

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Tomáš Pavlica**

**Evoluce pohlavních chromozómů u paprskoploutvých ryb (Actinopterygii)**  
**Sex chromosome evolution in ray-finned fishes (Actinopterygii)**

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Alexandr Sember, Ph.D.

Praha, 2020

## **Abstrakt**

Paprsokoploutvé ryby se vyznačují značnou diverzitou z hlediska strategií pohlavní diferenciaci (zahrnující gonochorizmus, unisexuality i různé formy hermafroditizmu) a mechanismů determinace pohlaví (environmentální i genetické), včetně různých přechodů mezi jednotlivými výše zmíněnými strategiemi a mechanismy. Přestože dosud jen u 5 % cytogeneticky studovaných druhů ryb byly odhaleny pohlavní chromozómy, toto malé procento zahrnuje devět různých systémů (se samčí nebo samičí heterogamií) v různých fázích diferenciaci, které se mohou lišit i u blízce příbuzných druhů, a dokonce i v rámci různých populací téhož druhu. Vzhledem k relativnímu evolučnímu mládí pohlavních chromozómů ryb jsou především kostnaté ryby (Teleostei) vhodnou modelovou skupinou pro studium časných fází diferenciaci těchto specializovaných oblastí genomu. Navíc se v poslední době ukazuje (u ryb i jiných organismů), že přítomnost raných fází vývoje pohlavních chromozómů a rovněž samotný mechanismus přechodu mezi různými systémy mohou mít kauzální souvislost s ekologickou adaptací, speciací nebo genomovým konfliktem. Vedle cytogenetického výzkumu, který zásadní měrou přispěl k současným poznatkům o evoluci a variabilitě rybích pohlavních chromozómů, se začínají v posledních letech čím dál častěji uplatňovat nové genomické a transkriptomické přístupy, které přispívají k i) detailnější charakterizaci genetického obsahu nerekombinujících oblastí na nepárových pohlavních chromozómech a rovněž k ii) odhalování nascentních morfologicky nediferencovaných pohlavních chromozómů, které se vzhledem k výše uvedeným charakteristikám u ryb často vyskytují. Bakalářská práce si klade za cíl shrnout dosavadní poznatky o variabilitě rybích pohlavních chromozómů a jejich genetického obsahu a charakterizovat moderní přístupy jejich cytogenetické, genomické a transkriptomické analýzy.

**Klíčová slova:** evoluce, geny určující pohlaví, molekulární cytogenetika, pohlavní chromozómy, speciace

## **Abstract**

Ray-finned fishes (Actinopterygii) possess strikingly diverse sex differentiation strategies (including gonochorism, unisexuality and several types of hermaphroditism) and mechanisms of sex determination (both environmental and genetic) and also frequent turnovers between abovementioned strategies and mechanisms. Although exhibiting remarkable diversity of sex determination mechanisms, only about 5 % of analyzed teleost species possess cytologically recognizable (i.e. heteromorphic) sex chromosomes. Still, nine different male- or female-heterogametic sex chromosome systems at various stages of differentiation have been described along with high rate of inter- and intraspecific variability. Given that early sex chromosome evolution is best studied in evolutionarily young, i.e. nascent sex chromosomes, ray-finned fishes and especially the teleost lineage (Teleostei) represent a vital model group for its investigation, offering thus new important insights into the evolution of these rapidly evolving regions of vertebrate genomes. Moreover, a handful of studies available to date has provided evidence for a role of emerging sex chromosomes and their turnover in processes such as ecological adaptation, speciation or genomic conflict. Besides cytogenetic studies, which had a major impact on our current knowledge about fish sex chromosome variability and evolution, also the gradually increasing number of valuable genomic and transcriptomic studies brought important new insights on finer-scale level as they are i) able to deeper characterize the genetic content on non-recombining region of unpaired sex chromosome and ii) capable to detect small-sized sex-determining regions on homomorphic sex chromosomes (being frequent in fishes, as might be inferred from the abovementioned characteristics). The aim of the current thesis is to collate and summarize the current knowledge about the trends in evolution of fish sex chromosomes and their genetic content, and to list the molecular cytogenetic and genomic approaches useful for current and future analyzes in this field.

**Keywords:** evolution, molecular cytogenetics, sex-determining genes, sex chromosomes, speciation

## Prohlášení

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

V Praze, 25. 07. 2019

Tomáš Pavlica

podpis

## Poděkování

Můj velký dík patří mému školiteli, Mgr. Alexandru Semberovi, PhD., který mi vždy podal pomocnou ruku kdykoli jsem ji potřeboval, a to nejen při psaní této práce.

Dále děkuji Mgr. Matyáši Hírmanovi za cenné rady, které mi pomohly rozhodnout se, kam směřovat dále, Mgr. Janě Štundlové, Ph.D. za její rady a klidnou rozvahu v laboratoři i mimo ni a Bc. Karolíně Lukšíkové za pomocnou ruku při studiu i práci v laboratoři.

# Obsah

<b>Seznam zkratek .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Úvod.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Role pohlavních chromozómů.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Vznik a dynamika pohlavních chromozómů .....</b>	<b>4</b>
<b>4. Determinace a diferenciacce pohlaví u ryb.....</b>	<b>6</b>
<b>5. Environmentální determinace pohlaví (ESD) u ryb .....</b>	<b>8</b>
<b>6. Genetická determinace pohlaví (GSD) u ryb.....</b>	<b>8</b>
6.1. Polygenní GSD. ....	9
6.2. Monogenní GSD .....	9
6.3. Vliv B chromozómů na určení pohlaví.....	11
<b>7. Pohlavní chromozómy ryb.....</b>	<b>12</b>
7.1. Systémy chromozómového určení pohlaví u ryb.....	12
7.2. Pohlavní systémy a přechody mezi nimi .....	13
<b>8. Studium pohlavních chromozómů ryb.....</b>	<b>16</b>
8.1. Význam konvenční cytogenetiky .....	16
8.2. Význam analýzy meiotických chromozómů .....	17
8.3. Moderní cytogenetické metody .....	17
8.4. Genomické a transkriptomické přístupy .....	21
8.5. Metody pro ověření funkce ústřední determinanty pohlaví .....	22
<b>9. Závěr.....</b>	<b>23</b>
<b>Seznam literatury .....</b>	<b>23</b>

## Seznam zkratek

<i>Amh</i>	anti-Müllerian hormone
BAC	bacterial artificial chromosome
<i>Bcar1</i>	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1
Cas9	CRISPR-associated protein 9 nuclease
CGH	comparative genomic hybridization
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
ddRAD-seq	double digest restriction site-associated DNA sequencing
<i>Dmrt1</i>	doublesex and mab-3 related transcription factor 1
<i>Dmy</i>	DM-domain gene on the Y chromosome
ESD	environmental sex determination
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
<i>Gdf</i>	growth differentiation factor
GISH	genomic <i>in situ</i> hybridization
GSD	Genetic sex determination
<i>Gsdf</i>	gonadal soma-derived factor
<i>HSD17B1</i>	17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase 1
<i>Irf9</i>	interferon regulatory factor
LG	linkage group
RAD-seq	restriction site-associated DNA sequencing)
<i>SdY</i>	sexual dimorphic on the Y-chromosome
SNP	single nucleotide polymorphism
<i>Sox</i>	Sry-related HMB box
<i>Sry</i>	Sex-determining region Y
TALEN	transcription activator-like effector nucleases
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TSD	temperature sex determination
WCP	whole chromosome painting
<i>ZkY</i>	zinc knuckle on the Y chromosome
<i>Zfand</i>	Zinc Finger AN1-Type Containing

## 1. Úvod

Paprsokoploutvé ryby (Actinopterygii) jsou skupinou studenokrevných obratlovců čítající přes 32 000 druhů, což je přibližně polovina všech dosud žijících obratlovců na zemi (Nelson et al., 2016). Drtivou většinu (tj. 99 %) biodiverzity této skupiny tvoří kostnaté ryby (Teleostei), které mj. vykazují značnou variabilitu mechanismů pro určení pohlaví (Devlin a Nagahama, 2002; Guiguen et al., 2019). Jelikož tyto mechanismy mohou často zahrnovat i vlivy okolního prostředí, je studium rybí pohlavní determinace důležité s ohledem na konzervaci druhů při neustále probíhajícím změnám klimatu na naší planetě (Honeycutt et al., 2019; Valenzuela et al., 2019). Dále je znalost mechanismů rybí determinace potřebná rovněž pro zefektivnění rybích akvakultur včetně produkce masa u druhů, kde jedno pohlaví dosahuje výrazně větší velikosti těla (Guiguen et al., 2019; Shen a Wang, 2019). V neposlední řadě, přibližně 5 % cytogeneticky studovaných ryb disponuje morfologicky rozpoznatelnými pohlavní chromozómy (Arai, 2011), ale zejména v posledních dekadách přibývá prací, které ukazují u mnoha druhů i přítomnost cytogeneticky nerozlišitelných pohlavních chromozómů (např. Gamble, 2016; Schartl et al., 2016). Tento stav je mj. pravděpodobně odrazem relativního evolučního mládí pohlavních chromozómů u ryb, a proto jsou ryby (i s ohledem na jejich fylogenetické postavení) důležitou skupinou pro studium raných fází diferenciace a evoluce pohlavních chromozómů obratlovců (Schartl et al., 2016).

## 2. Role pohlavních chromozómů

Pohlavní chromozómy představují pár původních autozómů, kde se na jednom z homologů vyvinul ústřední regulátor pro genetické určení pohlaví (např. varianty genů popsané v předchozí kapitole). Až na výjimky spojené s mechanismem kompenzace dávky genů je homolog s tímto regulátorem přítomen pouze u jednoho pohlaví (je to tzv. nepárový pohlavní chromozóm), zatímco druhý homolog bez regulátoru je přítomen u obou pohlaví (tzv. párový pohlavní chromozóm). Pohlaví, které má dva stejné pohlavní chromozómy, produkuje pouze jeden typ gamet a nazývá se homogametické. Oproti tomu pohlaví se dvěma různými pohlavními chromozómy produkuje dva typy gamet a představuje tak pohlaví heterogametické. Podle toho, u jakého pohlaví se vyskytuje nepárový pohlavní chromozóm, rozlišujeme dva systémy. Prvním je typ *Drosophila*, u kterého je heterozygotní samec s chromozómy X a Y a samice je homozygotní se dvěma chromozómy X. V rámci tohoto systému většinou přítomnost chromozómu Y determinuje vývoj samčí gonády. Druhým typem je *Abraxas*, kde je heterozygotním pohlavím samice s pohlavními chromozómy Z a W,



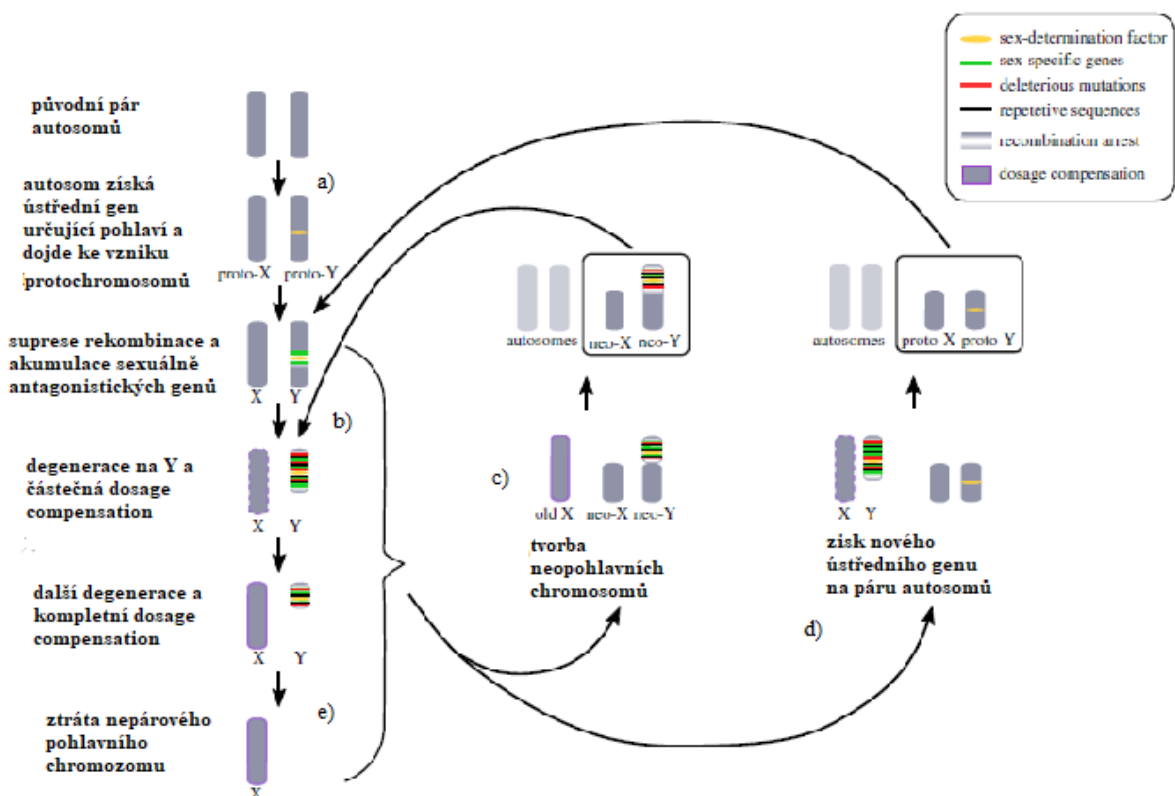
zatímco homozygotní samec má dva chromozómy Z (tj. chromozóm W determinuje vývoj samičí gonády, ale může tomu být i jinak, viz dále) (Bull, 1983; Bachtrog et al., 2011). Při křížení homogametického a heterogametického pohlaví se (za předpokladu rovnoměrné tvorby gamet u heterogametického pohlaví) udržuje v populaci rovnoměrný poměr samců a samic (1:1), což je poměr zajišťující největší genetickou variabilitu v populaci a navíc se výrazně snižuje pravděpodobnost příbuzenského křížení (Nur, 1974). Navíc je oproti ESD tento poměr stabilní, tj. změny okolních podmínek, mezi které můžeme řadit postupnou změnu průměrné teploty vody (např. vlivem globálního oteplování), nemají na tento poměr vliv (Honeycutt et al., 2019; Valenzuela et al., 2019). To může být jeden z důvodů, proč např. u studenokrevných obratlovců dochází u řady taxonů k přechodům od ESD na GSD (Pokorná a Kratochvíl, 2016)

### **3. Vznik a dynamika pohlavních chromozómů**

Ke vzniku pohlavních chromozómů došlo v průběhu evoluce mnohokrát a nezávisle na sobě (Bachtrog et al., 2014). Nejčastější mechanismus jejich vzniku je z homologního páru autozómů, kde se na jednom z homologů vytvořil ústřední gen určující pohlaví, nejčastěji mechanismem ektopické duplikace (tj. genová duplikace spojená s translokací kopie genu na jiné místo v genomu) nebo alelické diverzifikace (Herpin a Schartl, 2015; Guiguen et al., 2019). Výběr takového genu není náhodný, neboť, jak již bylo řečeno výše, signální kaskády pro determinaci pohlaví jsou konzervované napříč skupinami obratlovců (Capel, 2017; Guiguen et al., 2019). Následný proces diferenciacce pohlavních chromozómů popisuje dosud nejběžnější model pohlavně-antagonistické selekce, nicméně alternativní hypotézy a námitky k tomuto modelu již byly rovněž publikovány (Ironsides, 2010; Cavoto et al., 2018). Hromadění pohlavně-antagonistických alel genů (tj. takových alel, které jsou vhodné pro životaschopnost jednoho pohlaví, ale mají neblahý vliv na životaschopnost druhého pohlaví) v blízkosti nově vzniklé determinanty pohlaví vede k selekčně výhodnému zamezení rekombinace v této oblasti, neboť je značně výhodné, aby gen určující pohlaví a konkrétní pohlavně-antagonistické alely nadále segregovaly spolu v těsné vazbě. Nejúčinnějším mechanismem zamezení rekombinace jsou chromozómové přestavby, často např. inverze. V oblasti s potlačenou rekombinací se poté na nepárovém pohlavním chromozómu začínají hromadit mutace, které vedou k erozi genetického obsahu. Dále se zde začnou preferenčně akumulovat a amplifikovat nejrůznější typy repetitivních sekvencí a dochází následně obvykle k jejich heterochromatinizaci. Následkem těchto procesů dojde k odlišení tohoto pohlavního

chromozómu od svého homologního partnera, a to buď jeho zvětšením v důsledku hromadění repetitivních sekvencí, anebo jeho zmenšením v důsledku delecí způsobených mechanismy spojenými s aktivitou repetitivních sekvencí a dále nemožností opravy v oblasti s potlačenou rekombinací (Charlesworth et al., 2005; Bergero a Charlesworth, 2009). Podle toho, v jaké fázi diferenciace se nacházejí, dělíme pohlavní chromozómy na homomorfní, u nichž nedošlo morfologicky k žádné anebo jen minimální diferenciaci a pohlavní chromozómy jsou tak mikroskopicky nerozlišitelné (přičemž na úrovni sekvence DNA se již lišit mohou; Schartl et al., 2016) a dále na heteromorfní, kde už lze pohlavní chromozómy odlišit cytologicky. V pokročilých stádiích diferenciace se může u pohlavních chromozómů vyvinout kompenzace dávky genů, které již chybí na degenerovaném nepárovém pohlavním chromozómu. Poslední fázi může být úplná ztráta nepárového pohlavního chromozómu nebo jeho adice na autozóm za vzniku neo-pohlavního systému (viz Obr.1) (Abbott et al., 2017; Vicoso, 2019).

Obr. 1 Dynamika pohlavních chromozómů (Abbott et al. 2017, upraveno)



Z hlediska genetického obsahu se nejčastěji ústřední gen determinující pohlaví vytvoří na pozdějším nepárovém chromozómu Y/W (Bachtrog, 2013), ale byly zjištěny případy, např. u ptáků či jazykovce *C. semilaevis*, kde je pohlaví určeno genovou dávkou, tj. konkrétně počtem kopií genu *Dmrt1*, který se nachází na párovém chromozómu Z, zatímco chybí na

nepárovém chromozómu W (Smith et al., 2009; Chen et al., 2014). Může se ale stát, že na stejném či jiném páru chromozómů vyvstane nová ústřední determinanta, nebo se původní ústřední gen přemístí (např. pomocí translokace nebo transpozice) na jeden z homologů jiného (dosud autozómového) chromozómového páru a tím z něj vytvoří nový pár pohlavních chromozómů. (Mank a Avise, 2009; Abbott et al., 2017; Vicoso, 2019).

#### **4. Determinace a diferenciacie pohlaví u ryb**

U ryb můžeme najít širokou škálu mechanismů determinace a diferenciacie pohlaví. V současnosti existuje několik vzájemně se nevylučujících hypotéz, proč zrovna ryby takovouto enormní variabilitou oplývají. Ta nejrozšířenější říká, že důvodem mohou být odlišné podmínky, ve kterých ryby žijí a na které se musely adaptovat, aby si udržely balancovaný poměr pohlaví. Jedná se především o okolní teplotu, neboť na rozdíl třeba od savců se stabilní tělesnou teplotou (a tím i stabilním prostředím pro biochemické reakce) je teplota těla u studenokrevných obratlovců nestálá a je závislá na teplotě prostředí ( Kikuchi a Hamaguchi, 2013; Brykov, 2014) . V neposlední řadě může být plasticita pohlavní determinace způsobená tolerancí rybích genomů k polyploidizacím, tj. k celogenomovým duplikacím, což mohlo teoreticky výrazně urychlit vývoj nových ústředních genů pro určení pohlaví z duplikátů původních genů, tj. paralogů. Nutné je rovněž zmínit toleranci ryb k pohlavnímu zvratu, po němž jsou pohlavní orgány stále funkční, což podporuje také přechody mezi systémy pohlavních chromozómů a mezi environmentální a genetickou pohlavní determinací (Devlin a Nagahama 2002; Volff et al., 2007; Brykov 2014). Zatímco pohlavní determinace je proces, který určuje, zda dojde k vývoji samčích či samičích pohlavních orgánů, pohlavní diferenciacie je následná fyzická realizace tohoto binárního rozhodnutí, tj. tvorba a rozlišení samčích a samičích pohlavních žláz a orgánů během ontogeneze. U pohlavní diferenciacie hrají významnou roli steroidní hormony, jejichž syntéza a distribuce jsou přímým důsledkem složitých procesů, které jsou řízeny relativně konzervovanými signálními kaskádami (Devlin a Nagahama, 2002). Výrazná variabilita se však projevuje na úrovni ústředních regulátorů těchto kaskád, které mohou být kódovány buď větším počtem genů umístěných na autozómech či větším počtu tzv. pohlavních chromozómů (tzv. polygenní systémy) nebo jedním ústředním genem determinujícím pohlaví, jenž se zpravidla nachází na jednom z pohlavních chromozómů (tzv. monogenní systémy). Oba tyto případy spadají pod tzv. geneticky určené pohlaví (GSD, z angl. genetic sex determination), kde se samec od samice liší svým genotypem.. Nicméně u ryb ani u dalších studenokrevných

obratlovců není výjimkou situace, kdy je pohlaví určeno podmínkami okolního prostředí, přičemž genotyp samce i samice zůstává shodný (ESD, z angl. environmental sex determination) (Devlin a Nagahama, 2002; Kobayashi et al., 2013; Gemmel et al., 2019; Guiguen et al., 2019). Navíc se na výsledném pohlaví může podepsat kombinace obou mechanismů, kdy např. kritická změna teploty nebo přítomnost exogenních hormonů ve vodě mohou modulovat a v konečném důsledku i zvrátit vývoj geneticky determinovaných gonád za vzniku jedince opačného pohlaví (tzv. pohlavní zvrát, z angl. „sex reversal“) (Shao et al., 2014; Shen a Wang, 2019). Pohlavní determinaci u ryb lze tak vnímat mechanisticky spíše jako určité kontinuum od ESD ke GSD, s výrazně plastickou a neustále se přizpůsobující sítí regulačních interakcí (Shen a Wang, 2019; Guiguen et al., 2019).

Z hlediska pohlavní diferenciaci lze rozlišit dvě základní skupiny: i) gonochoristé, kteří jsou po celý život schopni produkovat jen jeden typ pohlavních buněk, a ii) hermafrodité, kteří jsou schopni v průběhu svého života produkovat samčí i samičí pohlavní buňky. Hermafroditismus se dále dělí na simultánní, kdy organizmus produkuje oba typy pohlavních buněk najednou, a sériový, kdy organizmus mění své pohlaví v průběhu života. Pokud se z původních samců stávají samice, říká se jim protandriční hermafrodité a naopak, pokud se ze samic stávají samci, jsou označováni jako protogynní hermafrodité. U ryb byly objeveny všechny tyto možnosti (Kobayashi et al., 2013; Gemmel et al., 2019).

Pro determinaci a diferenciaci pohlaví je u kostnatých ryb stejně jako u většiny ostatních obratlovců důležitá činnost různých pohlavních hormonů. U samců jsou to androgeny (typicky např. testosteron), zatímco pro vývoj samičích gonád je podstatné, aby došlo k přeměně androgenů na estrogeny pomocí enzymu aromatázy (ovariální izoforma tohoto enzymu je kódována genovým paralogem *cyp19ala*). Při maskulinizaci se přitom uplatňují aromatázové inhibitory, které snižují hladinu aromatázy i u protogynních hermafroditů (Guiguen et al., 2010). Naopak změna pohlaví u protandrických hermafroditů je provázena zvýšenou hladinou estradiolu díky expresi aromatázy (Devlin a Nagahama, 2002; Guiguen et al., 2010). V posledních letech se ukazuje, že hormony mohou u ryb převzít i úlohu ústřední determinanty pohlaví, např. u dvou druhů kranasů rodu *Seriola* (Purcell et al., 2018; Koyama et al., 2019).

Vedle gonochorizmu a hermafroditizmu jsou navíc u ryb známy i taxony množící se klonálně, za vzniku obvykle celo-samičích a často polyploidních populací. V těchto případech se uplatňují unikátní mechanismy jako u gynogeneticky se množících sekavců rodu *Cobitis*,

živorodky křížené *Poecilia formosa*, nebo karase stříbřitého *Carassius gibelio*, či hybridogenetických živoroděnek *Poeciliopsis monacha lucida*, iberie ouklejovité *Squalius alburnoides* anebo u hlaváčů rodu *Hypseleotris* (Janko et al., 2007; Lamatsch a Stöck, 2009; Schmidt et al, 2011).

## 5. Environmentální determinace pohlaví (ESD) u ryb

ESD u ryb je ovlivněna mnoha faktory (Heule et al., 2014), z nichž tím nejběžnějším je teplota vody v kritické fázi vývoje jedince, kdy dochází k přeměně primordiálních gonád na vaječníky nebo varlata (Baroiller et al., 2009). Teplotní determinace (TSD, z angl. temperature sex determination) byla u ryb poprvé pozorována v 80. letech, u menidie kanadské, *Menidia menidia* (Conover a Kynard, 1981) a v současnosti je tento mechanismus znám u desítek dalších rybích druhů (Ospina-Álvarez a Piferrer, 2008). Nejběžnější případ TSD je ten, kdy se za vyšších teplot rodí více samců, jako je tomu např. právě u menidie kanadské anebo u karase obecného, *C. carassius* (Ospina-Álvarez a Piferrer, 2008). Nicméně existují i výjimky, např. u sumečka tečkovaného, *Ictalurus punctatus* (Godwin et al., 2003) anebo platýsů *Paralichthys olivaceus* a *P. lethostigma* (Luckenbach et al., 2009). Je ale obvykle velice těžké odlišit prosté TSD od GSD ovlivněného teplotou (Ospina-Álvarez a Piferrer, 2008). Vliv teploty na pohlaví byl totiž pozorován také např. u medaky japonské, u které byla popsána genetická determinace pohlaví, ale ta je za extrémních teplot modulována a vede k vychýlení pohlaví potomstva ve prospěch samců, stejně jako je tomu v případě gavúnovce argentinského *Odontesthes bonariensis* (Hattori et al., 2007; Yamamoto et al., 2014). Na pohlaví mají ale vliv i jiné abiotické faktory než jen teplota. Patří mezi ně např. pH vody, hustota populace, sociální status, hypoxie anebo barvě pozadí. Podrobnější popis případů přesahuje rozsah této práce, ale je shrnut např. v Baroiller et al. (2009).

## 6. Genetická determinace pohlaví (GSD) u ryb

Genetické určení pohlaví u ryb můžeme dělit na dvě skupiny. Ta první se nazývá polygenní a pohlaví je u ní určené interakcí většího počtu lokusů umístěných odděleně na různých místech v genomu (Moore a Roberts, 2013). U druhé skupiny je pohlaví určeno monogenně, kdy je pohlaví určeno ústředním genem pro determinaci pohlaví, který se nachází na jednom z pohlavních chromozómů.

## 6.1. Polygenní GSD

U platy skvrnité *Xiphophorus maculatus* či laboratorních populací dania pruhovaného *Danio rerio*, můžeme najít hned několik pohlavních chromozómů. U platy jsou to celkem tři: X, Y a W (viz Tab. 2) (Volf a Schartl, 2001) a u laboratorních populací dania čtyři pohlavní chromozómy (zatímco u přírodních populací byl zjištěn systém ZZ/ZW) (Anderson et al., 2012; Wilson et al., 2014). Polygenní systém byl také nalezen u cichlidy *Astatotilapia burtoni*, kde je pohlaví závislé na dvou lokusech, LG 5 a LG 13 (z angl. linkage group) (Roberts et al., 2016). V jiném případě je pohlaví kromě pohlavních chromozómů ovlivněno také autozómy, jako je tomu u živorodky duhové *P. reticulata*, díky čemuž se u této ryby vyskytují samci se sestavou XX a samice s chromozómy XY (Volf a Schartl, 2001).

## 6.2. Monogenní GSD

Prvním objeveným ústředním genem pro určení pohlaví se stal roku 1990 gen *Sry* (z angl. sex-determining region Y) (Sinclair et al., 1990). Trvalo však dalších 10 let, než se podobný úspěch podařilo zopakovat u medaky japonské, *Oryzias latipes*, kde byl objeven další ústřední gen nazývaný *Dmy/Dmrt1by* (dle označení dvou výzkumných týmů, které k objevu genu dospěly ve stejnou dobu), což je transkripční faktor patřící do skupiny *Dmrt1* genů (z angl. doublesex and mab-3 related transcription factor 1) (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002). Jak ale ukázaly výzkumy, gen *Dmy* (z angl. DM-domain gene on the Y chromosome) se u rodu *Oryzias* nachází jen velmi zřídka (Takehana et al., 2007), což ukazovalo na přítomnost různých ústředních genů u ryb. Podle Grahama a kol. (2003) jsou kaskády zodpovědné za determinaci pohlaví napříč druhy značně konzervativní, zatímco dochází k častým změnám na pozici ústředního regulátoru, který celou kaskádu aktivuje, tj. doslova „páni se mění, otroci zůstávají“. Nicméně bylo popsáno (i u ryb), že tento tento model není univerzální (A. Herpin a Schartl, 2015a; Amaury Herpin et al., 2013). Dnes známe u ryb několik skupin genů, které jsou schopné převzít roli „pána“, tedy ústředního genu pro determinaci pohlaví (Tab. 1) (Guiguen et al., 2019).

### ***Sox3***

*Sox3* patří do rodiny *Sox* genů (z angl. sry-related HMB box), které mají funkci transkripčních faktorů a ukázal se být ústředním genem pro určení pohlaví u medaky bengálské, *O. dancena* (Takehana et al., 2014). Do této rodiny patří mj. i gen *Sry*, jehož prekurzorem byl v evoluci právě *Sox3*, či gen *Sox9*, který hraje důležitou roli při vzniku samčích gonád u mnoha druhů (Guiguen et al., 2019). Zároveň se recentně ukazuje, že *Sox2*

by mohl být ústřední determinantou pohlaví u pakambaly *Scophthalmus maximus* (Martínez et al., 2019).

### ***Dmrt1***

Po objevu *Dmy* u medaky japonské (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002) se studie zaměřily na funkce *Dmrt1* genů u různých organizmů a zjistilo se, že ústřední roli pro determinaci pohlaví mají s největší pravděpodobností i u ptáků (Smith et al., 2009), dále u drápatky vodní *Xenopus laevis* (Yoshimoto et al., 2008), medaky *Oryzias curvinotus* (Matsuda et al., 2003) a u jazykovce *Cynoglossus semilaevis* (Chen et al., 2014). *Dmrt1*, který je mj. důležitým faktorem i v rámci teplotní determinace pohlaví u gavúnovce *O. bonariensis* (Fernandino et al., 2008), se podílí na vývoji samčích pohlavních orgánů a spermatogenezi i u celé řady dalších živočichů napříč celou říší, jako např. u octomilek nebo u háďátka (Herpin a Schartl, 2015).

### **TGF- $\beta$**

Superrodina TGF- $\beta$  (z angl. transforming growth factor beta) se v organismu podílí na signalizaci v buňkách. Několik členů z této superrodiny se podílí i na vývoji embrya (Guiguen et al., 2019). Jedním z nich je i růstový faktor ***Amh*** (z angl. anti-Müllerian hormone). U savců je tento hormon zodpovědný za degradaci Müllerova vývodu u samčích embryí, zatímco u jiných obratlovců se *Amh* podílí na tvorbě samčích gonád. Díky genové duplikaci a následné translokaci na Y chromozóm se stal ústředním genem pro určení pohlaví u gavúna *O. hatcheri* (Hattori et al., 2012) i u dalších sedmi z deseti studovaných druhů rodu *Odontesthes* (Hattori et al., 2019) a dále pak u štiky obecné *Esox lucius* (Pan et al., 2019). Mutace v *Amh* navíc může způsobit přeměnu pohlaví ze samce na samici u medaky japonské (Nakamura et al., 2012). Forma receptoru pro *Amh*, tedy gen *Ahr2-Y* se díky své translokaci a bodové mutaci stala ústředním genem u okouna žlutého, *Perca flavescens* (Feron et al., 2019) a u čtverzubců rodu *Takifugu*, konkrétně u *T. rubripes*, *T. poecilonotus* a *T. pardalis*, což značí, že k přeměně *amhr2Y* na ústřední gen došlo u společného předka (Kamiya et al., 2012). Dalším členem této superrodiny je jiný růstový faktor, ***Gsdf*** (z angl. gonadal soma-derived factor), který se vyskytuje jen u ryb a jenž se exprimuje při tvorbě samčích gonád (Guiguen et al., 2019). U dvou rybích druhů, chmurnatky tmavé *Anoplopoma fimbria* a medaky *O. luzonensis* se tento gen stal dokonce ústředním genem pro určení pohlaví (Rondeau et al., 2013; Myosho et al., 2015). Posledním členem je ***Gdf*** (z angl. growth differentiation factor), jehož forma *Gdf9* se u ryb a savců podílí na vývoji samičích gonád. Zjistilo se však, že *Gdf6Y* se díky delecí u

halančíka tyrkysového *Nothobranchius furzeri* stal ústředním genem pro určení pohlaví (Reichwald et al., 2015).

### **SdY**

Zatímco všechny výše popsané geny se objevují opakovaně na různých stupních kaskád pro určení pohlaví, bylo velké překvapení, když se zjistilo, že u mnoha lososovitých ryb je ústředním genem *SdY* (z angl. sexual dimorphic on the Y-chromosome), který je příbuzný s imunitním genem *Irf9* (z angl. interferon regulatory factor) (Yano et al., 2012, Yano et al., 2013). Jedná se u ryb o výjimečný případ, kdy nedošlo k vytvoření pohlavní determinanty z některého genu zahrnutého v signální kaskádě pro pohlavní determinaci, nýbrž došlo k neofunkcionalizaci genu, jehož původní varianta má v organismu zcela jinou úlohu.

### **6.3. Vliv B chromozómů na určení pohlaví**

Další způsob, jak může být pohlaví geneticky ovlivněno, je skrze B chromozómy, což jsou nadbytečné chromozómy, které jsou v organismu udržovány specifickými mechanizmy, a ukazuje se, že mohou mít rozmanitý genetický obsah (Jones et al., 2008). Může se na nich dokonce vyskytovat determinanta, která ovlivňuje pohlaví. U ryb byl takový efekt B chromozómů pozorován např. u tetry drsnoploutvé *Astyanax scabripinnis*, kde samci s B chromozómy vykazují zvýšenou expresi významného regulátoru pohlavní determinace, genu *Dmrt1* (Castro et al., 2018). Další pozoruhodný případ je znám u cichlid obývajících africké jezero Malawi, kde se B chromozóm nachází pouze u samic a jeho přítomnost determinuje samičí pohlaví i u jedinců s pohlavními chromozómy XY a jeho genetický obsah modifikuje (Clark a Kocher, 2019).

Tab. 1 – Ústřední geny determinující pohlaví u ryb a příklady taxonů

Ústřední gen pro určení pohlaví	Příklad druhu	Původní forma genu	Citace
<i>Sox-3Y</i>	<i>O. dancena</i>	<i>Sox</i>	(Takehana et al., 2014)
<i>Dmrt1bY</i>	<i>O. latipes</i>	<i>Dmrt1</i>	(Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002)
<i>AmhY</i>	<i>O. hatcheri</i>	<i>Amh</i>	(Hattori et al., 2012)
<i>Amhr2-Y</i>	<i>T. rubripes</i>	<i>Amhr2</i>	(Kamiya et al., 2012)
<i>Gsdf-Y</i>	<i>A. fimbria</i>	<i>Gsdf</i>	(Rondeau et al., 2013)
<i>Gdf6-Y</i>	<i>N. furzeri</i>	<i>Gdf6</i>	(Reichwald et al., 2015)



<i>SdY</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>SdY</i>	(Yano et al., 2012)
<i>Hsd17b1</i>	<i>S. dosrsalis</i>	<i>Hsd17b1</i>	(Purcell et al., 2018)
<i>Bcar1</i>	<i>I. punctatus</i>	<i>Bcar1</i>	(Bao et al., 2019)
<i>ZkY</i>	<i>G. morhua</i>	<i>Zfand</i>	(Kirubakaran et al., 2019)
<i>Sox2</i>	<i>S. maximus</i>	<i>Sox</i>	(Martínez et al., 2019)

## 7. Pohlavní chromozómy ryb

### 7.1. Systémy chromozómového určení pohlaví u ryb

Pohlavní chromozómy byly nalezeny u asi 5 % karyotypovaných paprskoploutvých ryb (Arai, 2011), přičemž se výhradně jedná o zástupce kostnatých ryb. Nejbližší skupina k paprskoploutvým rybám, kde byly nalezeny pohlavní chromozómy, jsou rejnoci (paryby, Chondrichthyes), kde byly popsány systémy ♀XX/♂X0 (Valentim et al., 2013) a ♀X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/♂X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y (Cruz et al., 2011). Stáří rybích pohlavních chromozómů je řádově menší než u teplokrevných živočichů. Přestože lze najít případy, kdy např. u jazykovce *Cynoglossus* je stáří pohlavních chromozómů odhadované na 30 milionů let (Chen et al., 2014), u zástupců cichlid obývajících africká jezera jsou pohlavní chromozómy vyložené evolučně mladé, v řádu několika milionů let; v rámci zástupců v jezeře Victoria i méně než 300 tisíc let (Gammerdinger a Kocher, 2018).

U kostnatých ryb bylo do dnešního dne objeveno celkem devět systémů chromozómového určení pohlaví. Vedle standardních a nejběžnějších systémů ♀XX/♂XY a ♂ZZ/♀ZW najdeme i systémy odvozené: ♀XX/♂X0, např. u slunečnice zelené *Lepomis cyanellus* a ♂ZZ/♀Z0, např. u jazykovce *C. puncticeps* (Devlin a Nagahama, 2002). Časté jsou u ryb také mnohočetné neopohlavní systémy. Nejběžnějším z nich je systém ♀X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/♂X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y, který se nachází např. u lososa *Oncorhynchus nerka*, který vznikl centrickou fúzí mezi původním Y chromozómem a autozómem (Thorgaard, 1978), což je u ryb (i ostatních studenokrevných obratlovců) nejčastější mechanismus vzniku tohoto systému (Kitano a Peichel, 2012; Pennell et al., 2015a). Dále tento systém může vzniknout i rozpadem X chromozómu, což se ale zatím u ryb neprokázalo. Dosud byl systém ♀X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/♂X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y popsán u více než 30 druhů ryb, mezi něž patří např. trahir červenavý *Erythrinus erythrinus*, u kterého se tento systém vyskytuje nezávisle na sobě hned u třech ze čtyř karyotypových forem (Bertollo et al., 2004). Příbuzný druh, trahir malabarský *Hoplias malabaricus*, rovněž

zahrnuje karyotypovou formu s tímto systémem, jedná se však prokazatelně o nezávislý vznik z jiných párů chromozómů (Cioffi et al., 2017). Celkem šest zástupců anuálních halančíků rodu *Nothobranchius* rovněž má ve svém karyotypu shodně systém  $X_1X_2Y$  (Krysanov a Demidova, 2018), ale jedná se spíše o osamocené případy v různých vývojových liniích a není dosud jasné, jestli tento systém zahrnuje u daných druhů stejné vazebné skupiny. Šestáým typem je neopohlavní systém  $\text{♀}XX/\text{♂}XY_1Y_2$ , který můžeme najít např. u hartié Carvalhovy *Harttia carvalhoi* (Blanco et al., 2013) anebo krunýřovce *Ancistrus* sp. 1 (de Oliveira et al., 2007) a u dosud popsaných případů u ryb jeho vznik zahrnoval buď fúzi X chromozómu s autozómem (většina případů) nebo centromerický rozpad jednoho z původních pohlavních chromozómů, jak se předpokládá zatím výhradně u zmíněné neotropické ryby *Harttia carvalhoi* (Blanco et al., 2013) a rovněž u asijské mřenky *Schistura fasciolata* (Sember et al., 2015), případně se na vzniku těchto pohlavních chromozómů podílelo více přestaveb (de Oliveira et al., 2007). Sedmý typ,  $\text{♂}ZZ/\text{♀}ZW_1W_2$ , se vyskytuje u polozubky lapatské *Apareiodon affinis*, u kterého došlo k centromerickému rozpadu chromozómu W (Moreira-Filho et al., 1993), a dále u ještěrohlovce tupohlavého, *Trachinocephalus myops*, u kterého došlo k fúzi chromozómu Z s autozómem (Ueno et al., 2001). Další systém je  $\text{♂}Z_1Z_1Z_2Z_2/\text{♀}Z_1Z_2W_1W_2$ , který byl popsán zatím výhradně u ryb, a to konkrétně u krunýřovce *Ancistrus* sp. 2, u kterého nejspíš došlo k translokacím a inverzím (de Oliveira et al., 2007) a u leporina *Megaleporinus elongatus* (Parise-Maltempi et al., 2007), u kterého na tento systém upozornila distribuce specifické satelitní DNA, přičemž mechanismus není dosud úplně jasný. Posledním z dosud objevených systémů u ryb je  $\text{♀}X_1X_1X_2X_2/\text{♂}X_1Y_1X_2Y_2$  u širokohlavce nautského, *Bunocephalus coracoideus*, který vznikl tak, že u jedné populace došlo k fúzi dvou chromozómů a následným křížením s původním karyotypem došlo ke vzniku tohoto systému, který se zafixoval pomocí heterochromatinizace (Ferreira et al., 2016).

## 7.2 Pohlavní systémy a přechody mezi nimi

Na jedné straně u ryb můžeme nalézt konzervované systémy s diferenciovanými pohlavními chromozómy, které u příbuzných druhů prokazatelně vznikly ze stejných párů autozómů, tudíž jsou monofyletického původu, např. u rodů *Megaleporinus* (Parise-Maltempi et al., 2013), *Characidium* (Pansonato-Alves et al., 2014), *Parodon* a *Apareiodon* (Schemberger et al., 2011) a především u rodu *Triporthus*, kde zatím všichni studovaní zástupci (11/19) mají ve svém karyotypu systém  $ZZ/ZW$ , který je monofyletického původu,

což je mezi rybami zatím naprostý unikát (Yano et al., 2017). Daleko častější je totiž situace, kdy se pohlavní chromozómy vyskytují náhodně jen u některých zástupců v rámci konkrétní vývojové linie (Mank et al., 2006) a navíc je relativně běžné, že můžeme nalézt odlišné systémy pohlavních chromozómů nejen v rámci rodu, ale i mezi populacemi stejného druhu (viz Tab. 2). Rekordmanem v této diverzitě je dosud trahir malabarský *H. malabaricus*, u kterého se v různých karyotypově jasně definovaných populacích nacházejí dohromady tři různé systémy (Tab. 2). Navíc je pozoruhodné, že se tyto systémy nacházejí zároveň v různých fázích diferenciaci a zatímco některé pohlavní chromozómy jsou ortologní, jiné při svém vzniku zahrnují odlišné chromozómové páry (Cioffi, et al., 2017; de Oliveira et al., 2018; Sember et al., 2018).

K mechanismům přechodu mezi pohlavními chromozómy patří vedle i) vzniku neopohlavních chromozómů také ii) vznik zcela nového ústředního genu pro determinaci pohlaví, který převáží efekt předchozího hlavního regulátoru, nebo iii) transpozice či translokace stávajícího ústředního regulátoru na jiný pár chromozómů (Mank a Avise, 2009; Kitano a Peichel, 2012; Pennell et al., 2015). Předpokladem pro přímý přechod mezi systémy je přítomnost homomorfních pohlavních chromozómů, protože vysoce heteromorfní chromozómy by při zpětném přechodu na autozomální dědičnost způsobily neživotaschopnost genotypů YY a WW (Bachtrog et al., 2014; Vicoso, 2019). Jak se ukázalo např. u tlamouna nilského a *Oreochromis aureus*, jeho ústřední determinanty pohlaví jsou vázány na různé vazebné skupiny (LG, z angl. linkage group), mezi kterými existuje spojení, kde je LG 1 spjata se systémem XX/XY a LG 3 se systémem ZZ/ZW (Cnaani, 2013). Podobně lze vysvětlit i trichromozómový systém platy skvrnitě, *X. maculatus*, kde je samčí gen aktivní jen na Y, ale zároveň na něj negativně epistaticky působí determinanta přítomná na chromozómu W, což má za následek samičí genotyp YW (Kallman, 1984). U koljuškovitých se zjistilo, že došlo k fúzi autozómu s Y chromozómem za vzniku systému  $X_1X_2Y$  jednak v případě koljušky tečkované *Gasterosteus wheatlandi* (Ross et al., 2009) a dále rovněž populace koljušky tříostné, *G. aculeatus*, žijící v Japonském moři, zatímco sympatrická populace toho samého druhu má systém XY. Jedná se o pozoruhodný případ, kde nově vzniklý neo-X chromozóm zřejmě nese geny zodpovědné za změnu fenotypu samců a za změnu v pářících rituálech, což má zřejmě za následek reprodukční izolaci mezi populacemi s odlišným systémem pohlavních chromozómů (Kitano et al., 2009). Případů asociace vzniku neopohlavních chromozómů s reprodukční izolací a adaptací postupně u živočichů vzrůstá (např. Nguyen et al., 2013), ale je třeba dodat, že někdy dojde k fixaci neopohlavního systému

spíše vlivem genetického driftu (např. de Oliveira et al., 2018). Když se ještě vrátíme ke koljuškám: u nich nebylo naopak nalezeno žádné spojení mezi systémem XX/XY koljušky tříostné a systémem ZZ/ZW koljušky čtyřtrnné *Apeltes quadracus*, což nasvědčuje tomu, že se tyto systémy vyvinuly nezávisle na sobě (Ross et al., 2009). Nezávislá evoluce pohlavních systémů byla zjištěna také u sesterských druhů gambusií, konkrétně XX/XY systému gambusie Holbrookovy, *Gambusia holbrooki*, a ZZ/ZW systému gambusie komáří, *G. affinis* (Kottler et al., 2019).

**Tab. 2:** Příklady příbuzenské variability pohlavních chromozómů paprskoploutvých ryb

Řád	Čeleď	Rod	Druh <i>Latinský název</i>	Systém chromozómového určení pohlaví  (v pořadí ♀/♂)	Citace
Ostnoploutví	Vrubozubcovití	<i>Oreochromis</i>	<i>O. niloticus</i>	XX/XY	(Carrasco et al., 1999)
			<i>O. aureus</i>	ZZ/ZW	(Campos-Ramos et al., 2001)
Halančíkovci	Živorodkovití	<i>Xiphophorus</i>	<i>X. maculatus</i>	XX, XW, YW/ XY, YY	(Volff a Schartl, 2001)
			<i>X. alvarezi</i>	ZW/ZZ	(Volff a Schartl, 2001)
			<i>X. cortesi</i>	XX/XY	(Volff a Schartl, 2001)
			<i>X. nezahualcoyotl</i>	XX, XY'/XY, XY'	(Volff a Schartl, 2001)
		<i>Poecilia</i>	<i>P. sphenops</i>	XX, ZW/XY, ZZ	(Haaf a Schmid, 1984)
		<i>Gambusia</i>	<i>G. holbrooki</i>	XX/XY	(R. A. Angus, 1989)
			<i>G. affinis</i>	ZZ/ZW	(Black a Howell, 1979)
Volnoostní	Koljuškovití	<i>Gasterosteus</i>	<i>G. aculeatus</i>	XX/XY	(Ross a Peichel, 2008)
			<i>G. wheatlandi</i>	X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	(Chen a Reisman, 1970)
			<i>Apeltes</i>	<i>A. quadracus</i>	ZZ/ZW
Trnobřiší	Trahirovití	<i>Hoplias</i>	<i>H. malabaricus</i>	XX/XY X <sub>1</sub> X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>2</sub> /X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y XX/XY <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	(Cioffi et al., 2017)

## 8. Studium pohlavních chromozómů u ryb

### 8.1. Význam konvenční cytogenetiky

Jedním z nejtradičnějších přístupů, jak zjistit alespoň přítomnost genetické determinace a zároveň typ heterogamie u ryb (tj. samčí – systémy na bázi XY; samičí – systémy na bázi ZW) je laboratorní experimentální křížení zahrnující jedince, kteří prodělali uměle indukovaný pohlavní zvrát (přidáním hormonů do vody). Determinaci lze odvodit na základě štěpných poměrů v F1 generaci (Devlin a Nagahama, 2002; Penman a Piferrer, 2008). Nicméně tyto experimenty jsou náročné a nelze je provádět z různých důvodů u celé řady rybích druhů. Z čistě cytogenetického hlediska je studium pohlavních chromozómů u ryb ztíženo tím, že - jak se stále častěji ukazuje - řada druhů má homomorfní, tj. cytologicky nerozlišitelné pohlavní chromozómy. Je tedy možné, že řada starších deskriptivních cytogenetických prací, využívající konvenční metody jako je barvení Giemsou, jejich přítomnost nezachytila, protože Giemsovo barvení dokáže rozpoznat jen systémy XX/XY a ZZ/ZW s velkou mírou heteromorfie, mnohočetné pohlavní chromozómy nebo systémy X0 a Z0. Protože je bohužel řada dokumentovaných případů u ryb již staršího data (Arai, 2011), mohlo vlivem tehdejších technologických nedostatků nebo omezeného počtu hodnotitelných metafází dojít k mylné interpretaci pozorovaných dat ve smyslu falešně-pozitivního nálezu heteromorfních pohlavních chromozómů. Nejlépe tuto situaci ilustruje nedávno publikovaný přezkoumaný případ u jiné skupiny studenokrevných obratlovců, u želv rodu *Geoemyda* (Mazzoleni et al., 2019). Podobně jsou známy případy falešně-pozitivní nálezy pohlavních chromozómů, kde došlo k záměně s běžným polymorfizmem v délce heterochromatinového bloku či lokusu NOR, což bylo zjištěno např. u sumcovité ryby *Steindachneridion melanoderdatum* (Matoso et al., 2011). V případě konstitutivního heterochromatinu, jeho výrazné akumulace se vyskytují zejména na W chromozómech některých neotropických ryb a v některých případech činí z těchto chromozómů největší element v karyotypu (příklady viz Scharl et al., 2016), ale méně výrazné heterochromatinové bloky mohou odhalit sekvenční divergenci i na jinak homomorfním páru pohlavních chromozómů, jako např. u živorodky *Poecilia sphenops* (Haaf a Schmid, 1984). U karyotypové formy D trahira *H. malabaricus* pomohlo C-pruhování odhalit mechanismus, jakým vznikl systém  $X_1X_2Y$  (Cioffi a Bertollo, 2010), ale obecně mnohočetné pohlavní chromozómy ryb obvykle neobsahují příliš výrazné bloky heterochromatinu (Cioffi et al., 2012).

## 8.2. Význam analýzy meiotických chromozómů

Potvrdit přítomnost pohlavních chromozómů, zejména s ohledem na výskyt nespárovaných úseků na bivalentu nebo na přítomnost univalentu (u systémů X0 či Z0) či trivalentu (u mnohočetných pohlavních chromozómů) může analýza chromozómů v meiotické profázi I. Příkladem mohou být studie u tilapie *O. aureus* (Campos-Ramos et al., 2001), a u trahira *H. malabaricus* (Bertollo a Mestriner, 1998). Domnělá přítomnost pohlavních chromozómů může být tímto způsobem i vyvrácena (př. Matoso et al., 2011). Analýza meiózy může také pomoci osvětlit mechanismy udržování unikátních reprodukčních strategií jako je gynogeneze (Devlin a Nagahama, 2002). Použitím moderních metod, jako je např. imunodetekce, která využívá protilátek pro vizualizaci proteinů účastnících se párování chromozómů a rekombinace v meióze, je možné získat ještě detailnější informace o diferenciaci pohlavních chromozómů (např. Lisachov et al., 2015). Přínosné se do budoucna zdá být i mapování oblastí, kde na pohlavních chromozómech došlo k metylaci dinukleotidů CpG (Metzger a Schulte, 2018).

## 8.3. Moderní cytogenetické metody

Velký krok kupředu znamenal rozvoj moderních cytogenetických metod, zejména fluorescenční hybridizace *in situ*, FISH (z angl. fluorescence *in situ* hybridization) a metod od ní odvozených. Principem metody je denaturace a následná společná renaturace DNA z různých zdrojů, z nichž jeden představuje chromozómy na preparátu a druhým je specifická sonda, která odpovídá sekvenci našeho zájmu (gen, repetitivní DNA aj.). Sonda nasedne na úseky chromozómů, které obsahují komplementární sekvenci DNA a pomocí fluorescenčního značení její polohu vizualizujeme ve fluorescenčním mikroskopu. Nejčastěji se FISH používá pro analýzu repetitivních sekvencí, protože jejich akumulace na chromozómech lze snadno vizualizovat. Nejčastěji používanými sondami jsou klastry genů pro ribozomální DNA (5S a 45S rDNA) a další tandemově uspořádané multigenové rodiny (např. snDNA a histony); dále telomerické repetice (TTAGGG)<sub>n</sub> a z hlediska analýzy pohlavních chromozómů jsou často mapovány také mikrosatelity a různé druhově specifické satelitní DNA (Cioffi a Bertollo 2012). V případě satelitních DNA (satDNA) je příprava sond nejkomplikovanější, neboť ty mají ze všech typů repetitivní DNA nejrychlejší evoluci (Garrido-Ramos, 2017), a tudíž se obvykle musí pro daný druh identifikovat *de novo*. Původně byly satelitní DNA získávány postupným štěpením genomové DNA různými restrikcími endonukleázami (tj. enzymy, které jsou schopné štěpit palindromické sekvence), ale to bylo příliš pracné a výsledkem byl

obvykle nález jedné nebo několika málo nových satDNA. Nicméně tato pracná metoda pomohla při identifikaci pohlavních chromozómů a k analýze přestaveb, které vedly k diferenciaci W chromozómů u ryb čeledi Parodontidae, včetně možného důkazu pro monofyletický původ u dvou příbuzných rodů (Vicente et al., 2003; Schemberger et al., 2011) nebo k analýze míry diferenciaci chromozómu W u několika druhů neotropického rodu *Megaleporinus* (tehdy ještě *Leporinus*; Marreta et al., 2012). Novým, podstatně efektivnějším a cenově rozumným řešením je celogenomové sekvenování platformou Illumina při nízkém pokrytí genomu a následná bioinformatická analýza hrubých ne-asemblovaných sekvenčních dat skrze program RepeatExplorer. Tento program je schopen vytvořit klastry sekvenovaných úseků na základě podobnosti jejich sekvence (nikoliv na základě pozice v genomu) a vyhodnotit tak na základě množství sekvenčních čtení v daném klastru relativní množství a typ repetitivních sekvencí v daném genomu. Jedná se obvykle o zcela nové, dosud nepopsané repetitivní sekvence, často satelitní DNA a transponovatelné elementy. Následně je možné připravit si sondy pro mapování nově objevených repetitivních sekvencí metodou FISH (Novák et al., 2010). U ryb byl zatím tento postup použit pouze při analýze karyotypu leporina velkohlavého *Megaleporinus macrocephalus*, kde se ukázala akumulace 14 typů satelitních DNA výhradně na W chromozómu (Utsunomia et al., 2019) a při analýze B chromozómů characidie Gomesovy *Ch. gomesi*, u kterých se na základě sekvenční podobnosti zjistilo, že pravděpodobně vznikly z pohlavních chromozómů (Serrano-Freitas et al., 2019).

Systém pohlavních chromozómů ZW u leporinů je velmi vhodným objektem pro mapování repetitivních sekvencí, neboť zde byla rovněž pozorována značná druhově-specifická diverzita v akumulaci různých mikrosatelitů (Poltronieri et al., 2013). Mikrosatelity byly spolu se satelitní DNA a transponovatelnými elementy mapovány také na pohlavních chromozómech zástupců čeledi Parodontidae (Schemberger et al., 2014; Ziemniczak et al., 2014) a rovněž u tetar rodu *Triportheus* (Yano et al., 2016).

Mapování klastrů genů pro rRNA (5S a 45S rDNA) stejně jako telomerického motivu pomohly objasnit mechanismy vzniku pohlavních chromozómů u celé řady ryb (např. Cioffi a Bertollo, 2010; Favarato et al., 2016), i když u řady zejména neo-pohlavních systémů byla zjištěna absence vnitřních telomerických sekvencí i na chromozómech, které zjevně vznikly mechanismem fúze (např. Blanco et al., 2013; Henning et al., 2011; Schemberger et al., 2011; Xu et al., 2019). rDNA byla mj. lokalizována přímo v oblastech specifických pro Y nebo W chromozóm (např. Yano et al., 2017; de Oliveira et al., 2018) a u jinožábrovky *Aulopus japonicus* dokonce 5S rDNA pokrývala celý W chromozóm (Ota et al., 2003). Jsou rovněž

známy případy mezipopulační variability v rámci druhu v akumulaci různých repetitivních sekvencí na pohlavních chromozómech ryb (Devlin a Nagahama, 2002; Xu et al., 2019), stejně jako mezipopulační polymorfizmy ve velikosti nepárového pohlavního chromozómu (např. u živorodek; Nanda et al., 2014). Vedle repetitivních sekvencí lze také mapovat unikátní oblasti genomu, například pokud jsou zaklonovány v bakteriálním umělému chromozómu (BAC, z angl. bacterial artificial chromosome). Tato metoda např. pomohla charakterizovat povahu přestaveb a míru diferenciace pohlavních chromozómů koljušky *Gasterosteus aculeatus* (Ross a Peichel, 2008) anebo evoluci raného pohlavního chromozómu u platýše *Solea senegalensis*, u kterého došlo k Robertsonově translokaci (Rodríguez et al., 2019).

Další varianty FISH využívají celogenomové sondy, konkrétně se jedná o metody GISH (z angl. genomic *in situ* hybridization) a CGH (z angl. comparative genomic hybridization). Z hlediska detekce pohlavních chromozómů, GISH využívá celogenomovou sondu jednoho pohlaví a blokuující DNA druhého pohlaví, jejímž úkolem je vyvázat ze sondy abundantní repetece. Oproti tomu CGH využívá celogenomové sondy obou pohlaví a blokuující DNA jednoho z nich (Traut et al., 1999). Hybridizace takových sond umožní na preparátech identifikovat chromozómové rozdíly mezi oběma pohlavími. Pokud jsou pohlavní chromozómy Y nebo W dostatečně diferencované, dokážou tyto metody zvýraznit oblast specifickou pro nepárový pohlavní chromozóm, tak jako např. u živorodky *P. reticulata* (Traut a Winking, 2001), tetry *T. signatus* (Yano et al., 2017) a některých karyotypových forem trahira *H. malabaricus* (de Oliveira et al., 2018; Sember et al., 2018). Metoda bohužel nezvýrazní málo diferencované pohlavní chromozómy a často mezi nimi jsou neo-pohlavní systémy, u nichž typicky nedochází k výrazným akumulacím heterochromatinu (např. Sember et al., 2018; Xu et al., 2019). Další nevýhodou metody je, že v případě pozitivního nálezu nezjistíme přímo, jaké sekvence se v diferencované oblasti nacházejí.

Další metodou úspěšně používanou pro analýzu vzniku a diferenciace pohlavních chromozómů je WCP (z angl. whole chromosome painting) neboli také Zoo-FISH (při mezidruhové aplikaci), která využívá celochromozómových malovacích sond, které tak umožní vizualizovat vybrané chromozómy v metafázi. Tato metoda pomohla potvrdit společný původ pohlavních chromozómů u ryb rodů *Triporthus* (Yano et al., 2017), *Characidium* (Pansonato-Alves et al., 2014), *Oplegnathus* (Xu et al., 2019) a některých karyotypových forem u *H. malabaricus* (Cioffi et al., 2017), zatímco ukázala nezávislý původ pohlavních chromozómů v rámci blízkých příbuzných druhů nebo rodů (např. Phillips et al., 2001; Henning et al., 2008). Kromě toho byla prokázána homologie pohlavních chromozómů



u minimálně třech zástupců rodu *Megaleporinus*, *M. elongatus*, *M. macrocephalus* a *M. obtusidens*, a ukázalo se, že systém  $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1W_1Z_2W_2$  u *M. elongatus* vznikl ze stejných chromozómů  $ZZ/ZW$ , jaké mají ostatní dva druhy (de Barros et al., 2018). Závěrem, různé populace characidie Gomesovy vykazují jinou morfologii svých chromozómů, ale metoda WCP i v tomto případě potvrdila, že se jedná o ten samý pár chromozómů, u kterého došlo k různě velké akumulaci repetitivních sekvencí (Machado et al., 2011).

V poslední době se také objevila řada nových přístupů, které umožňují odhalit malé rozdíly v sekvencích, čímž se dá odhalit typ heterogamie i přes přítomnost homomorfních chromozómů. Mezi tyto přístupy se řadí RAD-seq (z angl. restriction site-associated DNA sequencing) a příbuzné metody a Pool-seq. Oba přístupy šetří náklady na následné sekvenování sekvencí (opět běžně některou z platforem Illumina) tím, že se tvoří směsné vzorky DNA několika desítek samičích jedinců (v ekvimolárním množství každého jedince) a ty se porovnávají se směsným vzorkem několika desítek samčích jedinců. Důležité je neomylné určení pohlaví u použitých jedinců a pokud možno co nejvíce heterogenní vzorek (ideálně z více populací), neboť výsledná analýza závisí na hledání pohlavně-vázaných SNP (z angl. Single nucleotide polymorphism). Při RAD-seq se genomová DNA štěpí určitou restriční endonukleázou a určité definované velikostní rozmezí fragmentů se sekvenuje. Variabilita závisí na SNP, které vedly k zániku nebo vzniku míst pro štěpení danou restriktázou. Sekvenováním získáme úseky bezprostředně sousedící s restričním místem, takže s větší pravděpodobností osekvenujeme spíše nekódující či repetitivní část genomu, ale někdy se podaří zachytit i fragmenty genů, které v případě vazby na pohlaví mohou být zvažovány z hlediska role pro pohlavní determinaci. Výhodou této metody je, že není potřeba žádný referenční genom (ale jeho dostupnost je velice vítaná). Navíc se sekvenují směsné vzorky, což snižuje cenu za sekvenování. Protože však výsledkem RAD-seq je sekvenace jen malé části genomu, uplatňuje se tato metoda spíše při hrubém určení pohlavního systému (Gamble, 2016). U ryb se tak podařilo zjistit systém ZW u přírodních populací dania pruhovaného (Wilson et al., 2014) nebo characidie Gomesovy (*Utsunomia* et al., 2017), přičemž ve druhém případě byly objeveny i geny, které by mohly mít vztah k pohlavní determinaci. Od této metody je odvozená i metoda ddRAD-seq (z angl. double digest restriction site-associated DNA sequencing), která využívá hned dvou restričních endonukleáz najednou, pro větší variabilitu štěpených úseků. Tato metoda odhalila XY systém např. u okouníků. *Sebastes carnatus* a *S. chrysomelas* a dokonce naznačila, že by u těchto druhů měl být v nerekombinující oblasti Y chromozómu gen *gsdf*, známý jako ústřední

regulátor pohlaví u jiných rybích druhů (viz výše) (Fowler a Buonaccorsi, 2016). Pool-seq na rozdíl od RAD-seq umožňuje osekvenovat při podobném designu směsných vzorků celý genom, čehož už se využilo např. při hledání Y-specifické oblasti u amura bílého, *Ctenopharyngodon idella* (Zhang et al., 2017), štiky obecné *Esox lucius* (Pan et al., 2019) či u barevné formy gambusie Holbrookovy (Kottler et al., 2019).

#### 8.4. Genomické a transkriptomické přístupy

Dalším přístupem, jak zjistit determinantu pohlaví, je analyzovat transkriptomy z vyvíjejících se gonád v časně fázi embryogeneze pomocí RNA-seq, neboť v této fázi nepochybně vzrůstá a postupně se mění hladina exprese genů důležitých pro determinaci pohlaví. Nejprve se musí z dané tkáně vyizolovat RNA, která se pak převede na stabilnější cDNA a ta se opět sekvenuje platformou Illumina. Přístup je ale velmi pracný, neboť aby se zjistil vzor exprese genů v průběhu vývoje gonád, musí se analyzovat transkriptomy vzorků v různých fázích embryogeneze. U ryb byl tento přístup proveden u již několikrát zmiňované tilápe *O. niloticus* (Tao et al., 2018). U živorodky *P. picta* s heteromorfním XY systémem došlo k objevu prvního případu kompenzace dávky genů u ryb, když se zjistilo, že ač má tato ryba degenerovaný Y, na úrovni transkriptomu se samec a samice nijak neliší (Darolti et al., 2019).

Kandidátní geny zjištěné RNA-seq se následně dají testovat pomocí kvantitativní PCR (qPCR). Konkrétně se dá zjistit relativní počet kopií kandidátního genu při analýze samčí vs. samičí DNA a tím se dá zjistit, jestli je daný gen pohlavně-vázaný (např. Nguyen et al., 2013; Rovatsos et al., 2016). U ryb byl tento přístup recentně použit u pakambaly velké *Scophthalmus maximus*, kde se navíc eliminoval rozdíl v expresi genů mezi homogametickým a heterogametickým pohlavím tak, že byly uměle vytvořeny jedinci s ZZ a WW genotypy. Díky tomu se zjistilo, že jediný gen na těchto chromozómech, který se liší mírou exprese, je gen *Sox2*, patřící již do výše zmiňované rodiny *Sox* genů (Martínez et al., 2019).

Sekvenování nepárových pohlavních chromosomů se ukázalo být tvrdým oříškem hlavně ze dvou důvodů. Může za to i) jejich haploidní stav v genomu, kvůli kterému sekvence tohoto chromozómu vždy budou mít poloviční pokrytí oproti zbytku genomu, ii) za to může často značné množství repetitivních sekvencí, které výrazně ztěžují až znemožňují poskládání sekvenačních čtení dohromady. Navíc je v sekvenačních projektech obvykle pro sekvenování homogametické pohlaví. (Tomaszkiewicz et al., 2017). Bao et al. (2019) ve své recentní studii vyřešili problém s poloviční dávkou Y chromozómu elegantně, křížením XY samice

vytvořené pohlavním zvratem s XY samcem a následnou sekvenací YY samců. Dále se dá tato situace vyřešit již výše zmiňovanými metodami na bázi RAD-seq a také používáním jiných sekvenačních strategií, které produkují delší sekvenované úseky, neboť ty se dají potom lépe poskládat. Druhá jmenovaná strategie byla recentně použita úspěšně při sekvenování a charakterizaci dvou pohlavně-specifických úseků u tilapie *O. niloticus* (Conte et al., 2017) a také při první sekvenační analýze rybích mnohočetných pohlavních chromozómů u  $X_1X_2Y$  u smuhovité ryby *Collichthys lucidus* (Cai et al., 2019). Využít se dá také mikrodisekce anebo flow sorting pohlavních chromozómů, díky kterému se dá vyizolovat a následně specificky osekvenovat jen daný chromozóm (Tomaszkiewicz et al., 2017). Zároveň ale i standardně sekvenované genomy již poskytly potřebné údaje o pohlavně-specifických úsecích i charakterizaci ústředních genů pro determinaci pohlaví (Chen et al., 2014; Reichwald et al., 2015; Purcell et al., 2018).

### **8.5. Metody pro ověření funkce ústřední determinanty pohlaví**

Pokud již jsou díky sekvenování zjištěny kandidátní geny, které by mohly mít klíčový význam pro určení a diferenciaci pohlaví, zbývá poslední krok – funkci daného genu ověřit. Dnes se pro tento účel používají hlavně metody editace genů využívající TALEN (z angl. transcription activator-like effector nucleases) a CRISPR/Cas9 (z angl. CRISPR-associated protein 9 nuclease; CRISPR z angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeat), které dokážou vyřadit z provozu konkrétní zvolený gen a pakliže dojde u jedince následně k pohlavnímu zvratu, byl tento gen důležitý pro determinaci pohlaví. Metody TALEN a Cas9 využívají specifické nukleázy, které jsou naváděny k cílové sekvenci pomocí DNA-vazebných proteinů nebo komplementární RNA a umožní v rámci zvolené sekvence vytvořit dvouvláknový zlom. Při následné opravě DNA buňkou může dojít k delecím, které gen vyřadí z provozu (Gao a Draper, 2018). TALEN se takto úspěšně použil u jazykovce *C. semilaevis*, kde vypnutí genu *Dmrt1* způsobilo vývoj samičích pohlavních orgánů u jedinců s pohlavními chromozómy ZZ (Cui et al., 2017). Při vypnutí genu pro aromatázu pomocí TALEN anebo CRISPR/Cas9 u tří různých populací dania pruhovaného došlo k vývoji celosamčího potomstva (Lau et al., 2016). Metoda CRISPR/Cas9 pomohla analogicky ověřit funkci genu *Amhy* u konkrétní populace tilapie *O. niloticus* (Li et al., 2015).

## **9. Závěr**

Paprskoploutvé ryby jsou nejdiferenzovanější taxonomickou skupinou obratlovců, u níž se vyskytuje neuvěřitelně různorodá skupina mechanismů pro determinaci a diferenciaci pohlaví. Znalost těchto mechanismů a jejich výskytu je důležitá z hlediska ekologického i ekonomického. U 5 % cytogeneticky zkoumaných ryb byly objeveny pohlavní chromozómy, které napříč různými vývojovými liniemi zahrnují celkem devět různých systémů, z toho jeden zcela unikátní. Tato rozmanitost se projevuje i v rámci nižších taxonomických celků, např. na úrovni rodu i populací stejného druhu. V této práci jsem se tuto variabilitu pokusil shrnout a zároveň jsem diskutoval možné důvody jejího výskytu. Vzhledem k relativnímu evolučnímu mládí má studium rybích pohlavních chromozómů velký význam hlavně z hlediska obecnějšího porozumění procesům dynamiky a evoluce těchto pozoruhodných komponent genomu u obratlovců, neboť je zde umožněno analyzovat rané fáze jejich evoluce. Poslední část práce se zabývala konkrétními cytogenetickými metodami použitelnými pro výzkum rybích pohlavních chromozómů (tj. zejména s ohledem na proces jejich vzniku a diferenciaci a na mapování příbuznosti pohlavních chromozómů v rámci nižších či větších taxonomických celků) a jsou komentována i jejich úskalí, která do značné míry často souvisí s nepatrnou morfologickou diferenciací rybích pohlavních chromozómů. V tomto ohledu přispěly k výzkumu v poslední dekádě zejména moderní genomické metody a plodná kombinace cytogenetických a genomických metod je tak příslibem do dalších let, kdy je potřeba nejen rozšiřovat počet analyzovaných rybích taxonů, ale také jít více do hloubky a detailněji charakterizovat složení již známých pohlavních chromozómů.

## Seznam literatury

Arai R Fish karyotypes: a check list. 1st ed. Tokyo: Springer Japan; 2011.

Abbott, J. K., Nordén, A. K., & Hansson, B. (2017). Sex chromosome evolution: Historical insights and future perspectives. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1854).

Anderson, J. L., Mari, A. R., Braasch, I., Amores, A., Hohenlohe, P., Batzel, P., & Postlethwait, J. H. (2012). Multiple Sex-Associated Regions and a Putative Sex Chromosome in Zebrafish Revealed by RAD Mapping and Population Genomics. 7(7).

Antonio, L., Bertollo, C., & Mestriner, C. A. (1998). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. *Chromosome Research*, 6, 141–147.

Bachtrog, D. (2013). Y-chromosome evolution: Emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Reviews Genetics*, 14(2), 113–124.

- Bachtrog, D., Kirkpatrick, M., Mank, J. E., McDaniel, S. F., Pires, J. C., Rice, W. R., & Valenzuela, N. (2011). Are all sex chromosomes created equal? *Trends in Genetics*, *27*(9), 350–357.
- Bachtrog, D., Mank, J. E., Peichel, C. L., Kirkpatrick, M., Otto, S. P., Ashman, T. L., Hahn, Matthew W., Kitano, J, Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross, L., Valenzuela, N., Vamosi, J. C. Mank, J. E. Peichel, C. L. Ashman, T. L., Blackmon, H., Goldberg, E. E., Hahn, M. W. Kirkpatrick, M., Kitano, J. Mayrose, I., Ming, R., Pennell, M. W., Perrin, N., Valenzuela, N. & Vamosi, J. C. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biology*, *12*(7), 1–13.
- Bao, L., Tian, C., Liu, S., Zhang, Y., Elawad, A., Yuan, Z., Khalil, K., Sun, F., Yang, Y., Zhou, T., Li, N., Tan, S., Zeng, Q., Liu, Y., Li, Y., Li, Y., Gao, D., Dunham, R., Davis, K., Waldbieser, G. & Liu, Z. (2019). The Y chromosome sequence of the channel catfish suggests novel sex determination mechanisms in teleost fish. *BMC Biology*, *17*(1), 1–16.
- Baroiller, J. F., D’Cotta, H., & Saillant, E. (2009). Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sexual Development*, *3*, 118–135.
- Bergero, R., & Charlesworth, D. (2009). The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends in Ecology and Evolution*, *24*(2), 94–102.
- Bertollo, L. A. C., Oliveira, C., Molina, W. F., Margarido, V. P., Fontes, M. S., Pastori, M. C., Falcão, J. D.N. & Fenocchio, A. S. (2004). Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity*, *93*(2), 228–233.
- Black, D. A., & Howell, W. M. (1979). The North American Mosquitofish, *Gambusia affinis*: A Unique Case in Sex Chromosome Evolution. *Copeia*, *1979*(3), 509–513.
- Blanco, D. R., Vicari, M. R., Lui, R. L., Bertollo, L. A. C., Traldi, J. B., & Moreira-Filho, O. (2013). The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY1Y2 sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *23*(1), 127–134.
- Brykov, V. A. (2014). Mechanisms of Sex Determination in Fish : Evolutionary and Practical Aspects. *Russian Journal of Marine Biology*, *40*(6), 407–417.
- Bull, J. J. *Evolution of Sex Determining Mechanisms* (California/USA, Benjamin/Cummings Publishing, 1983).
- Caetano de Barros, L., Piscor, D., Parise-Maltempi, P. P., & Feldberg, E. (2018). Differentiation and Evolution of the W Chromosome in the Fish Species of *Megaleporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Sexual Development*, (July).

- Cai, M., Zou, Y., Xiao, S., Li, W., Han, Z., Han, F., Xiao, J., Liu, F., & Wang, Z. (2019). Chromosome assembly of *Collichthys lucidus*, a fish of *Sciaenidae* with a multiple sex chromosome system. *Scientific Data*, 6(1), 132.
- Campos-Ramos, R., Harvey, S. C., Masabanda, J. S., Carrasco, L. A. P., Griffin, D. K., McAndrew, B. J., Bromage N.R & Penman, D.J. (2001). Identification of putative sex chromosomes in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, through synaptonemal complex and FISH analysis. *Genetica* 111 143–153.
- Capel, B. (2017). Vertebrate sex determination: Evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nature Reviews Genetics*, 18(11), 675–689.
- Carrasco, L. A. P., Penman, D. J., & Bromage, N. (1999). Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* from synaptonemal complex analysis of XX , XY and YY genotypes. *Aquaculture* 173, 207–218.
- Castro, J. P., Hattori, R. S., Yoshinaga, T. T., Silva, D. M. Z. de A., Foresti, F., Santos, M. H., Almeida, M. C. & Artoni, R. F. (2018). Differential Expression of *dmrt1* in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) Is Correlated with B Chromosome Occurrence . *Zebrafish*, 16(2), 182–188.
- Cavoto, E., Neuenschwander, S., Goudet, J., & Perrin, N. (2018). Sex-antagonistic genes, XY recombination and feminized Y chromosomes. *Journal of Evolutionary Biology*, 31(3), 416–427.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., & Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95(2), 118–128.
- Chen, S., Zhang, G., Shao, C., Huang, Q., Liu, G., Zhang, P., Song, W., An, N., Chalopin, D., Volff, J. N., Hong, Y., Li, Q., Sha, Z., Zhou, H., Xie, M., Yu, Q., Liu, Y., Xiang, H., Wang, N., Wu, K., Yang, C., Zhou, Q., Liao, X., Yang, L., Hu, Q., Zhang, J., Meng, L., Jin, L., Tian, Y., Lian, J., Zhao, Y., Schartl, M., Tang, Q. & Wang, J. (2014). Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 46(3), 253–260.
- Chen, T. R., & Reisman, H. M. (1970). A comparative chromosome study of the North American species of sticklebacks (Teleostei: Gasterosteidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 9(5), 321–332.
- Cioffi, M. B., & Bertollo, L. A. C. (2010). Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity*, 105(6), 554–561.

- Cioffi, M. B., Moreira-Filho, O., Almeida-Toledo, L. F., & Bertollo, L. A. C. (2012). The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: An overview from Neotropical fishes. *Journal of Fish Biology*, *80*(6), 2125–2139.
- Cioffi, M. D. B., Yano, C. F., Sember, A., & Bertollo, L. A. C. (2017). Chromosomal evolution in lower vertebrates: Sex chromosomes in neotropical fishes. *Genes*, *8*(10), 1–14.
- Clark, F. E., & Kocher, T. D. (2019). Changing sex for selfish gain: B chromosomes of Lake Malawi cichlid fish. *Scientific Reports*, *9*(1), 20213.
- Cnaani, A. (2013). The tilapias' chromosomes influencing sex determination. *Cytogenetic and Genome Research*, *141*(2–3), 195–205.
- Conover, D. O., & Kynard, B. E. (1981). Environmental Sex Determination: Interaction of Temperature and Genotype in a Fish. *Science*, *213*, 577–579.
- Conte, M. A., Gammerdinger, W. J., Bartie, K. L., Penman, D. J., & Kocher, T. D. (2017). A high quality assembly of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome reveals the structure of two sex determination regions. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–19.
- Cui, Z., Liu, Y., Wang, W., Wang, Q., Zhang, N., Lin, F., Wang, N., Shao, C., Dong, Z., Li, Y., Yang, Y., Hu, M., Li, H., Gao, F., Wei, Z., Meng, L., Liu, Y., Wei, M., Zhu, Y., Guo, H., Cheng, C. H.K., Schartl, M. & Chen, S. (2017). Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Scientific Reports*, *7*(February), 1–10.
- da Cruz, V. P., Shimabukuro-Dias, C. K., Oliveira, C., & Foresti, F. (2011). Karyotype description and evidence of multiple sex chromosome system X1X1X2X2/X1X2Y in *Potamotrygon aff. Motoro* and *P. Falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the upper paraná river basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, *9*(1), 201–208.
- Darolti, I., Wright, A. E., Sandkam, B. A., Morris, J., Bloch, N. I., Farré, M., Fuller, R. C. Bourne, G. R., Larkin, D. M., Breden, F. & Mank, J. E. (2019). Extreme heterogeneity in sex chromosome differentiation and dosage compensation in livebearers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(38), 19031–19036.
- de Oliveira, R. R., Feldberg, E., Maeda Batista dos Anjos, & Zuanon, J. (2007). Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes : Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica* *134*, 243–249.
- de Souza Valentim, F. C., Porto, J. I. R., Bertollo, L. A. C., Gross, M. C., & Feldberg, E. (2013). XX/XO, a rare sex chromosome system in *Potamotrygon* freshwater stingray from the

- Amazon Basin, Brazil. *Genetica*, 141(7–9), 381–387.
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Review article Sex determination and sex differentiation in fish. *Aquaculture*, 208, 191–364.
- Favarato, R. M., da Silva, M., de Oliveira, R. R., Artoni, R. F., Feldberg, E., & Matoso, D. A. (2016). Cytogenetic Diversity and the Evolutionary Dynamics of rDNA Genes and Telomeric Sequences in the *Ancistrus* Genus (Loricariidae: Ancistrini) . *Zebrafish*, 13(2), 103–111.
- Fernandino, J. I., Hattori, R. S., Shinoda, T., Kimura, H., Strobl-Mazzulla, P. H., Strüssmann, C. A., & Somoza, G. M. (2008). Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sexual Development*, 2(6), 316–324.
- Feron, R., Zahm, M., Cabau, C., Klopp, C., Roques, C., Bouchex, O., Eché, C., Valière, S., Donnadieu, C., Haffray, P., Bestin, A., Morvezen, R., Acloque, H., Euclide, P. T., Wen, M., Jouano, E., Scharl, M., Postlethwait, J. H., Schraidt, C., Christie, M. R., Larson, W., Herpin, A. & Guiguen, Y. (2019). Characterization of a Y-specific duplication / insertion of the anti-Mullerian hormone type II receptor gene based on a chromosome-scale genome assembly of yellow perch, *Perca flavescens*. *BioRxiv*, 1–22.
- Ferreira, M., Garcia, C., Matoso, D. A., de Jesus, I. S., & Feldberg, E. (2016). A new multiple sex chromosome system X1X1X2X2/X1Y1X2Y2 in Siluriformes: cytogenetic characterization of *Bunocephalus coracoideus* (Aspredinidae). *Genetica*, 144(5), 591–599.
- Fowler, B. L. S. & Buonaccorsi, V. P. (2016). Genomic characterization of sex-identification markers in *Sebastes carnatus* and *Sebastes chrysomelas* rockfishes. *Molecular Ecology*, 25(10), 2165–2175.
- Gamble, T. (2016). Using RAD-seq to recognize sex-specific markers and sex chromosome systems. *Molecular Ecology*, 25(10), 2114–2116.
- Gammerding, W. J. & Kocher, T. D. (2018). Unusual Diversity of Sex Chromosomes in African Cichlid Fishes. *Genes*, 9(10), 480.
- Gao, Z.-X. & Draper, B. W. (2018). Gene Knockout and Its Principle and Application in Sex Control of Fish Species. *Sex Control in Aquaculture*, 1, 117–136.
- Garrido-Ramos, M. A. (2017). Satellite DNA: An evolving topic. *Genes*, 8(9).
- Gemmell, N. J., Todd, E. V, Goikoetxea, A., Ortega-recalde, O. & Hore, T. A. (2019). Natural sex change in fish. *Sex Determination* (1st ed.).
- Godwin, J., Luckenbach, J. A. & Borski, R. J. (2003). Ecology meets endocrinology : environmental sex determination in fishes. *Evolution & Development*, 5(1), 40–49.



- Graham, P., Penn, J. K. M. & Schedl, P. (2002). Masters change, slaves remain. *BioEssays*, 25, 1–4.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Herpin, A. & Round, W. (2019). Sex Determination and Differentiation in Fish : Genetic, Genomic, and Endocrine Aspects. *Sex Control in Aquaculture*.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F. & Chang, C. F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 352–366.
- Haaf, T. & Schmid, M. (1984). An early stage of ZW/ZZ sex chromosome differentiation in *Poecilia sphenops var. melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma*, 89(1), 37–41.
- Hattori, R. S., Gould, R. J., Fujioka, T., Saito, T., Kurita, J., Strüssmann, C. A., Yokota, M. & Watanabe, S. (2007). Temperature-Dependent Sex Determination in Hd-rR Medaka *Oryzias latipes*: Gender Sensitivity, Thermal Threshold, Critical Period and *DMRT1*. *Sex Determination*, 1, 138–146.
- Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., Fernandino, J. I., Somoza, G. M., Yokota, M. & Strussmann, C. A. (2012). A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(8), 2955–2959.
- Henning, F., Moysés, C. B., Calcagnotto, D., Meyer, A., & De Almeida-Toledo, L. F. (2011). Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*). *Heredity*, 106(2), 391–400.
- Henning, F., Trifonov, V., Ferguson-Smith, M. A., & De Almeida-Toledo, L. F. (2008). Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 121(1), 55–58.
- Herpin, A., & Schartl, M. (2015). Plasticity of gene-regulatory networks controlling sex determination: of masters, slaves, usual suspects, newcomers, and usurpaters. *EMBO Reports*, 16, 1260–1274.
- Herpin, A., Adolphi, M. C., Nicol, B., Hinzmann, M., Schmidt, C., Klughammer, J., Engel, M., Tanaka, M., Guiguen, Y. & Schartl, M. (2013). Divergent expression regulation of gonad development genes in medaka shows incomplete conservation of the downstream regulatory network of vertebrate sex determination. *Molecular Biology and Evolution*, 30(10), 2328–2346.

- Heule, C., Salzburger, W., & Böhne, A. (2014). Genetics of sexual development: An evolutionary playground for fish. *Genetics*, *196*(3), 579–591.
- Honeycutt, J. L., Deck, C. A., Miller, S. C., Severance, M. E., Atkins, E. B., Luckenbach, J. A., Buckel, J. A., Daniels, H. V., Rice, J. A., Borski, R. J. & Godwin, J. (2019). Warmer waters masculinize wild populations of a fish with temperature-dependent sex determination. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–13.
- Ironside, J. E. (2010). No amicable divorce? Challenging the notion that sexual antagonism drives sex chromosome evolution. *BioEssays*, *32*(8), 718–726.
- Janko, K., Bohlen, J., Lamatsch, D., Flajšhans, M., Epplen, J. T., Ráb, P., Kotlík P. & Šlechtová, V. (2007). The gynogenetic reproduction of diploid and triploid hybrid spined loaches (*Cobitis* : Teleostei), and their ability to establish successful clonal lineages — on the evolution of polyploidy in asexual vertebrates *Genetica*, *131*, 185–194.
- Jones, R. N., González-Sánchez, M., González-García, M., B, M. J. P. & Vega, J. M. (2008). Chromosomes with a life of their own. *Cytogenetic and Genome Research*, *120*, 265–280.
- Kallman, K. D. (1984). A New Look at Sex Determination in Poeciliid Fishes. *Evolutionary Genetics of Fishes*.
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y. & Kikuchi, K. (2012). A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (*Fugu*). *PLoS Genetics*, *8*(7), 815–826.
- Kikuchi, K., & Hamaguchi, S. (2013). Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics*, *242*, 339–353.
- Kirubakaran, T. G., Andersen, Ø., De Rosa, M. C., Andersstuen, T., Hallan, K., Kent, M. P. & Lien, S. (2019). Characterization of a male specific region containing a candidate sex determining gene in Atlantic cod. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–9.
- Kitano, J., & Peichel, C. L. (2012). Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. *Environmental Biology of Fishes*, *94*(3), 549–558.
- Kitano, J., Ross, J. A., Mori, S., Kume, M., Jones, F. C., Chan, Y. F., Absher, Devin M., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R. M., Kingsley, D. M. & Peichel, C. L. (2009). A role for a neo-sex chromosome in stickleback speciation. *Nature*, *461*(7267), 1079–1083.
- Kobayashi, Y., Nagahama, Y., & Nakamura, M. (2013). Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. *Sexual Development*, *7*, 115–125.

- Kottler, V. A., Feron, R., Nanda, I., Klopp, C., Du, K., Kneitz, S., Helmprobst, F., Lamatsch, D. K., Lopez-Roques, C., Lluch, J., Journot, L., Parrinello, H., Guiguen, Y. & Scharl, M. (2019). Independent origin of XY and ZW sex determination mechanisms in mosquitofish sister species. *Genetics*.
- Koyama, T., Nakamoto, M., Morishima, K., Yamashita, R., Yamashita, T., Sasaki, K., Kuruma, Y., Mizuno, N., Suzuki, M., Okada, Y., Ieda, R., Uchino, T., Tasumi, S., Hosoya, S., Uno, S., Koyama, J., Toyoda, A., Kikuchi, K. & Sakamoto, T. (2019). A SNP in a Steroidogenic Enzyme Is Associated with Phenotypic Sex in *Seriola* Fishes. *Current Biology*, 29(11), 1901-1909.e8.
- Krysanov, E. & Demidova, T. (2018). Extensive karyotype variability of African fish genus *Nothobranchius* (Cyprinodontiformes). *Comparative Cytogenetics*, 12(3), 387–402.
- Lamatsch, D. K., & Stöck, M. (2009). Sperm-Dependent Parthenogenesis and Hybridogenesis in Teleost Fishes. In *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*.
- Lau, E. S., Zhang, Z., Qin, M., & Ge, W. (2016). Knockout of Zebrafish Ovarian Aromatase Gene (*cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR / Cas9 Leads to All-male Offspring Due to Failed Ovarian Differentiation. *Nature Publishing Group*, (November), 1–14.
- Li, M., Sun, Y., Zhao, J., Shi, H., Zeng, S., Ye, K., Jiang, D., Zhou, L., Sun, L., Tao, W., Nagahama, Y., Kocher, T. D. & Wang, D. (2015). A Tandem Duplicate of Anti-Müllerian Hormone with a Missense SNP on the Y Chromosome Is Essential for Male Sex Determination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *PLoS Genetics*, 11, 1–23.
- Lisachov, A. P., Zadesenets, K. S., Rubtsov, N. B., & Borodin, P. M. (2015). Sex Chromosome Synapsis and Recombination in Male Guppies. *Zebrafish*, 12(2), 174–180.
- Luckenbach, J. A., Borski, R. J., Daniels, H. V, & Godwin, J. (2009). Sex determination in flatfishes : Mechanisms and environmental influences. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 256–263.
- Machado, T. C., Pansonato-Alves, J. C., Pucci, M. B., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Oliveira, C., Foresti, F., Bertollo, L. A.C., Moreira-Filho, O., Artoni, R. F. & Vicari, M. R. (2011). Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genetics*, 12(1), 65.
- Mank, J. E., & Avise, J. C. (2009). Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. *Sexual Development*, 3(2–3), 60–67.
- Mank, Judith E., Promislow, D. E. L. & Avise, J. C. (2006). Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 87(1),

83–93.

Marreta, M. E., Faldoni, F. L. C. & Parise-Maltempi, P. P. (2012). Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. *Journal of Fish Biology*, 80(3), 630–637.

Martínez, P., Robledo, D., Taboada, X., Blanco, A., Gómez-Tato, A., Álvarez-Blázquez, B., Cabaleiro, S., Piferrer, F., Bouza, C. & Viñas, A. M. (2019). Multiple evidences suggest *sox2* as the main driver of a young and complex sex determining ZW / ZZ system in turbot (*Scophthalmus maximus*). *ResearchGate*, preprint.

Masaru Matsuda, Yoshitaka Nagahama, Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C. E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., Horik, H., Hamaguchi, S. & Sakaizumi, M. (2002). *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559–563.

Matoso, D. A., de Almeida Val, V. M. F., da Silva, M., Moraes-Neto, A., Almeida, M. C., Vicari, M. R., Moreira-Filho, O. Artoni, R. F. (2011). Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodidae): A reappraisal the existence of sex chromosome system in the species. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(3), 497–508.

Matsuda, M., Sato, T., Toyazaki, Y., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2003). *Oryzias curvinotus* Has *DMY*, a Gene That Is Required for Male Development in the Medaka, *O. latipes*. *Zoological Science*, 20(2), 159–161.

Mazzoleni, S., Augstenová, B., Clemente, L., Auer, M., Fritz, U., Praschag, P., Protiva, T., Velenský, P., Kratochvíl, L. & Rovatsos, M. (2019). Turtles of the genera *Geoemyda* and *Pangshura* (Testudines: Geoemydidae) lack differentiated sex chromosomes: the end of a 40-year error cascade for *Pangshura*. *PeerJ*, 7, e6241.

Metzger, D. C. H., & Schulte, P. M. (2018). The DNA methylation landscape of stickleback reveals patterns of sex chromosome evolution and effects of environmental salinity. *Genome Biology and Evolution*, 10(3), 775–785.

Moore, E. C., & Roberts, R. B. (2013). Polygenic sex determination. *Current Biology*, 23(12), 510–512.

Moreira-filho, O., Bertollo, L. A. C. & Pedro M. Galetti Jr. (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ / ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 46:2-3, 115-125.

- Myosho, T., Takehana, Y., Hamaguchi, S. & Sakaizumi, M. (2015). Turnover of Sex Chromosomes in *Celebensis* Group Medaka Fishes. *Genes, Genome, Genetics*, 5(12), 2685–2691.
- Nakamura, S., Watakabe, I., Nishimura, T., Picard, J.-Y., Toyoda, A., Taniguchi, Y., ... Tanaka, M. (2012). Hyperproliferation of mitotically active germ cells due to defective anti-Mullerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. *Development*, 139(13), 2283–2287.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., Schmid, M. & Schartl, M. (2002). A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11778–11783.
- Nanda, Indrajit, Schories, S., Tripathi, N., Dreyer, C., Haaf, T., Schmid, M. & Schartl, M. (2014). Sex chromosome polymorphism in guppies. *Chromosoma*, 123(4), 373–383.
- Nguyen, P., Sýkorová, M., Šichová, J., Kůta, V., Dalíková, M., Frydrychová, Čapková R., Neven, L. G., Sahara, K. & Marec, F. (2013). Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6931–6936.
- Novák, P., Neumann, P., & Macas, J. (2010). Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 11, 1–12.
- Nur, U. (1974). The Expected Changes in the Frequency Alleles Affecting the Sex Ratio. *Theoretical Population Biology*, 5, 143–147.
- Oliveira, E. A. De, Sember, A., Antonio, L., Bertollo, C., Yano, C. F., Ezaz, T., Moreira-filho, O., Hatanaka, T., Pains, H. & Cioffi, M. D. B. (2018). Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes : characterizing the unique XX /XY1Y2 system in *Hoplias malabaricus* ( Teleostei , Characiformes ). *Chromosoma*, 127, 115–128.
- Ospina-Álvarez, N., & Piferrer, F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: Prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS ONE*, 3(7), 1–11.
- Ota, K., Tateno, Y., & Gojobori, T. (2003). Highly differentiated and conserved sex chromosome in fish species (*Aulopus japonicus*: Teleostei, Aulopidae). *Gene*, 317(1–2), 187–193.
- Pan, Q., Feron, R., Yano, A., Guyomard, R., Jouanno, E., Vigouroux, E., Wen, M., Busnel, J. M., Bobe, J., Concordet, J. P., Parrinello, H., Journot, L., Klopp, C., Lluch, J., Roques, C.,

- Postlethwait, J., Schartl, M., Herpin, A. & Guiguen, Y. (2019). Identification of the master sex determining gene in Northern pike (*Esox lucius*) reveals restricted sex chromosome differentiation. *BioRxiv*.
- Pansonato-Alves, J. C., Serrano, É. A., Utsunomia, R., Camacho, J. P. M., Da Costa Silva, G. J., Vicari, M. R., Artoni, Roberto Ferreira & Foresti, F. (2014). Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. *PLoS ONE*, *9*(9), 1–10.
- Parise-Maltempi, P. P., Martins, C., Oliveira, C. & Foresti, F. (2007). Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): New insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetic and Genome Research*, *116*(3), 218–223.
- Parise-Maltempi, Pasquali P., da Silva, E. L., Rens, W., Dearden, F., O'Brien, P. C. M., Trifonov, V., & Ferguson-Smith, M. A. (2013). Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. *BMC Genetics*, *14*, 9–13.
- Penman, D. J., & Piferrer, F. (2008). Fish gonadogenesis. part I: Genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews in Fisheries Science*, *16*(SUPPL.1), 14–32.
- Pennell, M. W., Kirkpatrick, M., Otto, S. P., Vamosi, J. C., Peichel, C. L., Valenzuela, N. & Kitano, J. (2015). Y Fuse? Sex Chromosome Fusions in Fishes and Reptiles. *PLoS Genetics*, *11*(5), 1–17.
- Phillips, R. B., Konkol, N. R., Reed, K. M. & Stein, J. D. (2001). Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica*, *111*(1–3), 119–123.
- Pokorná, M. J. & Kratochvíl, L. (2016). What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates? *Biological Reviews*, *91*(1), 1–12.
- Poltronieri, J., Marquioni, V., Bertollo, L. A. C., Kejnovsky, E., Molina, W. F., Liehr, T. & Cioffi, M. B. (2013). Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (characiformes, anostomidae): Unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, *142*(1), 40–45.
- Purcell, C. M., Seetharam, A. S., Snodgrass, O., Ortega-García, S., Hyde, J. R. & Severin, A. J. (2018). Insights into teleost sex determination from the *Seriola dorsalis* genome assembly. *BMC Genomics*, *19*(1), 1–11.
- Angus, R. A. (1989). Inheritance of melanistic pigmentation in the eastern mosquitofish.

*Journal of Heredity*, 80(5), 387–392.

Reichwald, K., Petzold, A., Koch, P., Downie, B. R., Hartmann, N., Pietsch, S., Baumgart, M., Chalopin, D., Felder, M., Bens, M., Sahm, A., Szafranski, K., Taudien, S., Groth, M., Arisi, I., Weise, A., Bhatt, S. S., Sharma, V., Kraus, J. M., Schmid, F., Priebe, S., Liehr, T., Görlach, M., Than, M. E., Hiller, M., Kestler, H. A., Volff, J. N., Scharl, M., Cellerino, A., Englert, C. & Platzer, M. (2015). Insights into Sex Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish. *Cell*, 163(6), 1527–1538.

Roberts, N. B., Juntti, S. A., Coyle, K. P., Dumont, B. L., Stanley, M. K., Ryan, A. Q., Fernald, R.D. & Roberts, R. B. (2016). Polygenic sex determination in the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *BMC Genomics*, 17(1), 1–13.

Rodríguez, M. E., Molina, B., Merlo, M. A., Arias-Pérez, A., Portela-Bens, S., García-Angulo, A., Cross, I., Liehr, T. & Rebordinos, L. (2019). Evolution of the proto sex-chromosome in *Solea senegalensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20).

Rondeau, E. B., Messmer, A. M., Sanderson, D. S., Jantzen, S. G., von Schalburg, K. R., Minkley, D. R., Leong, J. S., Macdonald, G. M., Davidsen, Amanda E. & Parker, W. A. (2013). Genomics of sablefish (*Anoplopoma fimbria*): expressed genes, mitochondrial phylogeny, linkage map and identification of genetic sex markers. *BMC Genomics*, 14(1), 452.

Ross, J. A. & Peichel, C. L. (2008). Molecular cytogenetic evidence of rearrangements on the Y chromosome of the threespine stickleback fish. *Genetics*, 179(4), 2173–2182.

Ross, J. A., Urton, J. R., Boland, J., Shapiro, M. D. & Peichel, C. L. (2009). Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (Gasterosteidae). *PLoS Genetics*, 5(2).

Rovatsos, M., Vukić, J., & Kratochvíl, L. (2016). Mammalian X homolog acts as sex chromosome in lacertid lizards. *Heredity*, 117(1), 8–13.

Scharl, M., Schmid, M., & Nanda, I. (2016). Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma*, 125(3), 553–571.

Schemberger, M. O., Bellafrente, E., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Schühli, G. S., Artoni, R. F., Moreira-Filho, O. & Vicari, M. R. (2011). Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica*, 139(11–12), 1499–1508.

Schemberger, M. O., Oliveira, J. I. N., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Artoni, R. F., Cestari, M. M., Moreira-Filho, O. & Vicari, M. R. (2014). Construction and Characterization of a Repetitive DNA Library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A Genomic and

Evolutionary Approach to the Degeneration of the W Sex Chromosome. *Zebrafish*, 11(6), 518–527.

Schmidt, D. J. ., Bond, N. R., Adams, M. & Hughes, J. M. (2011). Cytonuclear evidence for hybridogenetic reproduction in natural populations of the Australian carp gudgeon (*Hypseleotris* : Eleotridae). *Molecular Ecology*, 20, 3367–3380.

Sember, A., Bertollo, L. A. C., Ráb, P., Yano, C. F., Hatanaka, T., de Oliveira, E. A., & Cioffi, M. de B. (2018). Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Frontiers in Genetics*, 9(MAR).

Sember, A., Bohlen, J., Šlechtová, V., Altmanová, M., Symonová, R., & Ráb, P. (2015). Karyotype differentiation in 19 species of river loach fishes (Nemacheilidae, Teleostei): Extensive variability associated with rDNA and heterochromatin distribution and its phylogenetic and ecological interpretation. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 1–22.

Serrano-Freitas, É. A., Silva, D. M. Z. A., Ruiz-Ruano, F. J., Utsunomia, R., Araya-Jaime, C., Oliveira, C., Camacho J. P. M. & Foresti, F. (2019). Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. *Molecular Genetics and Genomics*, (October).

Shao, C., Li, Q., Chen, S., Zhang, P., Lian, J., Hu, Q., Sun, B., Jin, L., Liu, S., Wang, Z., Zhao, H., Jin, Z., Liang, Z., Li, Y., Zheng, Q., Zhang, Y., Wang, J. & Zhang, G. (2014). Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish. *Genome Research* 24:604–615

Shen, Z.-G., & Wang, H.-P. (2019). Environmental Sex Determination and Sex Differentiation in Teleosts - How Sex Is Established. *Sex Control in Aquaculture*.

Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M., Hawkins, J., Griffiths, B., MJ, S., Foster, J.W.

Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R. & Goodfellow, P. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346, 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.

Takehana, Y., Matsuda, M., Myosho, T., Suster, M. L., Kawakami, K., Shin-I, T., Kohara, Y., Kuroki, Y., Toyoda, A., Fujiyama, A., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. & Naruse, K. (2014). Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nature Communications*, 5(May), 1–10.



- Takehana, Y., Naruse, K., Hamaguchi, S. & Sakaizumi, M. (2007). Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. *Chromosoma*, 116(5), 463–470.
- Tao, W., Chen, J., Tan, D., Yang, J., Sun, L., Wei, J., Conte, M. A., Kocher, T. D. & Wang, D. (2018). Transcriptome display during tilapia sex determination and differentiation as revealed by RNA-Seq analysis. *BMC Genomics*, 19(1), 1–12.
- Thorgaard, G. H. (1978). Sex Chromosomes in the Sockeye Salmon: a Y-Autosome Fusion. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 20(3), 349–354.
- Tomaszkiewicz, M., Medvedev, P. & Makova, K. D. (2017). Y and W Chromosome Assemblies: Approaches and Discoveries. *Trends in Genetics*, 33(4), 266–282.
- Traut, W. & Winking, H. (2001). Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: Zebrafish, platyfish and guppy. *Chromosome Research*, 9(8), 659–672.
- Traut, W., Sahara, K., Otto, T. D. & Marec, F. (1999). Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma*, 108(3), 173–180.
- Ueno, K., Ota, K., & Kobayashi, T. (2001). Heteromorphic sex chromosomes of lizardfish (Synodontidae): Focus on the ZZ/ZW1W2 system in *Trachinocephalus myops*. *Genetica*, 111(1–3), 133–142.
- Utsunomia, R., Scacchetti, P. C., Hermida, M., Fernández-Cebrián, R., Taboada, X., Fernández, C., Bekaert, M., Mendes, N. J., Robledo, D., Mank, J. E., Taggart, J. B., Oliveira, C., Foresti, F. & Martínez, P. (2017). Evolution and conservation of *Characidium* sex chromosomes. *Heredity*, 119(4), 237–244.
- Valenzuela, N., Literman, R., Neuwald, J. L., Mizoguchi, B., Iverson, J. B., Riley, J. L. & Litzgus, J. D. (2019). Extreme thermal fluctuations from climate change unexpectedly accelerate demographic collapse of vertebrates with temperature-dependent sex determination. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11.
- Vicente, V. E., Bertollo, L. A. C., Valentini, S. R. & Moreira Filho, O. (2003). Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G- And C-banding. *Genetica*, 119(2), 115–120.
- Vicoso, B. (2019). Molecular and evolutionary dynamics of animal sex-chromosome turnover. *Nature Ecology & Evolution*, 3(12), 1632–1641.
- Volff, J., Nanda, I., Schmid, M. & Schartl, M. (2007). Governing Sex Determination in Fish : Regulatory Putsches and Ephemeral. *Sexual Development*, 1, 85–99.
- Volff, J. & Schartl, M. (2001). Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes.

*Genetica*, 111, 101–110.

Wilson, C. A., High, S. K., McCluskey, B. M., Amores, A., Yan, Y. L., Titus, T. A., Anderson, J. L., Batzel, P., Carvan, M. J., Schartl, M. & Postlethwait, J. H. (2014). Wild sex in zebrafish: Loss of the natural sex determinant in domesticated strains. In *Genetics* (Vol. 198).

Xu, D., Sember, A., Zhu, Q., Oliveira, E. A. de, Liehr, T., Al-Rikabi, A. B. H., Xiao, Z., Song, H. & Cioffi, M. (2019). Deciphering the Origin and Evolution of the X1X2Y System in Two Closely-Related *Oplegnathus Species* (Oplegnathidae and Centrarchiformes). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3571.

Yamamoto, Y., Zhang, Y., Sarida, M., Hattori, R. S. & Strüssmann, C. A. (2014). Coexistence of genotypic and temperature-dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *PLoS ONE*, 9(7), 1–8.

Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A. & Guiguen, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22(15), 1423–1428.

Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R. & Guiguen, Y. (2013). The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications*, 6(3), 486–496.

Yano, C. F., Bertollo, L. A. C., Ezaz, T., Trifonov, V., Sember, A., Liehr, T. & Cioffi, M. B. (2017). Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae). *Heredity*, 118(3), 276–283.

Yano, C. F., Bertollo, L. A. C., Liehr, T., Troy, W. P. & Cioffi, M. B. (2016). W Chromosome Dynamics in *Triportheus Species* (Characiformes, Triporthidae): An Ongoing Process Narrated by Repetitive Sequences. *Journal of Heredity*.

Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., Nishida-umehara, C., Matsuda, Y.,

Takamatsu, N., Shiba, T. & Ito, M. (2008). A W-linked DM-domain gene, *DM-W*, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *PNAS* 105(7), 1–6.

Zhang, A., Huang, R., Chen, L., Xiong, L., He, L., Li, Y., Liao, L., Zhu, Z. & Wang, Y. (2017). Computational identification of Y-linked markers and genes in the grass carp genome by using a pool-and-sequence method. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.

Ziemniczak, K., Traldi, J. B., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Artoni, R. F., Moreira-Filho, O., & Vicari, M. R. (2014). In situ localization of (GATA)<sub>n</sub> and (TTAGGG)<sub>n</sub> repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 144(4), 325–332.