaik, J., & Goymann, W. (2023). Sex roles and sex ratios in animals. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *98*, 462–480.
- Kostmann, A., Kratochvíl, L., & Rovatsos, M. (2021). Poorly differentiated XX/XY sex chromosomes are widely shared across skink radiation. *Proceedings of the Royal Society B*, *288*: 20202139.

- Krůček, T., Korandová, M., Šerý, M., Frydrychová, R. Č., & Szakosová, K. (2015). Effect of low doses of herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, *88*(4), 235-248.
- Kuroiwa, A., Ishiguchi, Y., Yamada, F., Shintaro, A., & Matsuda, Y. (2010). The process of a Y-loss event in an XO/XO mammal, the Ryukyu spiny rat. *Chromosoma*, *119*, 519-526.
- Lazarević, J., Đorđević, M., Stojković, B., & Tucić, N. (2013). Resistance to prooxidant agent paraquat in the short-and long-lived lines of the seed beetle (*Acanthoscelides obtectus*). *Biogerontology*, *14*, 141-152.
- Lee, S. J., Hwang, A. B., & Kenyon, C. (2010). Inhibition of Eespiration Extends *C. elegans* Life Span via Eeactive Oxygen Species That Increase HIF-1 Activity. *Current Biology*, *20*, 2131-2136.
- Legendre, L. J., Choi, S., & Clarke, J. A. (2022). The diverse terminology of reptile eggshell microstructure and its effect on phylogenetic comparative analyses. *Journal of Anatomy*, *241*(3), 641-666
- Lin, J. Q., Zhou, Q., Yang, H. Q., Fang, L. M., Tang, K. Y., Sun, L., Wan, Q. H., & Fang, S. G. (2018). Molecular mechanism of temperature-dependent sex determination and differentiation in Chinese alligator revealed by developmental transcriptome profiling. *Science Bulletin*, *63*, 209–212.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., & Flohé, L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS letters*, *42*(1), 68-72.
- Losdat, S., Blount, J. D., Marri, V., Maronde, L., Richner, H., & Helfenstein, F. (2018). Effects of an early-life paraquat exposure on adult resistance to oxidative stress, plumage colour and sperm performance in a wild bird. *Journal of Animal Ecology*, *87*, 1137-1148.
- Malek, R. L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M. A., & Gerhard, G. S. (2004). The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, *138*, 363-373.
- Marcó, M. V. P., Piña, C. I., Somoza, G. M., Jahn, G. A., Pietrobon, E. O., & Iungman, J. L. (2015). Corticosterone plasma levels of embryo and hatchling broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*) incubated at different temperatures. *South American Journal of Herpetology*, *10*, 50-57.
- Marques, V., Riaño, G., Carretero, M. A., Silva-Rocha, I., & Rato, C. (2023). Sex determination and optimal development in the Moorish gecko, *Tarentola mauritanica*. *Acta Zoologica*, *104*, 419-433.
- Mazzoleni, S., Němec, P., Albrecht, T., Lymberakis, P., Kratochvíl, L., & Rovatsos, M. (2021). Long-term stability of sex chromosome gene content allows accurate qPCR-based molecular sexing across birds. *Molecular Ecology Resources*, *21*, 2013–2021.
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V., & Marcos, J. C. (2014). Simplified 2, 4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical biochemistry*, *458*, 69-71.

- Mrosovsky, N., & Pieau, C. (1991). Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia*, *12*, 169–179.
- Mukai, K., Hara, S., Sakima, K., Nozu, R., Yazawa, T., & Kitano, T. (2022). Oxidative Stress Causes Masculinization of Genetically Female Medaka Without Elevating Cortisol. *Frontiers in endocrinology*, *13*, 878286.
- Mulugeta, E., Wassenaar, E., Sleddens-Linkels, E., van IJcken, W.F.J., Heard, E., Grootegoed, J. A., Just, W., Gribnau, J., & Baarends, W. M. (2016). Genomes of *Ellobius* species provide insight into the evolutionary dynamics of mammalian sex chromosomes. *Genome research*, *26*(9), 1202–1210.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical journal*, *417*, 1-13.
- Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N. G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., Van Remmen, H., Schumacker, P. T., Thornalley P. J., Toyokuni S., Winterbourn C. C., Huiyong Y., Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature metabolism*, *4*, 651–662.
- Mussi, M. A., & Calcaterra, N. B. (2010). Paraquat-induced oxidative stress response during amphibian early embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *151*, 240-247.
- Nettmann, S. R. W. B. H., & Rykena, S. (1985). Verhaltens und fortpflanzungsbiologische Notizen über kanarische und nordafrikanische Tarentola-Arten. *Bonner Zoologische Beiträge: Herausgeber: Zoologisches Forschungsinstitut Und Museum Alexander Koenig, Bonn.*, *36*, 287–305.
- Noble, D. W. A., Stenhouse, V., & Schwanz, L. E. (2018). Developmental temperatures and phenotypic plasticity in reptiles: a systematic review and meta-analysis. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *93*, 72–97.
- Noble, R. C., McCartney, R., & Ferguson, M. W. J. (1993). Lipid and fatty acid compositional differences between eggs of wild and captive-breeding alligators (*Alligator mississippiensis*): an association with reduced hatchability? *Journal of Zoology*, *23*, 639-649.
- Ogawa, N., Kurokawa, T., Fujiwara, K., Polat, O. K., Badr, H., Takahashi, N., & Mori, Y. (2016a). Functional and structural divergence in human TRPV1 channel subunits by oxidative cysteine modification. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(8), 4197-4210.
- Ogawa, N., Kurokawa, T., & Mori, Y. (2016b). Sensing of redox status by TRP channels. *Cell Calcium*, *60*, 115-122.
- Pallotta, M. M., Fogliano, C., & Carotenuto, R. (2022). Temperature Incubation Influences Gonadal Gene Expression during Leopard Gecko Development. *Animals*, *12*, 3186.

- Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2010). Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS chemical biology*, 5(1), 47-62.
- Pekár, S., & Brabec, M. (2020). *Moderní analýza biologických dat: 1. díl. Zobecněné lineární modely v prostředí R., 2., přepracované vydání*, Masarykova univerzita.
- Perrone, A., Giovino, A., Benny, J., & Martinelli, F. (2020). Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3818196.
- Peš, T., Straková, B., & Kratochvíl, L. (2024). Environmental (and Random?) Sex Determination in Endangered and Invasive *Phelsuma* Geckos. *Sexual development*, 1–6. Advance online publication.
- Quinn, A. E., Georges, A., Sarre, S. D., Guarino, F., Ezaz, T., & Graves, J. A. M. (2007). Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science*, 316, 411- 411.
- Radder, R. S., Quinn, A. E., Georges, A., Sarre, S. D., & Shine, R. (2008). Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. *Biology Letters*, 4, 176-178.
- Rens, W., O'Brien, P. C., Grützner, F., Clarke, O., Graphodatskaya, D., Tsend-Ayush, E., Trifonov, V. A., Skelton, H., Wallis, M. C., Johnston, S., Veyrunes, F., Graves, J. A., & Ferguson-Smith, M. A. (2007). The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian *Z*. *Genome biology*, 8(11), R243.
- Radhakrishnan, S., Litterman, R., Neuwald, J., Severin, A., & Valenzuela, N. (2017). Transcriptomic responses to environmental temperature by turtles with temperature-dependent and genotypic sex determination assessed by RNAseq inform the genetic architecture of embryonic gonadal development. *PLoS One*, 12(3), e0172044.
- Rovatsos, M., Vukić, J., Altmanová, M., Johnson Pokorná, M., Moravec, J., & Kratochvíl, L. (2016). Conservation of sex chromosomes in lacertid lizards. *Molecular Ecology*, 25, 3120–3126.
- Ruggeri, R. M., Vicchio, T. M., Cristani, M., Certo, R., Caccamo, D., Alibrandi, A., Giovinazzo, S., Saija, A., Campenni, A., Trimarchi, F., & Gangemi, S. (2016). Oxidative Stress and Advanced Glycation End Products in Hashimoto's Thyroiditis. *Thyroid*, 26(4), 504–511.
- Sarre, S. D., Georges, A., & Quinn, A. (2004). The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Bioessays*, 26, 639-645.
- Saunders, P. A., & Veyrunes, F. (2021). Unusual Mammalian Sex Determination Systems: A Cabinet of Curiosities. *Genes*, 12, 1770.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current biology*, 24, R453-R462.
- Schroeder, A. L., Metzger, K. J., Miller, A., & Rhen, T. (2016). A Novel Candidate Gene for Temperature-Dependent Sex Determination in the Common Snapping Turtle. *Genetics*, 203, 557-571.

- Sekido, R., & Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, *453*(7197), 930-934.
- Shang, E. H., Yu, R. M., & Wu, R. S. (2006). Hypoxia Affects Sex Differentiation and Development, Leading to a Male-Dominated Population in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental science & technology*, *40*, 3118-3122.
- Shine, R., Elphick, M. J., & Donnellan, S. (2002). Co-occurrence of multiple, supposedly incompatible modes of sex determination in a lizard population. *Ecology Letters*, *5*, 486-489.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, *86*, 715-748.
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*, *21*, 363-383.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R., & Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, *346*(6281), 240-244.
- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Ohnesorg, T., Cummins, D. M., Farlie, P. G., Doran, T. J., & Sinclair, A. H. (2009). The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, *461*(7261), 267-271.
- Smith, C., Telemeco, R. S., Angilletta, M. J., Jr, & VandenBrooks, J. M. (2015). Oxygen supply limits the heat tolerance of lizard embryos. *Biology letters*, *11*, 20150113.
- Smith, J. G. (1988). Paraquat poisoning by skin absorption: a review. *Human toxicology*, *7*, 15-19.
- Sohal, R. S., Müller, A., Koletzko, B., & Sies, H. (1985). Effect of age and ambient temperature on n-pentane production in adult housefly, *Musca domestica*. *Mechanisms of Ageing and Development*, *29*, 317-326.
- Speake, B. K., Surai, P. F., & Gore, M. (2001). Lipid Composition, Fatty Acid Profiles, and Lipid-Soluble Antioxidants of Eggs of the Hermann's tortoise (*Testudo hermanni boettgeri*). *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, *20*, 75-87.
- Standora, E. A., & Spotila, J. R. (1985). Temperature Dependent Sex Determination in Sea Turtles. *Copeia*, *1985*, 711-722.
- Straková, B., Kubička, L., Červenka, J., & Kratochvíl, L. (2024). Pivotal temperature is not for everyone: Evidence for temperature-dependent sex determination in three gecko species. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 1-9
- Sun, B. J., Li, T., Gao, J., Ma, L., & Du, W. G. (2015). High incubation temperatures enhance mitochondrial energy metabolism in reptile embryos. *Scientific Reports*, *5*, 8861.

- Sun, W., Liao, Y., Yi, Q., Wu, S., Tang, L., & Tong, L. (2018). The Mechanism of CIRP in Regulation of STAT 3 Phosphorylation and Bag-1/S Expression Upon UVB Radiation. *Photochemistry and photobiology*, 94, 1234-1239.
- Terao, M., Ogawa, Y., Takada, S., Kajitani, R., Okuno, M., Mochimaru, Y., Matsuoka, K., Itoh, T., Toyoda, A., Kono, T., Jogahara, T., Mizushima, S., & Kuroiwa, A. (2022). Turnover of mammal sex chromosomes in the *Sry*-deficient Amami spiny rat is due to male-specific upregulation of *Sox9*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(49), e2211574119.
- Tezak, B., Straková, B., Fullard, D. J., Dupont, S., McKey, J., Weber, C., & Capel, B. (2023). Higher temperatures directly increase germ cell number, promoting feminization of red-eared slider turtles. *Current Biology*, 33(14), 3017-3023.
- Thépot D. (2021). Sex Chromosomes and Master Sex-Determining Genes in Turtles and Other Reptiles. *Genes*, 12(11), 1822.
- Toyota, K., Akashi, H., Ishikawa, M., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Sato, T., Lange, A., Tyler, C. R., Iguchi, T., & Miyagawa, S. (2023). Comparative analysis of gonadal transcriptomes between turtle and alligator identifies common molecular cues activated during the temperature-sensitive period for sex determination. *Gene*, 888, 147763.
- Treidel, L. A., Carter, A. W., & Bowden, R. M. (2016). Temperature experienced during incubation affects antioxidant capacity but not oxidative damage in hatchling red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *Journal of Experimental Biology*, 219, 561–570.
- Uetz, P., Freed, P., Aguilar, R., Reyes, F., Kudera, J. & Hošek, J. (eds.) (2023) The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, accessed [date: 16.4.2024]
- Valenzuela, N., & Lance, V. (Eds.). (2004). Temperature-dependent sex determination in vertebrates (1-194). *Smithsonian Books*, Washington
- Valleley, E. M., Cartwright, E. J., Croft, N. J., Markham, A. F., & Coletta, P. L. (2001). Characterisation and Expression of *Sox9* in the Leopard Gecko, *Eublepharis macularius*. *Journal of Experimental Zoology*, 291, 85–91.
- van Mierlo, G., Veenstra, G. J. C., Vermeulen, M., & Marks, H. (2019). The complexity of PRC2 subcomplexes. *Trends in cell biology*, 29, 660-671.
- Viets, B. E., Ewert, M. A., Talent, L. G., & Nelson, C. E. (1994). Sex-determining mechanisms in squamate reptiles. *Journal of Experimental Zoology*, 270, 45–56.
- Viets, B. E., 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.
- Vismara, C., Battista, V., Vailati, G., & Bacchetta, R. (2000). Paraquat induced embryotoxicity on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology*, 49, 171-179.
- Walker J. M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in molecular biology*, 32, 5–8.

- Warner, D. A., Jorgensen, C. F., & Janzen, F. J. (2010). Maternal and abiotic effects on egg mortality and hatchling size of turtles: temporal variation in selection over seven years. *Functional Ecology*, *24*, 857-866.
- Warner, D. A., Radder, R. S., & Shine, R. (2009). Corticosterone exposure during embryonic development affects offspring growth and sex ratios in opposing directions in two lizard species with environmental sex determination. *Physiological and biochemical zoology*, *82*, 363–371.
- Weber C, Zhou Y, Lee JG, Looger LL, Qian G, Ge C, Capel B. (2020). Temperature-dependent sex determination is mediated by pSTAT3 repression of *Kdm6b*. *Science*, *368*, 303–306.
- Weber, C., & Capel, B. (2021). Sex determination without sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, *376*, 20200109.
- Wedekind, C. (2002). Manipulating sex ratios for conservation: short-term risks and long-term benefits. *Animal Conservation*, *5*(1), 13-20.
- Werner, Y. L. (1972). Observations on Eggs of Eublepharid Lizards, with Comments on the Evolution of the Gekkonoidea. *Zoologische Mededelingen*, *47*(17), 211-224.
- Whiteley, S. L., Holleley, C. E., Wagner, S., Blackburn, J., Deveson, I. W., Marshall Graves, J. A., & Georges, A. (2021). Two transcriptionally distinct pathways drive female development in a reptile with both genetic and temperature dependent sex determination. *PLoS Genetics*, *17*(4), e1009465.
- Whiteley, S. L., Wagner, S., Holleley, C. E., Deveson, I. W., Marshall Graves, J. A., & Georges, A. (2022). Truncated *jarid2* and *kdm6b* transcripts are associated with temperature-induced sex reversal during development in a dragon lizard. *Science Advances*, *8*, eabk0275.
- Wise, P. A., Vickaryous, M. K., & Russell, A. P. (2009). An embryonic staging table for in ovo development of *Eublepharis macularius*, the leopard gecko. *The Anatomical Record*, *292*, 1198-1212.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, *16*, 97-159.
- Yang, W., & Hekimi, S. (2010). A Mitochondrial Superoxide Signal Triggers Increased Longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS biology*, *8*(12), e1000556.
- Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Parrott, B. B., Yamaguchi, K., Ogino, Y., Miyakawa, H., Lowers, R. H., Shigenobu, S., Guillette, L. J., & Iguchi, T. (2016). RNA-seq analysis of the gonadal transcriptome during *Alligator mississippiensis* temperature-dependent sex determination and differentiation. *BMC Genomics*, *17*, 77.
- Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Saito, S., Lowers, R. H., Ogino, Y., Fukuta, N., Katsu, Y., Ohta, Y., Tominaga, M., Guillette Jr, L. J., & Iguchi, T. (2015). TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator. *Scientific Reports*, *5*, 18581.
- Ye, Y.-Z., Ma, L., Sun, B.-J., Li, T., Wang, Y., Shine, R., & Du, W.-G. (2019). The Embryos of Turtles Can Influence Their Own Sexual Destinies. *Current Biology*, *29*, 2597–2603.

- Yigit, A. A., Panda, A. K., & Cherian, G. (2014). The avian embryo and its antioxidant defence system. *World's poultry science journal*, 70, 563-574.
- Yntema, C. L. (1968). A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *Journal of morphology*, 125, 219-251.
- Yuan, J., Wang, Y., Liu, F., Li, W., Hong, X., Chen, C., Yu, L., Ni, W., Wei, C., Liu, X., & Zhu, X. (2021). Comparative transcriptomic analysis reveals the gonadal development-related gene response to environmental temperature in *Mauremys mutica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 40, 100925.
- Zhong, P., & Huang, H. (2017). Recent progress in the research of cold-inducible RNA-binding protein. *Future science OA*, 3(4), FSO246.

10 Přílohy

10.1 Protokol na měření markerů oxidativního poškození

Materiál:

Reagencie

Fosfátový pufr, PBS: 137mM NaCl (Penta), 2,7mM KCl (Penta), 10mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O (*), 1,8mM KH₂PO₄ (*), pH 7,4,

inhibitor proteáz cOmplete a inhibitor fosfatáz PhosSTOP (obojí Roche): pracovní roztoky (1 tableta rozpuštěna v 1 ml H₂O)

hovězí sérový albumin, BSA (*): zásobní roztok o koncentraci 1 µg/ µl

reagent A: 8mM Na₂CO₃ (*), 0,8mM C₄H₄Na₂O₆ (Penta), pH 11,25

reagent B: 1,2mM (HO₂CC₉H₅N)₂ (*)

reagent C: 0,03mM CuSO₄ x 5H₂O (Lach-Ner)

redukovaný glutathion, GSH (*): zásobní roztok o koncentraci 1 mM

trichloroctová kyselina, TCA (*): 10% (w/v) pracovní roztok

hydrogenfosforečnan sodný (*): pracovní roztok o koncentraci 0,5 M a pH 8,4

citrát sodný (*): 1% (w/v) pracovní roztok

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, DTNB (*): pracovní roztok o koncentraci 1 mM (připraven do 1% citrátu sodného)

Dimethylsulfoxid, DMSO (*)

2-Thiobarbiturová kyselina, TBA (*): 0,67% (w/v) pracovní roztok (67 mg TBA v 1 ml DMSO + 9 ml H₂O)

Ethanol (Penta)

Malondialdehyd (1,1,3,3-Tetramethoxypropan), MDA (*): zásobní roztok o koncentraci 500µM (4,167 µl MDA + 1 ml ethanol + 49 ml H₂O)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner): pracovní roztok o koncentraci 2,5 M

2,4-dinitrofenylhydrazin, DNPH (*): pracovní roztok o koncentraci 10 mM (8 mg DNPH + 40 µl DMSO + 3,96 ml 2,5M HCl)

Hydroxid sodný (Penta): pracovní roztok o koncentraci 6 M

Kapalný dusík (Linde)

V závorkách uveden výrobce, hvězdička (*) značí zakoupení u Sigma-Aldrich

Přístrojové a programové vybavení

Analytické váhy (Scaltec SBA 33, Sartorius), Potter-Elvehjemův sklo-teflonový homogenizátor (Eurostar power b, IKA labortechnik), stolní centrifuga na mikrozkušavky (MIKRO 200R, Hettich), vortex (Velp scientifica), topný blok (Dri-Block®, TECHNE), multifunkční čtečka 96-jamkových destiček (Synergy HT, Biotek), program GEN 5, program GraphPad Prism

Vzorky

Vejce gekončků nočních (*Eublepharis macularius*) z teplot 28 °C a 32 °C byla chemicky manipulována injekcí paraquat (a kontrolní injekcí destilovanou vodou) v době začátku termosenzitivní periody (tedy 12. – 14. den po naklazení, respektive 7. – 10. ve 32 °C). Dva dny po manipulaci byla embrya vyjmuta z vajec, přendána do 2ml zkumavky typu Eppendorf a metodou snap-freezing rychle zamražena ponořením zkumavky s embryem do tekutého dusíku. Zamražená embrya byla skladována před měřením v -80 °C.

Pracovní postup:

Příprava vzorků tkáňového homogenátu

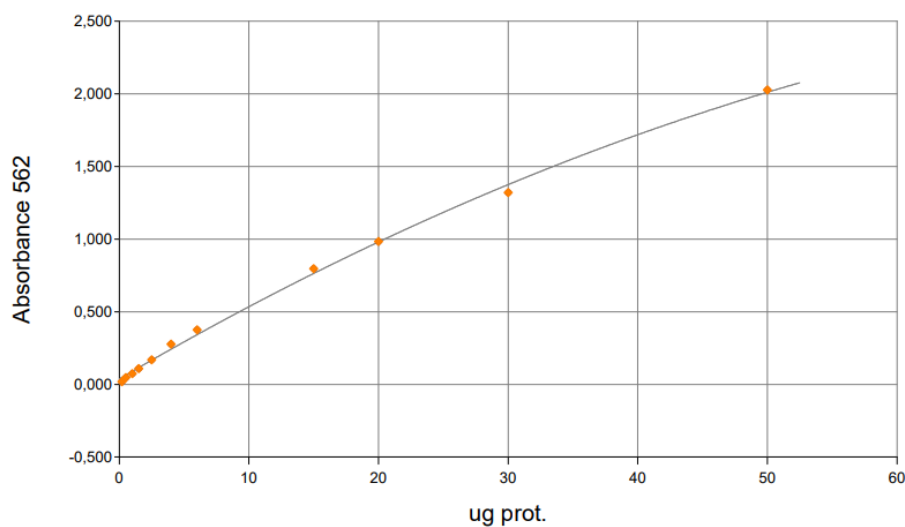
Gekoní embrya byla přesně zvážena a byl z nich pomocí sklo-teflonového homogenizátoru (1200 otáček/min, 2 min, 4 °C) připraven 20% homogenát (w/v) v PBS pufru s přídavkem 2% inhibitoru proteáz cOmplete a 10% inhibitoru fosfatáz PhosSTOP. Takto připravené vzorky byly 2 minuty centrifugovány (2100 otáček/min, 10 minut, 4 °C) a vzniklý postnukleární supernatant byl odebrán a uchován při -80°C pro následné analýzy.

Stanovení celkové koncentrace proteinů

Celková koncentrace proteinů byla stanovena BCA metodou (dle Walker 1994). V 96-jamkové destičce byla dle níže uvedené tabulky 12 připravena kalibrační řada standardu hovězího sérového albuminu (BSA). Do destičky byly dále pipetovány v triplicátech 100x ředěné vzorky tkáňového homogenátu vždy po 100 µl. Do všech jamek bylo následně pipetováno 100 µl směsi reagentu A, B a C v poměru 26:25:1. Celá destička byla překryta folií a byla inkubována v topném bloku 30 minut při 60°C. Pomocí spektrofotometru Synergy HT a programu GEN 5 byla následně při vlnové délce 562 nm změřena absorbance a spočítána celková koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

Jamka č.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Množství BSA [µg]	0	0,2	0,5	1,0	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
Pipetovaný objem [µl] BSA (0,1 µg/µl)	0	2	5	10	15	25	40	60	100	0	0	0	0
Pipetovaný objem [µl] BSA (1 µg/µl)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	20	30	50
Pipetovaný objem H₂O [µl]	100	98	95	90	85	75	60	40	0	85	80	70	50

Tabulka 5 – kalibrační řada standardu hovězího sérového albuminu (BSA) pro stanovení celkové koncentrace proteinů metodou BCA



Curve Fitting Results

Curve Name	Curve Formula	A	B	R2
Curve	$Y=C \cdot X^2+B \cdot X+A$	0,0378	0,0522	0,998

Graf 12 – závislost absorbance na celkové koncentraci proteinů, graf včetně regresních koeficientů byl vygenerován v programu GEN 5

Stanovení redukovaného glutathionu

Stanovení redukovaného glutathionu probíhalo dle Ellman (1959). Z gekoních tkáňových homogenátů byly připraveny vzorky o celkové koncentraci proteinů 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a celkovém objemu 200 μl . Dále byly ze zásobního roztoku standardu redukovaného glutathionu (GSH) připraveno vždy 200 μl kalibračních roztoků o koncentraci 3,125 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM a 200 μM . Ke vzorkům standardů a homogenátů bylo přidáno vždy 200 μl 10% trichloroctové kyseliny, vzorky byly promíchány, inkubovány 5 minut na ledu a zcentrifugovány (10000 otáček/min, 10 minut, 4 °C). Na 96-jamkovou destičku poté bylo v triplicátu pipetováno 100 μl kalibračních roztoků a vzorků homogenátu. Poté bylo do všech jamek pipetováno 100 μl 0,5M hydrogenfosforečnanu sodného a 20 μl 1mM kyseliny 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoové. Po desetiminutové inkubaci při laboratorní teplotě byla ve vzorcích standardů a homogenátů změřena absorbance při vlnové délce 412 nm a následně spočítána koncentrace redukovaného glutathionu a vztažena na množství proteinů ve vzorcích.

Stanovení malondialdehydu

Stanovení malondialdehydu (markeru peroxidace lipidů) probíhalo metodou TBARS (Esterbauer & Cheeseman 1990). Z tkáňových homogenátů byly připraveny vzorky o celkové koncentraci proteinů 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a celkovém objemu 100 μl . Dále byly ze zásobního roztoku standardu malondialdehydu (MDA) připraveny kalibrační roztoky o koncentraci 0,078 μM , 0,156 μM , 0,313 μM , 0,625 μM , 1,25 μM , 2,5 μM a 5 μM o objemu 100 μl . Ke vzorkům standardů a homogenátů bylo přidáno vždy 200 μl 10% trichloroctové kyseliny a 300 μl 0,67% thiobarbiturové kyseliny, vzorky byly promíchány a inkubovány v topném bloku 30 minut při 100 °C. Poté byly vzorky zchlazeny na ledu a zcentrifugovány (10000 otáček/min, 10 minut, 4 °C). Na 96-jamkovou destičku vhodnou pro měření fluorescence poté bylo v triplicátu pipetováno 100 μl supernatantu kalibračních roztoků a vzorků homogenátu. Excitace probíhala při vlnové délce 540 nm a emise při vlnové délce 590 nm.

Stanovení karbonylových skupin

Stanovení karbonylových skupin (markeru karbonylace proteinů) pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu bylo provedeno dle Mesquita et al. (2014). Ke vzorkům tkáňových homogenátů o celkové koncentraci proteinů 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a objemu 200 μl bylo přidáno 200 μl 10mM 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) a vzorky byly v temnu při laboratorní teplotě inkubovány 10 minut. Po přidavku 100 μl 6M NaOH byly vzorky promíchány a opět inkubovány za stejných podmínek. Po promíchání bylo vždy v triplicátu na 96-jamkovou

destičku pipetováno 100 μl vzorku a při vlnové délce 450 nm byla změřena absorbance. Koncentrace karbonylových skupin byla z naměřené absorbance A vypočtena z Lambert-Beerova zákona dle níže uvedené rovnice s použitím molárního absorpčního koeficientu DNPH ε_{450} 22,308 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a délce absorpční vrstvy 1 0,2 cm.

$$A = \varepsilon lc$$

Sledování konečných produktů pokročilé glykace

Stanovení konečných produktů pokročilé glykace probíhalo dle Ruggeri et al. (2016). Vzorky tkáňových homogenátů byly PBS pufrem naředěny na koncentraci 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a celkový objem 320 μl . Poté byly v triplikátu pipetovány vždy po 100 μl do 96-jamkové destičky vhodné pro fluorescenční měření. Excitace probíhala při vlnové délce 360 nm a emise při vlnové délce 460 nm.