



1. Adult male (right) and adult female Komodo dragon, *Varanus komodoensis*. Sexual differences in body proportions are clearly visible.

Dospělý samec (vpravo) a samice varana komodského, *Varanus komodoensis*. Pohlavní rozdíly v tělesných proporcích jsou dobře patrné.

Foto/Photo by Petr Velenský

Sexing of Komodo Dragons, *Varanus komodoensis*

Určování pohlaví varanů komodských, *Varanus komodoensis*

MICHAIL ROVATSOS¹, MARTINA JOHNSON POKORNÁ¹, MARIE ALTMANOVÁ¹, LUKÁŠ KRATOCHVÍL¹, PETR VELENSKÝ², ROMAN VODIČKA², IVAN REHÁK²

¹ Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 00 Praha 2, Czech Republic

¹ Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 7, 128 00 Praha 2

² Prague Zoological Garden, U Trojského zámku 120/3, 171 00 Praha 7 – Troja, Czech Republic

² Zoologická zahrada hl. m. Prahy, U Trojského zámku 120/3, 171 00 Praha 7 – Troja

Introduction

From our experience, the common methodology for identifying sex used in many species of squamate reptiles, i.e. cloacal probing for the presence or absence of inverted hemipenes, is a problem in Komodo dragons (as pointed out already by Auffenberg, 1981). One reason is that quite often the presence of strong cloacal opening sphincters prevents proper probe insertion. Also, females have hemiclitoreal sacs at approximately the same position as the male hemipenes, and therefore sex can be easily misclassified. The associated handling which requires the longer immobilization of an individual can also be problematic when dealing with larger lizards.

The other sexing method, the hemipenal eversion by palpation, is not reliable and not easily applicable for adults (Halverson et Spelman, 2002). Although this method has been used successfully for hatchlings and juveniles of many squamate reptiles, especially in many snake species, it was not applied for the juvenile Komodo dragons bred in Prague Zoo so as to avoid any physical harm to the lizard young. Similarly as Auffenberg (1981), we rejected an alternative method to evert hemipenes by caudal injection of sterile water as impractical and potentially harmful.

Auffenberg (1981) noted that in males of all sizes there are two small rosettes of scales located in the second to third scale rows anterior to the vent, each on either side of the midline. Halverson et Spelman (2002) drew attention to the fact that these rosettes are not present in all males. Sulandari et al. (2014) mentioned these differences between the sexes in the arrangement of a specific part of the precloacal scales as well, but pointed out that the scale pattern is not always clearly identifiable.

Several other methods can be used to determine sex in Komodo dragons (Halverson et Spelman, 2002; Sulandari et al., 2014). A direct but invasive method is the inspection of the gonads by means of an endoscope. Radiography of the cloacal region can be used to visualize the presence of the bones associated with the hemipenes in males. Other techniques are based on the detection of high levels of circulating testosterone in the blood plasma of males. The other option is the assessment of the presence of ovarian follicles or even testes by ultrasound. Although relatively accurate, these techniques do not give consistent results in young animals, and their employment is sometimes hampered by the requirement of specialized equipment.

According to Auffenberg (1981), none of the usual reptilian secondary sex characteristics is developed in Komodo dragons, and it is impossible to sex these animals from any distance. Also Sulandari et al. (2014) mentioned that Komodo dragons have no obvious morphological differences between sexes (although males tend to grow bulkier and bigger than females). However, in contrast to these published claims, we use differences in external morphology, as well as in colouration and ethological



2. Juveniles of Komodo dragon, *Varanus komodoensis*, aged two months. External sexual differences are not developed. Dvoutměsíční mláďata varana komodského, *Varanus komodoensis*. Vnější pohlavní rozdíly nejsou vyvinuty.

Foto/Photo by Petr Velenský

characters, for sexing of Komodo dragons, as well as other monitor lizards, in Prague Zoo as a standard sexing method for years (cf. Rehák et Velenský, 1997; Velensky et al., 2011). Prague Zoo has recently become an important breeder of Komodo dragons and now serves as a source of specimens of this species for emerging breeding centres in other zoos, particularly for partners in the Komodo dragon European Endangered Species Programme (EEP) supported by the European Association of Zoos and Aquaria (EAZA). The main advantages of sexing by phenotypic traits are its non-invasiveness, particularly as there is no need to handle the animals, and also low cost as there are no requirements for specialised equipment. However, at the same time, it can be criticised as subjective and needs further evaluation.

It is therefore important to have an accurate, relatively easy and non-expensive technique available for sexing the Komodo dragon, which is also applicable for hatchlings and juveniles. With regard to the fact that similar to other varanids (e.g. Pokorná et Kratochvíl, 2009), the Komodo dragons have genotypic sex determination, molecular sexing could be a good option. Fortunately, a DNA marker for sex determination is available for Komodo dragons (Halverson et Spelman, 2002). Recently, Sulandari et al. (2014) optimized the protocol by Halverson et Spelman (2002) and successfully determined the sexes of the Komodo dragons kept in three Indonesian zoos. In our study, we used the same methodology to molecularly determine the sexes of 17 Komodo dragons kept in Prague Zoo, with the goals being to provide another test for the molecular sex determination methodology in Komodo dragons, and to verify the concordance of our previous assessment based on morphology and ethology with molecular sexing and/or with sexing based on medical equipment, post-mortem inspection of gonads and cytogenetic analysis. Moreover, we tested a molecular sexing from alternative, less invasive or non-invasive, sampling - buccal swabs, cloacal swabs, nails and skin tissue (cf. Lanzi et al., 2012).



3. Male of Komodo dragon, *Varanus komodoensis*, aged one year. At this age sexual differences begin to be noticeable - large dark head and broad shoulders indicate a male.

Roční samec varana komodského *Varanus komodoensis*. U ročních mláďat začínají být pohlavní rozdíly patrné - široká tmavá hlava a rozložitá ramena značí samce.

Foto/Photo by Petr Velenský



4. Female of Komodo dragon, *Varanus komodoensis*, aged one year (sister to the previous male). Narrower head and a curious glance indicate a female.

Roční samice (sestra předchozího samce) varana komodského *Varanus komodoensis*. Užší hlava a zvědavý pohled napovídají, že jde o samici.

Foto/Photo by Petr Velenský

Morphological, colouration and ethological traits used for sexing in Prague Zoo

The most significant morphological differences between males and females are the following: males, if compared to females, have more massive heads and scapular girdles, stronger front legs, rougher skin texture, and flatter bellies (abdomens in females are more rounded). Males tend to have also darker heads and crowns of the head (almost to black). Concerning behaviour, females are more active; they tend to have a closer contact with keepers and are quieter. The sight of female is sparkling, lively, while male's sight is deep, expressionless, „bull-like“.

The above mentioned differences are not developed in hatchlings and juveniles until approximately one year of age. At this age, animals in Prague Zoo reach usually 100-120 cm of total length and the differences between sexes in body length and mass start to develop (Velensky et al., 2011). Thus, it seems to us that accurate sexing based on these phenotypic traits is not possible before this age. In individuals around one year of age, these sexual differences start to develop and the sex is possible to be determined, however, with a high uncertainty. In two-year old animals, sex identification can be done with a higher accuracy and in animals aged three or four years, it is almost certain. In fully grown older healthy adults, according to our observation, the sexing is easy: big males reach about 70 kg, while big females only about 30 kg and the specimens over 50 kg are exclusively males; healthy fully grown specimens under 25 kg are exclusively females.

According to our observations, the two small rosettes of scales located anterior to the vent in males of all sizes mentioned by Auffenberg (1981) may not be well developed or are totally lacking in some males. Moreover, a manipulation necessary to examine the cloacal region of living Komodo dragons is very difficult in bigger animals. Thus, we have rejected these characteristics as being useful for easy and reliable sexing.

Regarding other methods of phenotypic sexing, we have a good experience with using ultrasound to detect ovarian follicles in adult females. For the post-mortem sexing, we used the dissection allowing direct examination of gonads. The quick option for reliable sexing is the eversion of hemipenis (hemipenes), the male intromittent organ(s), in dead males by palpation. Hemipenal bones can be eventually visualized radiographically in adult males Komodo dragon - alive or dead.

Molecular sexing

The heparinised blood or tissue (muscle in dead animals) samples were collected from 17 Komodo dragons previously identified based on phenotype as 4 females (internal identification/ARKS: F2/240331, F3/270086, F19/100267, F-1/unrecorded) and 13 males (M1/240330, M4/270087, M13/100103, M34/110066, M36/110304, M41/120160, M42/120340, M44/120342, M45/120343, M46/120344, M50/120097, M-1/unrecorded, M-2/unrecorded). The sex of five of these individuals was absolutely sure. The female F2 is a mother of all juveniles bred in Prague Zoo up to now, her daughter F3 laid eggs in Barcelona, the males M1 and M13 were dissected post mortem (M1 was a father of Prague offspring), and the male M4 is a proven breeder from Colchester Zoo.. The sex of the other 12 animals was determined *a priori* before molecular sexing based on phenotypic characteristics described above. The samples for molecular sexing were stored at -18 °C or in ethanol. Total DNA was extracted from the samples using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA), according to the manufacturer's standard protocol. Subsequently, sex-specific DNA fragments were amplified by PCR with the primers Ksex 1 for (5'-TGT CCA TGC CAC GCG GGC AA-3') and Ksex3rev (5'-TGT CCA TGC CAA TAA ACT TAA-3') according to the protocol of Sulandari et al. (2014). The PCR reaction was performed in 50 µl of the final volume, including 0.5 µl of DNA (20-80 ng/µl), 1 µl of each primer (10 pmol/µl), 5 µl of 10× PCR buffer (Bioline), 2.5 µl MgCl₂ (50mM), 1 µl dNTPs mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 10mM each), 0.5 µl BioTaq DNA polymerase (5 U/µl, Bioline) and 38.5 µl of PCR-grade water. The PCR amplification conditions were: 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 57 °C, 60 s at 72 °C, and a final extension step of 5 min at 72 °C. The PCR products were visualized in 0.8% agarose gel, stained with GelRed (Biotium).

For testing less invasive sampling of DNA, we collected buccal swabs, cloacal swabs and nail/skin tissue from the individuals M38/110306, M39/110307, M40/110308. The samples were stored immediately in -20 °C. DNA was isolated following the procedure described above. We tested the quality of DNA by PCR using two primer pairs, one for amplification of the mtDNA control region (primers KCRL forward: 5'-GCGCCTATTTCTCTATTTCCT-3' and KCRL reverse: 5'-GGGAGGGTCTTGTTAGTTGAAG-3'; Arida, 2011) and the second for molecular sexing.

Cytogenetic sexing

Cytogenetically identifiable sex chromosomes were reported in several species of monitor lizards (King et King, 1975; Matsubara et al., 2014). Therefore, we used the examination of metaphase chromosomal spreads prepared from short-term cultivation of leucocytes of Komodo dragons as well (details will be described in the upcoming paper). We examined four individuals with *a priori* determined sex based on phenotypic characteristics, namely the animals F25/100273, M38/110306, M39/110307 and M50/140097.

Results

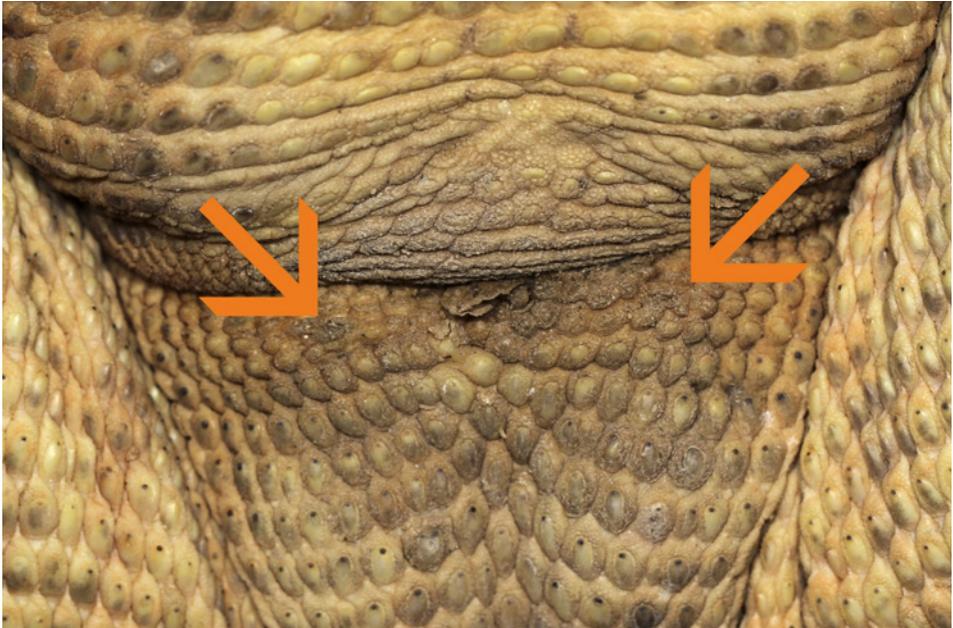
The sexing based on phenotypic and genetic (molecular and cytogenetic) characteristics was concordant in 100% of cases. In accordance with Sulandari et al. (2014), the molecular sexing was allowed by a consistent sex-specific pattern in the gel image (fig. 15). Females showed a strong band at approximately 800–900 bp and a faint band at 350–400 bp. On the contrary, males show a strong band at 900–1000 bp and a faint band at 350 bp. In all 17 cases (4 females, 13 males), there was a concordance between the results of the *a priori* phenotypic and subsequent molecular sexing. The cytogenetic analysis revealed the W chromosome in the individual F25/100273, which was *a priori* determined as a female in phenotypic sexing, but not in three individuals (M38/110306, M39/110307 and M50/120097) *a priori* phenotypically determined as males. The cytogenetic results of sexing in the male M50/120097 was also concordant with the molecular sexing applied in this individual as well.

In testing less invasive sampling of DNA, all isolations gave DNA of concentration 6–64 ng/μl, which is comparable to the concentrations of DNA from blood (20–300 ng/μl). With the exception of the nail/skin sample from a single individual (M38/110306), DNA fragments were successfully amplified with both primer pairs in all samples. The amplification of the mtDNA control region resulted in a single PCR product of approximately 1000bp. The primer pair for molecular sexing gave the two standard bands, one around 900bp and the second around 400bp long, but also other faint bands, which reflect probably low quality/highly fragmented DNA and might be confusing for identification of male- versus female-specific bands. Out of the three tested sampling procedures, the buccal swabs seem to have the highest quality of DNA for molecular sexing based on PCR, while nail/skin tissue the poorest.

Discussion

We can conclude that molecular sexing of Komodo dragons in Prague Zoo from blood or tissue samples using the protocol described by Sulandari et al. (2014) was successful. This technique is relatively cheap and requires only the basic equipment available in molecular laboratories. The tested less invasive sampling techniques seem to be a good source of mtDNA, but for molecular sexing, blood samples gave higher quality DNA and more reliable results. We suggest that molecular sexing from the alternative DNA sampling approaches from the pattern on gel should be used with caution and only when tissue/blood material is not available.

Despite Quinn et al. (2009) reported that the same primers can be used for molecular sexing in *Varanus rosenbergi*, we did not find any sex-specific differences in the tested samples of *Varanus exanthematicus* (results not shown), which suggests that this technique is not in fact widely applicable across varanids. It is questionable why this protocol gives specific male and female bands in the gel in *V. komodoensis* (see fig. 15). According to our cytogenetic examination (unpublished data) that the Komodo dragon has the ZZ/ZW system of sex chromosomes as other varanids (King et King, 1975; Matsubara et al., 2014) and relatively closely related helodermatids (Johnson Pokorná et al., 2014). Therefore, we should expect the presence of only a female specific band. On the other hand, the pattern observed in the molecular sexing is not concordant with the XX/XY sex chromosomes either, as no female-specific band should occur under this system of sex chromosomes. The reason for this pattern from this protocol is not clear to us; we can only speculate that Sulandari et al. (2014) identified the specific PCR conditions under which the primers predominantly amplify the sex-specific allele of the heterogametic sex. Nevertheless, better cytogenetic and genomic characterization of the sex chromosomes in *Varanus komodoensis* in future studies is necessary and might lead to the development of a more widely applicable molecular sexing method.



5. Adult male (M39/110307) Komodo dragon, *Varanus komodoensis*. Cloacal region: Small rosettes of scales anterior to the vent developed almost imperceptibly (scale irregularities marked by arrows).

Kloakální oblast dospělého samce (M39/110307) varana komodského, *Varanus komodoensis*. Malé různé štítky před kloakálním otvorem jsou vyvinuty jen sotva znatelně (nepravidelnosti v ošupení označené šipkami).

Foto/Photo by Petr Velenský

Our results also showed that it is possible to sex Komodo dragons non-destructively based on the cytogenetic examination of metaphase chromosomes derived from cell cultures. However, although highly reliable, this technique is relatively expensive, laborious, it requires laboratory equipped for cell cultivation and a lot of specialized training.

Our observation of the sexual morphological differences in *V. komodoensis* is similar to the sexual dimorphism described for *V. indicus* (Frýdlová et al., 2011). The total accordance between phenotypic and molecular and cytogenetic sexing reported here documents that it is possible to sex adult individuals (and with some uncertainty even adolescents) of Komodo dragons based on morphological and behavioural phenotypes. Nevertheless, weaknesses of phenotypic determination are evident: the observed sexual differences are mostly relative, and thus problematic in the case of sexing Komodo dragons kept individually or in monosexual groups. Moreover, the personal skills, ability and experience of the evaluator are of prominent importance, and not easy to share. It seems to us that in practice, only well trained persons with high empathy with Komodo dragons are really able to sex this species based on phenotype. Also, as mentioned earlier, this method is not available to hatchlings and younger individuals.

Regarding the two small rosettes of scales located according to Auffenberg (1981) anterior to the vent in males of all sizes, our results fully support findings of Halverson et Spelman (2002) and Sulandari et al. (2014) that these rosettes are not present in all males or are not clearly identifiable. Thus, this characteristics has only a supportive value, and it is not suitable as the only determination character for a proper sexing in Komodo dragons. We would want to draw attention to the fact that Auffenberg (1981) based his conclusions on the specimens from Komodo island, while Komodo dragons examined by us as well as those examined by Halverson et Spelman (2002) and Sulandari et al. (2014) originated most likely from Flores/Rinca population. We cannot exclude that the arrangement of scales exhibits interpopulation/geographic variability.

In conclusion, we suggest that molecular sexing is reliable and currently the most superior technique for sexing Komodo dragons.



6. Adult male (M38/110306) Komodo dragon, *Varanus komodoensis*. Cloacal region: Small rosettes of scales anterior to the vent undeveloped.

Kloakální oblast dospělého samce (M38/110306) varana komodského, *Varanus komodoensis*. Malé růžice štítků před kloakálním otvorem nejsou vůbec vyvinuty. Foto/Photo by Petr Velenský



7. Adult male (M40/110308) Komodo dragon, *Varanus komodoensis*. Cloacal region: Small rosettes of scales anterior to the vent undeveloped.

Kloakální oblast dospělého samce (M40/110308) varana komodského, *Varanus komodoensis*. Malé růžice štítků před kloakálním otvorem nejsou vyvinuty. Photo Foto/Photo by Petr Velenský

References

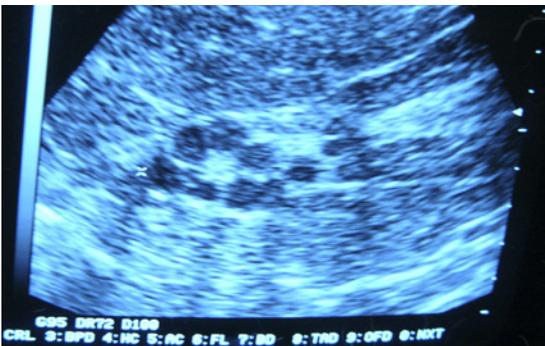
- ARIDA, E. A. (2011): Phylogeography of the Komodo monitor *Varanus komodoensis* (Reptilia: Varanidae) inferred from mitochondrial DNA Control Region I and the implications for in situ management plans. PhD Thesis, University of Bonn, pp. 1-156.
- AUFFENBERG, W. (1981): The Behavioral Ecology of the Komodo Monitor. A University of Florida Book. University Presses of Florida. Gainesville. 406 pp.
- FRÝDLOVÁ, P., VELENSKÝ, P., ŠIMKOVÁ, O., CIKANOVÁ, V., HNÍZDO, J., REHÁK, I., FRYNTA, D., (2011): Is body shape of mangrove-dwelling monitor lizards (*Varanus indicus*; *Varanidae*) sexually dimorphic? AMPHIBIA-REPTILIA 32 (1): 27-37.
- HALVERSON, J., SPELMAN, L. H. (2002): Sex determination and its role in management. In: MURPHY, J. B., CIOFI, C., DE LA PANOUSE C., WALSH, T. (eds). Komodo dragons: Biology and Conservation. Smithsonian Institution Press, Washington, p. 165-177.
- KING, M., KING, D. (1975): Chromosomal evolution in the lizard genus *Varanus* (Reptilia). AUSTRALIAN JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES 28: 89-108.
- LANCI, A. K. J., RODEN, S. E., BOWMAN A., LaCASELLA, E. L., FREY, A., DUTTON, P. H. (2012): Evaluating buccal and cloacal swabs for ease of collection and use in genetic analyses of marine turtles. Chelonian Conservation and Biology 11(1): 144-148.
- MATSUBARA, K., SARRE, S. D., GEORGES, A., MATSUDA, Y., MARSHALL GRAVES, J. A., EZAZ, T. (2014): Highly differentiated ZW sex microchromosomes in the Australian *Varanus* species evolved through rapid amplification of repetitive sequences. PLOS ONE 9 (4): e95226.
- POKORNÁ, M., KRATOCHVÍL, L. (2009): Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? ZOOLOGICAL JOURNAL OF THE LINNEAN SOCIETY 156: 168-183.
- POKORNÁ, M. J., ROVATSOS, M., KRATOCHVÍL, L. (2014): Sex chromosomes and karyotype of the (nearly) mythical creature, the Gila Monster, *Heloderma suspectum* (Squamata: Helodermatidae) (I V. Sharakhov, Ed.). PLOS ONE 9: e104716.
- QUINN, A. E., RADDER, R. S., SARRE, S. D., GEORGES, A., EZAZ, T., SHINE, R. (2009): Isolation and development of a molecular sex marker for *Bassiana duperreyi*, a lizard with XX/XY sex chromosomes and temperature-induced sex reversal. MOLECULAR GENETICS AND GENOMICS 281: 665-672.
- REHÁK, I., VELENSKÝ, P. (1997): Biologie varanů *Varanus prasinus*, *V. rudicollis* a *V. salavadorii* v lidské péči. Biology of the varanids *Varanus prasinus*, *V. rudicollis* and *V. salavadorii* in captivity. GAZELLA (Zoo Praha) 24: 108-138.
- SULANDARI, S., ZEIN, M. S. A., ARIDA, E. A., HAMIDY, A. (2014): Molecular sex determination of captive Komodo Dragons (*Varanus komodoensis*) at Gembira Loka Zoo, Surabaya Zoo, and Ragunan Zoo, Indonesia. HAYATI Journal of Biosciences 21 (2): 65-75.
- VELENSKÝ, P., KYMLA, Z., VELENSKÁ, N. (2011): Chov varana komodského (*Varanus komodoensis* Ouwens, 1912) v Zoo Praha. Komodo Dragon (*Varanus komodoensis* Ouwens, 1912) Husbandry and Breeding in Prague Zoo. GAZELLA (Zoo Praha) 38: 28-51.

Úvod

Běžná metoda pro identifikaci pohlaví u mnoha druhů šupinatých plazů - zjištění přítomnosti nebo nepřítomnosti hemipenisu(ů) kloakálním sondováním - je u varanů komodských problematická (jak uvádí již Auffenberg, 1981) . Jedním z důvodů je, že poměrně často přítomnost silných kloakálních svěračů brání správnému zasunutí sondy. Samice zase mají hemiklitorisové vaky v přibližně stejné poloze jako samci hemipenisy, a proto může být pohlaví snadno určeno chybně. Také nezbytná manipulace s tím spojená, která vyžaduje delší imobilizaci jedince, může být problematická při práci s většími varany.

Ani druhá metoda určování pohlaví – everze hemipenisu palpací – není spolehlivá a snadno použitelná u dospělých varanů komodských (Halverson et Spelman, 2002). I když tato metoda je úspěšně užívána u mláďat a mladých jedinců mnoha šupinatých plazů, zvláště u mnoha druhů hadů, v Zoo Praha jsme ji u juvenilních varanů komodských z obav z jejich fyzického poškození nezkoušeli. Obdobně jako Auffenberg (1981) jsme plně zavrhli alternativní metodu everze hemipenisu injekcí sterilní vody jako nepraktickou a pro zkoumaného jedince potenciálně škodlivou.

Auffenberg (1981) uvádí, že u samců všech velikostí jsou dvě malé růžice štítků nacházejících se v druhé až třetí řadě před kloakálním otvorem, každá na jedné straně podélné osy. Halverson et Spelman (2002) upozornili, že tyto růžice se nenacházejí u všech samců. Také Sulandari et al. (2014) zmiňují tyto rozdíly mezi pohlavími v uspořádání prekloakálních štítků, ale rovněž poukazují, že tento znak v ošupení nemusí být vždy jasně zřetelný.



8. Sonographic examination of ovarias in adult female Komodo dragon, *Varanus komodoensis*. Vyšetření vaječníků dospělé samice varana komodského *Varanus komodoensis*, pomocí ultrazvuku. Foto/Photo by Roman Vodička

9. Sonographic visualization of well developed follicles in adult female Komodo dragon, *Varanus komodoensis*. Detail of ovary. Black oval structures are follicles.

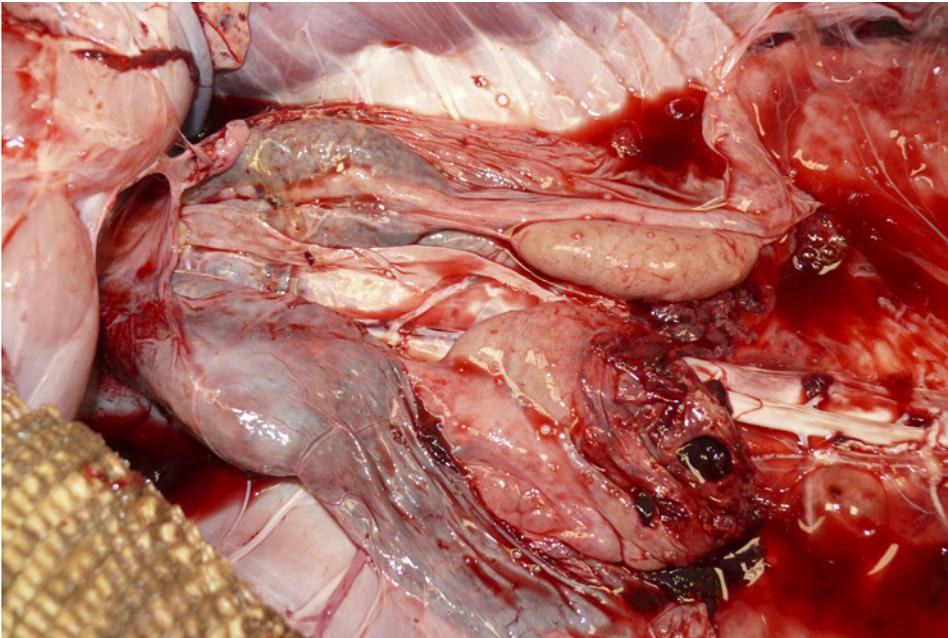
Sonografický snímek dobře vyvinutých folikulů dospělé samice varana komodského *Varanus komodoensis*. Detail vaječniku. Černé otvory jsou folikuly. Foto/Photo by Roman Vodička



10. Testicle (yellow) and kidney (dark) of adult male (M1/240330) Komodo dragon, *Varanus komodoensis*, aged 8 years.
Varle (žluté) a ledvina (tmavá) u dospělého osmiletého samce (M1/240330). Foto/Photo by Roman Vodička



11. Ovaria and oviducts of young female Komodo dragon, *Varanus komodoensis*.
Vaječníky a vejcovody mladé samice varana komodského *Varanus komodoensis*. Foto/Photo by Roman Vodička



12. Testicles in old adult male (M13/100103) Komodo dragon, *Varanus komodoensis*. Lower testicle underwent a cystic degeneration, it is enlarged and with the fistula.

Varlata starého samce (M13/100103) varana komodského *Varanus komodoensis*. Spodní varle je cysticky degenerované, zvětšené, s píštělí. Foto/Photo by Roman Vodička

K určení pohlaví varanů komodských mohou být použity některé další metody (Halverson et Spelman, 2002; Sulandari et al, 2014). Přímou, ale invazní metodou je inspekce pohlavních žláz pomocí endoskopu. Radiografie kloakální oblasti může být použita pro zjištění přítomnosti kostí hemipenisů samců. Další techniky jsou založeny na detekci vysoké hladiny cirkulujícího testosteronu v krevní plazmě samců. Jinou možností je posouzení přítomnosti vaječnickových folikulů, nebo dokonce varlat ultrazvukem. I když jsou tyto techniky poměrně přesné, neposkytují konzistentní výsledky u mladých zvířat, a jejich využití někdy brání i nutnost speciálního technického vybavení.

Podle Auffenberga (1981) není u varanů komodských vyvinut žádný z obvyklých plazích druhotných pohlavních znaků a je nemožné určit z jakékoliv vzdálenosti jejich pohlaví. Také Sulandari et al. (2014) uvádějí, že varani komodští nemají viditelné morfologické rozdíly mezi pohlavími (i když samci mají tendenci být v dospělosti objemnější a větší než samice). Nicméně, na rozdíl od těchto uveřejněných názorů, využíváme rozdíly v externí morfologii, stejně jako v zabarvení a etologii u varanů komodských, jakož i dalších varanů, v pražské zoo jako standardní metodu k určování pohlaví již léta (cf. Reháček et Velenský, 1997; Velenský et al, 2011). Zoo Praha je v současnosti významným chovatelem tohoto druhu a slouží jako zdroj jedinců pro vznikající chovná centra v jiných zoo, zejména pro partnery v EAZA EEP pro varana komodského. Mezi hlavní výhody určení pohlaví podle fenotypových znaků patří jeho neinvazivnost, zejména proto, že není třeba se zvířaty manipulovat, a také nízké náklady, protože k tomu není potřeba specializovaná zařízení. Nicméně, může být kritizováno jako subjektivní a potřebuje další zhodnocení.

Pro určování pohlaví varanů komodských se tedy ukazuje jako velmi potřebné mít po ruce přesnou, poměrně jednoduchou a nepříliš drahou techniku, použitelnou také pro mláďata a juvenilní jedince. Vzhledem k tomu, že podobně jako jiní varanovití (např. Pokorná et Kratochvíl, 2009), varani komodští mají genotypové určení pohlaví, nabízí se molekulární určování pohlaví jako dobrá volba. Naštěstí je pro varany komodské k dispozici marker DNA pro stanovení pohlaví (Halverson et Spelman, 2002). V poslední době, Sulandari et al. (2014) optimalizovali postup Halversona et Spelmana (2002) a úspěšně určili pohlaví varanů komodských chovaných ve třech indonéských zoologických zahradách. V naší studii

jsme použili stejnou metodiku pro molekulární určení pohlaví 17 varanů komodských chovaných v Zoo Praha, abychom provedli další test molekulární metodiky určení pohlaví varanů komodských a ověřili soulad našeho předchozího určení pohlaví na základě morfologie a etologie s molekulárním určením pohlaví a/nebo určením pohlaví na základě lékařských zařízení, posmrtnou inspekci gonád a cytogenetickou analýzou. Dále jsme testovali možnosti molekulárního určování pohlaví s využitím alternativních, méně invazivních nebo neinvazivních, odběrů vzorků - bukalní stěry, výtěry z kloak, odstřižené drápy a kožní tkáň (cf. Lanzi et al., 2012).

Morfologické znaky, zbarvení a etologické prvky používané k určování pohlaví v Zoo Praha

Nejvýznamnějšími morfologickými rozdíly mezi samci a samicemi jsou následující: samci, ve srovnání se samicemi, mají masivnější hlavy a mohutnější lopatkové pásmo, silnější přední nohy, hrubší strukturu kůže a plošší břicho (břicho samic je zaoblenější). Samci mívají také tmavší hlavy a temeno hlavy (téměř černá). Pokud jde o chování, samice jsou oproti samcům samcům aktivnější; mají tendenci mít bližší kontakt s chovatelem a jsou mírnější. Pohled samice je jiskřivý, živý, zatímco samčí pohled je hluboký, bez výrazu (jakoby býčí).

Výše uvedené rozdíly nejsou vyvinuty u mláďat a juvenilních jedinců přibližně do jednoho roku věku. V tomto věku varani komodští v Zoo Praha dosahují obvykle 100 až 120 cm celkové délky a rozdíly mezi pohlavími v délce těla a hmotnosti začínají být patrné (Velenský et al., 2011). Podle našich pozorování není přesné určení pohlaví na základě uvedených fenotypových znaků před tímto věkem možné. U jedinců kolem jednoho roku věku se tyto pohlavní rozdíly začínají rozvíjet a pohlaví je možné určit, avšak s vysokou mírou nejistoty. U dvouletých zvířat může být identifikace pohlaví provedena s vyšší přesností, a u zvířat ve věku tři nebo čtyři roky, je určení pohlaví téměř jisté. U plně vzrostlých starších zdravých dospělých jedinců je podle našeho pozorování určení pohlaví snadné: velcí samci dosahují okolo 70 kg, zatímco samice pouze okolo 30 kg velké a jedinci nad 50 kg jsou výhradně samci; zdraví plně dospělí jedinci do 25 kg jsou výhradně samice.

Dvě malé růžice štítků před kloakálním otvorem u samců všech velikostí uváděné Auffenbergem (1981), nemusí být podle našich pozorování dobře vyvinuté, nebo u některých samců zcela chybí. Navíc manipulace nezbytná k prozkoumání kloakální oblasti živého varana komodského je u větších zvířat velmi obtížná. Proto jsme tento znak zamítli jako nevhodný pro snadné a spolehlivé určení pohlaví varanů komodských.

Co se týče jiných metod fenotypového určení pohlaví, máme dobrou zkušenost s detekcí vaječnickových folikulů u dospělých samic pomocí ultrazvuku. Pro posmrtné určení pohlaví používáme přímé zjištění pohlavních žláz pitvou. Rychlou volbou pro spolehlivé určení pohlaví mrtvého samce je everze hemipenisu palpací. Hemipenisové kosti lze případně vizualizovat radiograficky u dospělých samců varana komodského – živých či mrtvých.

Molekulární určení pohlaví

Vzorky heparinizované krve nebo jiných tkání (sval) byly odebrány ze 17 varanů, kteří byli předtím určeni jako 4 samice (interní označení/ARKS: F2/240331, F3/270086, F19/100267, F-1/neregistována) a 13 samců (M1/240330, M4/270087, M13/100103, M34/110066, M36/110304, M41/120160, M42/120340, M44/120342, M45/120343, M46/120344, M50/120097, M-1/neregistrován, M-2/neregistrován). Pohlaví pěti z těchto zvířat bylo známo zcela jednoznačně: samice F1 je matkou všech v pražské zoo dosud odchovaných varanů, její dcera F3 už kladla v Barceloně vejce, samci M1 a M13 byli pitváni po smrti (M1 byl v Praze otcem několika mláďat) a samec M4 byl potvrzen jako otec mláďat v zoologické zahradě v Colchesteru. Pohlaví ostatních 12 zvířat bylo určeno *a priori* před molekulárními analýzami na základě výše uvedených fenotypových znaků. Vzorky pro molekulární analýzy byly uchovány v etanolu nebo zamrazeny při teplotě -18 °C. DNA byla ze vzorků izolována pomocí kitu DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) podle standardního protokolu výrobce. Pohlavně specifické fragmenty DNA byly amplifikovány pomocí PCR za použití primerů Ksex 1for (5'-TGT CCA TGC CAC GCG GGC AA-3') a Ksex3rev (5'-TGT CCA TGC CAA TAA ACT TAA-3') podle protokolu uvedeném v dříve publikované práci (Sulandari et al., 2014). PCR probíhala v 50 µl celkového objemu, z čehož tvořila DNA 0.5



13. Everted hemipenis of adult male (M1/240330) Komodo dragon, *Varanus komodoensis*, aged 8 years. Vysunutý hemipenis dospělého osmiletého samce (M1/240330) varana komodského *Varanus komodoensis*. Foto/Photo by Petr Velenský.



14. Everted hemipenis of old adult male (M13/100103) Komodo dragon, *Varanus komodoensis*, with well developed hemipenial bones. Vysunutý hemipenis dospělého samce (M13/100103) varana komodského *Varanus komodoensis*, s dobře vyvinutými hemipenisovými kůstkami. Foto/Photo by Roman Vodička

μl (v koncentraci 20-80 ng/μl), každý primer 1 μl (10 pmol/μl), 10× PCR pufr (Bioline) 5 μl, dále roztok obsahoval 2.5 μl MgCl₂ (50mM), 1 μl dNTPs směsi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 10mM each), 0.5 μl BioTaq DNA polymerázy (5 U/μl, Bioline) a 38.5 μl vody v kvalitě vhodné pro PCR. Amplifikační podmínky PCR zahrnovaly 3 minuty v 95 °C následované 35 cykly 30 sekund při 95 °C, 30 sekund v 57 °C, 60 sekund v 72 °C, konečný krok trval 5 minut při 72 °C. Produkty PCR byly vizualizovány na agarózovém gelu (0.8%) při barvení GelRed (Biotium).

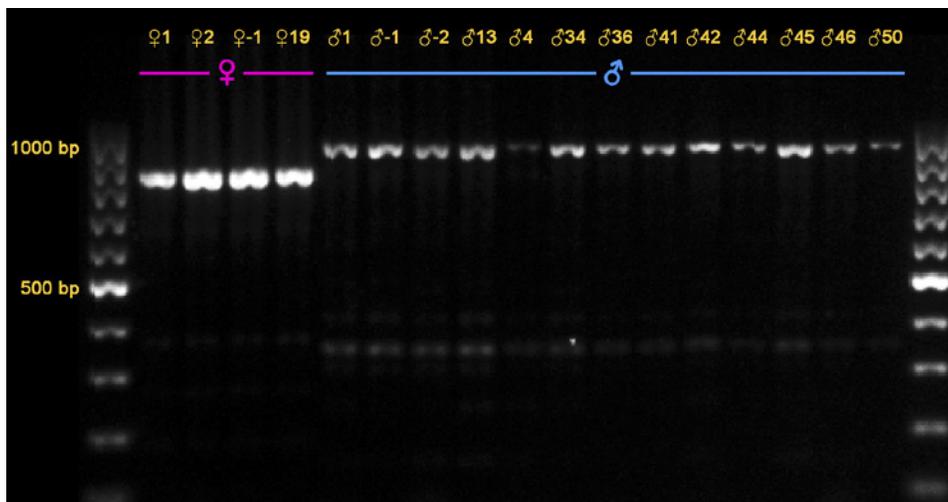
Pro testování méně invazivního získání vzorků DNA jsme použili bukalní a kloakální výtěry a materiál z konců drápů či sloupané kůže jedinců M38, M39, M40. Vzorky byly po odebrání ihned zamrazeny při teplotě -20 °C. DNA byla později izolována výše uvedeným postupem. Kvalitu takto získané DNA jsme testovali pomocí PCR za použití dvou párů primerů, jednoho pro amplifikaci mitochondriální kontrolní oblasti (primer KCRL forward: 5'-GCGCCTATTTCTCCTATTCT-3' a KCRL reverse: 5'-GGGAGGGTTCTTG-TAGTTGAAG-3'; Arida, 2011) a druhého pro molekulární určení pohlaví uvedeného výše.

Určení pohlaví na základě cytogenetiky

Dobře diferencované pohlavní chromozomy jsou známy u několika druhů varanů (King et King, 1975; Matsubara et al., 2014). Proto jsme i u varana komodského použili vyšetření inspekci preparovaných metafázních chromozomů připravených pomocí krátkodobé kultivace leukocytů (podrobnosti jsou popsány v připravovaném rukopise). Cytogeneticky byli vyšetřeni čtyři jedinci, u kterých bylo předem určeno pohlaví dle fenotypových znaků (konkrétně zvířata F25/100273, M38/110306, M39/110307 a M50/140097).

Výsledky

Určení pohlaví dle fenotypu a pomocí genetických (molekulárních a cytogenetických) metod se shodovalo ve všech případech. Ve shodě s předchozí prací (Sulandari et al., 2014) se pohlaví varanů lišila ve vzoru na gelu (fig. 15). U samic byl přítomen silný pruh velikostí odpovídající přibližně 800-900 párům bazí (bp) a slabý pruh kolem 350-400 bp, zatímco samci vykazovali silný pruh kolem 900-1000 bp a shodně se samicemi slabý pruh kolem 350 bp. U všech 17 jedinců (4 samice, 13 samců) se výsledky mezi fenotypovou determinací pohlaví a molekulární metodou shodovaly. Při cytogenetickém vyšet-



15. Image of agarose gel electrophoresis of PCR amplification for molecular sexing of *Varanus komodoensis*. Males always demonstrate a prominent, higher molecular weight band of 900-1000 bp, in comparison to females, which show a strong, but relative lower molecular weight band of 800-900 bp. Both sexes show an secondary, faint band of 350-400 bp. 100bp DNA ladder was used to identify the molecular weight of the PCR products. The internal identification codes of both female (♀) and male (♂) Komodo dragons are illustrated.

Foto agarózového gelu ukazují výsledky elektroforézy produktů PCR amplifikace. Samci mají výrazný pruh kolem 900-1000 bp, samice kolem 800-900 bp. Obě pohlaví mají slabší, sekundární pruh v oblasti 350-400 bp. Pro identifikaci molekulárních hmotností PCR produktů byl použit DNA „žebrík“ po 100bp. Na obrázku jsou jedinci označeni interními kódy.

Foto/Photo by Michail Rovatsos

ření byl identifikován chromozom W u jedince F25, který byl *a priori* určen dle fenotypu jako samice, W chromozom chyběl u tří jedinců (M38, M39 a M50) *a priori* určených jako samci. Cytogenetické i molekulární vyšetření shodně určila jedince M50 jako samce.

Izolace DNA z méně invazivních vzorků vedla k získání DNA o koncentraci 6-64 ng/μl, což je srovnatelné s koncentrací DNA izolované z krve (20-300 ng/μl). S výjimkou vzorku z drápů/kůže u jednoho jedince (M38) byly DNA fragment úspěšně amplifikovány oběma páry primerů. Amplifikace mtDNA kontrolního úseku vedla k získání jediného PCR produktu odpovídajícího zhruba 1000bp. Pár primerů pro molekulární určení pohlaví vedl ke standardním dvěma produktům (kolem 900bp a 400bp), ale na gelu jsme tž pozorovali další, i když slabší pruhy, což patrně odráží nízkou kvalitu či vysokou fragmentaci DNA. Tyto sekundární produkty by mohly vést k horšímu rozpoznání samčího a samičího specifického pruhu. Z testovaných tří vzorků vedl k nejlepším výsledkům bukální stěr, naopak vzork z drápů či kůže byl nejhorší.

Diskuse

K molekulárnímu určení pohlaví varanů komodských v Zoo Praha z krevních vzorků byl úspěšně použit publikovaný protokol (Sulandari et al., 2014). Tato metoda je relativně levná a vyžaduje pouze běžně vybavenou molekulární laboratoř. Testované méně invazivně odebrané vzorky se ukázaly jako velmi vhodné pro získání mtDNA, ale pro molekulární určení pohlaví vedly krevní vzorky k lepší kvalitě izolované DNA a spolehlivějším výsledkům. K výsledkům molekulárního určení pohlaví z alternativních vzorků na základě vzoru na gelu by se mělo přistupovat obezřetněji a jen když materiál z krve či biopsie není dostupný.

Quinn et al. (2009) uvedli úspěšné použití stejných primerů k molekulárnímu určení pohlaví i u jiného druhu varana (*Varanus rosenbergi*), nám se ale zatím tato metoda neosvědčila při aplikaci u druhu *Varanus exanthematicus* (nepublikované výsledky), což naznačuje, že metoda by nemusela být široce použitelná u všech varanů. Je otázkou, proč při použití tohoto protokolu pozorujeme na gelu specifické pruhy u obou pohlaví *V. komodoensis* (obr. 15). Naše cytogenetické vyšetření ukázalo, že varan

komodský má ZZ/ZW systém pohlavních chromozomů stejně jako ostatní dosud v tomto ohledu studovaní varani (King et King, 1975; Matsubara et al., 2014) a relativně blízký příbuzný korovec (Johnson Pokorná et al., 2014). Proto bychom očekávali, že na gelu bude specifický pruh pouze u samic. Pozorovaný vzor na gelu ale neodpovídá ani XX/XY systému pohlavních chromozomů, kde bychom očekávali pouze samčí specifický pruh. Možným, dosti spekulativním, vysvětlením by mohlo být, že Sulandari et al. (2014) identifikovali velice specifické podmínky PCR, za kterých primery přednostně amplifikují pohlavně specifickou alelu heterogametického pohlaví, tedy samice. Každopádně bude užitečná budoucí podrobnější cytogenetická a genomická studie pohlavních chromozomů varana komodského *Varanus komodoensis*, která může vest i k popsání nové metody určování pohlaví použitelné u širšího spektra varanů.

Naše výsledky ukázaly, že u varanů komodských lze nedestruktivně určit pohlaví cytogenetickým vyšetřením metafázních chromozomů připravených z buněčných kultur. Tato metoda je sice velmi spolehlivá, ale taky relativně nákladná, pracná a vyžaduje vybavení pro buněčnou kultivaci a značné specializované zkušenosti.

Naše pozorování morfologických pohlavních rozdílů u *V. komodoensis* je podobné sexuálnímu dimorfismu popsanému pro *V. indicus* (Frydlová et al., 2011). Námí zjištěný úplný soulad mezi provedeným fenotypovým, molekulárním a cytogenetickým určením pohlaví, ukazuje, že je možné, určit pohlaví dospělých (a dokonce teprve dospívajících) jedinců varana komodského na základě morfologických a behaviorálních znaků. Nicméně, nedostatky fenotypového určování pohlaví jsou zřejmé: pozorované sexuální rozdíly jsou většinou relativní, a tedy problematické v případech určování pohlaví varanů komodských chovaných jednotlivě nebo v unisexuální skupině. Přitom mají zásadní důležitost osobní dovednosti, schopnosti a zkušenosti hodnotitele, které navíc není snadné sdílet. Dle našich zkušeností jsou v praxi schopny určit pohlaví varana komodského na základě fenotypu pouze dobře vyškolené osoby s vysokou mírou empatie k varanům komodským. Rovněž, jak bylo zmíněno dříve, tato metoda není použitelná pro mláďata a příliš mladé jedince.

Pokud jde o dvě malé růžice štítků umístěných podle Auffenberga (1981) před kloakálním otvorem samců všech velikostí, naše výsledky plně podporují závěry Halversona et Spelmana (2002) a Sulandariho et al. (2014), že tyto růžice nejsou přítomné u všech samců nebo nejsou jasně identifikovatelné. Tato charakteristika má tedy pouze podpůrnou hodnotu a není vhodná jako jediný znak pro správné určení pohlaví u varana komodského. Chtěli bychom rovněž upozornit na skutečnost, že Auffenberg (1981) učinil své závěry na základě varanů z ostrova Komodo, zatímco varani komodští, které jsme zkoumali my, stejně jako ti, které zkoumali Halverson et Spelman (2002) a Sulandari et al. (2014) pocházeli s největší pravděpodobností z populace z ostrovů Flores a Rinca. Nemůžeme tedy ani vyloučit, že uspořádání šupin vykazuje interpopulační /geografickou variabilitu.

Závěrem doporučujeme molekulární určení pohlaví jako spolehlivou a v současnosti nejvýhodnější techniku určování pohlaví varanů komodských.



16. Blood collection (from ventral caudal vein) in Komodo dragon, *Varanus komodoensis*.
Odběr krve (z ventrální ocasní žíly) varana komodského, *Varanus komodoensis*.

Foto/Photo by Roman Vodička