

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Zoology

Doktorský studijní program: zoologie
Ph.D. study program: zoology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**Evoluce způsobů určování pohlaví a genomů u šupinatých plazů
(Reptilia: Squamata)**

**Evolution of sex determining mechanisms in squamate reptiles
(Reptilia: Squamata)**

Martina Pokorná

Školitel/Supervisor: Doc. Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Školitel-konzultant/Supervisor-consultant: Prof. Ing. Petr Ráb, DrSc.

Praha, 1. června 2011

Abstrakt

Disertační práce se zabývá evolucí způsobů určování pohlaví a genomů u šupinatých plazů. Jejím základem jsou tři publikované práce a dva rukopisy. Evoluce pohlavně determinačních mechanismů, pohlavních chromosomů a genomů a jejich uspořádání byla studována na širší fylogenetické úrovni všech šupinatých plazů se začleněním dalších linií plazů a také na menší škále jako podrobné srovnání uvnitř vybraných linií. Problematika byla studována klasickými cytogenetickými metodami a metodami molekulární cytogenetiky, zejména s použitím fluorescenční *in situ* hybridizace na různých úrovních. Výsledky byly interpretovány v rámci fylogenetických postupů. Práce přispívá k hlubšímu porozumění principů určování pohlaví a evoluce tohoto fenoménu nejen u šupinatých plazů, ale i u amniotických obratlovců. Na základě výsledků získaných při řešení problematiky je možné konstatovat, že pohlavní chromosomy vznikaly v evoluci v jednotlivých skupinách amniotických obratlovců nezávisle. Tento vznik je v některých případech následován akumulací mikrosatelitových sekvencí na pohlavních chromosomech, jejichž charakter však není společný pro pohlavní chromosomy u různých fylogenetických linií. Uspořádání genomů šupinatých plazů vykazuje značnou míru konzervatismu a chromosomové přestavby mohou být posuzovány jako synapomorfie jednotlivých skupin. Ze srovnání vyplývá, že konzervativní uspořádání genomů je pravděpodobně společným rysem celé skupiny Sauropsida, nejen šupinatých plazů.

Abstract

This Ph.D. thesis is focused on the evolution of sex determining mechanisms and genomes in squamate reptiles. It is based on three published articles and two manuscripts. The evolution of sex determining mechanisms, sex chromosomes and genomes, and their organisation, was studied on a wide phylogenetic scale of the whole group of squamate reptiles and some lineages of other Sauropsids, as well as on the small phylogenetic range as a detailed comparative study inside individual lineages of squamates. This thesis is based upon the use of classical cytogenetic methods, methods of molecular cytogenetic (especially fluorescent *in situ* hybridisation) and the results were analysed using phylogenetic approaches. The results and outputs of this study represent an important contribution to the general knowledge of the principals of sex determination and the evolution of these phenomena not only in squamate reptiles but also in the whole group of amniotes. Using the results obtained during the work on this thesis we can conclude that sex chromosomes evolved in particular lineages of amniotes independently. This origin was in some cases followed by accumulation of microsatellite sequences on sex chromosomes, but their identity is not shared between sex chromosomes of individual lineages across the phylogenetic distribution. Genome organisation indicates that the high degree of conservatism and chromosome rearrangements could be considered as a synapomorphy of individual phylogenetic groups. According to the comparison of the degree of conservatism of genomes it seems that this is the common characteristic of the genomes of the whole group of saoropsids and not only the squamates.

Úvod

Disertační práce se zabývá evolucí pohlavně determinačních mechanismů a s tím spojenou evolucí uspořádání genomů u šupinatých plazů. Obecně u obratlovců rozlišujeme dva základní typy determinace pohlaví. Environmentálně určené pohlaví (ESD; z angl. „environmental sex determination“) v němž to, zda se vyvine ze zygoty samec či samice, není predikováno pohlavně specifickým genotypem zygoty, ale závisí na vnějších podmínkách. Druhým způsobem je genotypicky určené pohlaví (GSD; z angl. „genotypic sex determination“), kde o pohlaví rozhodují pohlaví determinující geny, jenž jsou vázány na pohlavní chromosomy (Ohno 1967, Bull 1983, Valenzuela et al. 2003). Velký zájem byl v literatuře vždy věnován otázkám možného vzájemného přechodu těchto dvou základních stavů (Bull 1983, Valenzuela et al. 2003, Janzen & Phillips 2006). Fylogenetické analýzy, které by relevantnost těchto hypotéz testovaly, vznikají ale jen velmi pomalu. První kapitola disertační práce je tedy věnována právě tomuto tématu. Shromáždili jsme literární údaje o způsobech determinace pohlaví pro více než 400 druhů šupinatých plazů a podrobili je fylogenetické analýze s cílem zjistit, který ze systémů determinace pohlaví je pro šupinaté plazi ancestrální. Zároveň jsme testovali možnosti vzájemných evolučních přechodů studovaných systémů u šupinatých plazů.

V další části práce jsme se zaměřili na testování námi navržené hypotézy o pohlavních chromosomech jako evoluční pasti a hypotézy o tom, že ancestrálním způsobem determinace pohlaví byl pro všechny amniotické obratlovce ZW systém pohlavních chromosomů, kterou navrhla Graves (2009) na základě zjištění, že část pohlavních chromosomů u ptakopyska (*Ornithorhynchus anatinus*) je syntení s pohlavním chromosomem Z kura domácího (*Gallus gallus*; Rens et al. 2007) a zároveň, že pohlavní chromosom kura domácího je syntení s pohlavním chromosomem jednoho druhu gekona (*Gekko hokouensis*; Kawai et al. 2009). Pokud bychom uvažovali jako ancestrální stav determinace pohlaví pro amniotické obratlovce ZW systém pohlavních chromosomů, znamenalo by to, že pohlavní chromosomy vznikly v evoluci ze stejného základu. Podrobili jsme tuto představu testu, kde jsme použili metodu chromosome painting a sondu z ptačího Z chromosomu jsme hybridizovali s metafázemi zástupců všech hlavních linií šupinatých plazů, s cílem odhalit, zda jsou pohlavní chromosomy jednotlivých linií homologické. Naše představa evoluce pohlavně determinačních mechanismů u amniotických obratlovců je pak podrobně popsána ve třetí části práce.

Ve čtvrté části práce jsme se zaměřili na podrobnější cytogenetické vyšetření jedné čeledi šupinatých plazů. Zaměřili jsme se na čeleď Eublepharidae (Gekkota; Squamata),

protože její druhy se liší ve způsobech determinace pohlaví a v počtech chromosomů (Viets et al. 1994, Kratochvíl et al. 2008). Naším cílem bylo podrobně prozkoumat, jakým způsobem mohlo v této skupině docházet k evoluci uspořádání genomu a ke vzniku pohlavních chromosomů u těch druhů, u kterých předpokládáme GSD.

Poslední část disertační práce byla soustředěna na srovnání mikrosatelitové distribuce u pravděpodobně evolučně nově vzniklých heteromorfních nicméně však euchromatických pohlavních chromosomů a pohlavních chromosomů, které přestože jsou homomorfní jsou značně heterochromatinizované. V současné době byla takovému vyšetření podrobena jen velmi malá část obratlovců. Bylo například zjištěno, že u fylogeneticky odvozených hadů došlo k akumulaci GATA mikrosatelitových sekvencí na pohlavním chromosomu W (O'Meally et al. 2010). Přítomnost GATA mikrosatelitových sekvencí byla pozorována i u jiných druhů obratlovců a spekovalo se tedy o tom, že by přítomnost GATA sekvencí mohla být charakteristická pro pohlavní chromosomy (O'Meally et al. 2010). Naším cílem bylo porovnat distribuci mikrosatelitových sekvencí na pohlavních chromosomech a výsledky takto získané začlenit do obecnějšího rámce znalostí týkajících se vzniku a diferenciaci pohlavních chromosomů.

Cíle práce

Cílem disertační práce bylo analyzovat dosavadní znalosti o pohlavně determinačních mechanismech šupinatých plazů za pomoci fylogenetických přístupů. Na základě výsledků takto získaných, vysledovat vhodné kandidátní linie na různé fylogenetické škále, důležité pro podrobnější studii evoluce uspořádání genomu a pohlavně determinačních mechanismů a s použitím vhodných metodických nástrojů klasické a molekulární cytogenetiky získat zcela nová experimentální data, jejichž vyhodnocení a začlenění do širšího rámce literárních údajů by přispělo k hlubšímu porozumění evoluce studovaných fenoménů.

Materiál a metodika

V průběhu řešení disertační práce byly použity metody klasické cytogenetiky zahrnující přípravu tkáňových kultur, přípravu chromosomových preparátů a různé způsoby barvení chromosomů. Dále byla aplikována celá škála metod molekulární cytogenetiky, jako například různé druhy fluorescenční in situ hybridizace, sortování chromosomů na sortovacím průtokovém cytometru, metody chromosome painting, mapování genů nebo hybridizace se sondami specifickými pro určitý úsek genomu. Pro vyhodnocování dat byly využívány

metody fylogenetické analýzy, jako jsou analýzy maximální parsimonie nebo maximum likelihood.

Výsledky a diskuse

První část disertační práce byla zaměřena na shromáždění informací o pohlavně determinačních mechanismech u šupinatých plazů a na jejich fylogenetickou analýzu. Z této analýzy jasně vyplývá, že způsoby determinace pohlaví nejsou v jednotlivých liniích šupinatých plazů natolik variabilní, jaká byla obecná představa. V jednotlivých liniích šupinatých plazů jsme naopak pozorovali značnou uniformitu ve sledovaných znacích. Jediné dvě linie, které jsou opravdu variabilní ve způsobech determinace pohlaví, jsou agamy (Agamidae) a gekoni (Gekkota). Jako ancestrální způsob determinace pohlaví pro šupinaté plazy vyhodnotila naše analýza nevíce parsimoní ESD. Pohlavní chromosomy vznikaly v jednotlivých liniích nezávisle a nezaznamenali jsme ani jednu dobře podpořenou tranzici ve směru od ESD ke GSD. Na základě těchto zjištění jsme navrhli hypotézu, podle které by pohlavní chromosomy mohli plnit funkci jakési evoluční pasti. To by znamenalo, že jakmile jednou pohlavní chromosomy v evoluci vzniknou, není možný návrat zpět k autozomům. Tato představa se poměrně dobře doplňuje s obecným modelem vzniku a diferenciací pohlavních chromosomů (např. Charlesworth 1991).

I přesto, že divergence mezi liniemi vedoucími k recentním ptákům a šupinatým plazům můžeme datovat o přibližně 275 milionů let zpět do minulosti, podařilo se nám hybridizovat sondu z ptačího chromosomu Z na metafáze 28 druhů ze 17 čeledí šupinatých plazů, zahrnujících všechny hlavní fylogenetické linie studované skupiny. Ptáci, na rozdíl od šupinatých plazů mají karyotyp, který je charakteristický výskytem velkého počtu malých chromosomů. Mohli bychom tedy očekávat, že mezi ptáky a šupinatými plazi muselo dojít k celé řadě chromosomových přestaveb. Z našich výsledků však vyplývá, že alespoň část genomu, syntení s ptačím Z chromosomem, je u šupinatých plazů nesmírně konzervativní. Sonda z ptačího Z totiž vždy hybridizovala buď s částí metacentrického chromosomu, nebo s párem akrocentrických chromosomů u šupinatých plazů. U těch druhů, u kterých jsme schopni v karyotypu rozpoznat pohlavní chromosomy, sonda ani v jednom případě s těmito chromosomy nehybridizovala. Naopak u všech těchto druhů vykazovala syntentii s autosomy. Závěrem naší práce je tedy konstatování, že pohlavní chromosomy vznikaly v evoluci šupinatých plazů nezávisle a že hypotéza o ancestrálním ZW způsobu determinace pohlaví pro amniotické obratlovce se ve světle našich výsledků jeví přinejmenším jako méně

parsimonií, ve srovnání s představou ESD jako ancestrálního způsobu určení pohlaví. Podrobněji je tento námi navrhovaný scénář evoluce pohlavně determinačních mechanismů u amniotických obratlovců popsán v teoretické práci tvořící třetí kapitulu disertační práce. Jedním ze závěrů je upozornění, že není možné předvídat minulé či budoucí evoluční události pouze na základě statistické pravděpodobnosti, ale musíme se vždy zaměřit především na ancestrální spojitost sledovaného fenoménu.

V další části práce jsme se soustředili na detailnější popis evoluce uspořádání genomu a pohlavních chromosomů v rámci jedné skupiny šupinatých plazů. Tuto skupinu reprezentovala čeleď Eublepharidae, kde nacházíme variabilitu v počtu a morfologii pohlavních chromosomů, ale také ve způsobech determinace pohlaví. Celkově jsme studovali dvanáct druhů této čeledi, pokrývající všechny dosud popsané rody. Vytvořili jsme základní popis jejich karyotypu a zaměřili jsme se na hledání pohlavních rozdílů v karyotypech. Fylogenetické mapování změn v počtech a morfologii chromosomů naznačuje dlouhou evoluční stázi, kdy karyotyp je sestaven výhradně z akrocentrických chromosomů. Tato stáze je však u některých skupin následována výraznými chromosomovými přestavbami, které představují s největší pravděpodobností apomorfie daných linií. Morfologicky rozlišené pohlavní chromosomy jsme byli schopni detekovat pouze u jednoho druhu (*Coleonyx elegans*) a jedná se o tzv. neopohlavní chromosomy, kde pohlavní chromosom Y vznikl prostřednictvím centrické fúze původního Y chromosomu s autosome. U ostatních GSD druhů jsme nenalezli žádné pohlavně vázané rozdíly v karyotypu a pohlavní chromosomy u těchto druhů jsou s největší pravděpodobností homomorfní. Z našich výsledků vyplývá, že čeleď Eublepharidae představuje nesmírně cenný model pro studium evoluce pohlavně determinačních mechanismů, jelikož zde můžeme nelézt celou škálu způsobů determinace pohlaví, od nepřítomnosti pohlavních chromosomů (ESD), přes pohlavní chromosomy zcela morfologicky nediferencované až po výrazně heteromorfní pohlavní chromosomy.

V poslední části naší práce jsme se zaměřili na detailní porovnání distribuce mikrosatelitových sekvencí mezi dvěma druhy s odlišným charakterem pohlavních chromosomů. Zatímco u jednoho druhu (*Coleonyx elegans*) jsou pohlavní chromosomy sice morfologicky odlišné, zdá se, že nepárový chromosom Y je zcela euchromatizovaný. U druhu *Eremias velox* je naopak homomorfní pohlavní chromosom W značně heterochromatinizovaný. Na pohlavním chromosomu *C. elegans* jsme nepozorovali žádnou specifickou distribuci mikrosatelitových sekvencí, zatímco na W chromosomu *E. velox* je akumulace různých mikrosatelitů výrazně specifická. Některé mikrosatelitové sekvence byly

akumulovány po celé délce pohlavního chromosomu W a některé jen v jeho části. Jiné však na pohlavním chromosomu zcela chyběly, přestože na autozomech byly rovnoměrně rozmístěny. Po srovnání našich výsledků s podobnými studiemi u jiných skupin obratlovců, můžeme uzavřít, že akumulace mikrosatelitových sekvencí není vždy spojena s mírou heteromorfismu pohlavních chromosomů, ale naopak odráží míru heterochromatinizace. Závěrem můžeme také konstatovat, že spíše historická kontingence, než charakter jednotlivých mikrosatelitových sekvencí je významnějším faktorem distribuce těchto sekvencí na pohlavních chromosomech.

Závěry

Disertační práce představuje ucelený soubor pěti studií zabývajících se evolucí uspořádání genomu a evolucí pohlavních chromosomů na různých fylogenetických úrovních šupinatých plazů s použitím rozličných metodologických přístupů. Závěry vyplývající z jednotlivých studií je možné do značné míry zobecnit a usuzovat podle nich na obecné evoluční mechanismy často ne pouze u šupinatých plazů, ale obecněji i u amniotických obratlovců nebo obratlovců. Práce přináší nová experimentální data přispívající k hlubšímu porozumění pochodů spjatých s evolucí pohlavně determinačních mechanismů, diferenciací pohlavních chromosomů a evolucí uspořádání genomů šupinatých plazů.

Použitá literatura

- Bull JJ (1983) *Evolution of sex determining mechanisms*. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company
- Charlesworth B (1991) The evolution of sex chromosomes. *Science* 251:1030-1033
- Graves JAM (2009) Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annu Rev Genet* 42:565-586
- Janzen FJ, Phillips PC (2006) Exploring the evolution of environmental sex determination, especially in reptiles. *J Evolutionary Biol* 19:1775-1784
- Kawai A, Ishijima J, Nishida C, Kosaka A, Ota H, Kohno SI, Matsuda Y (2009) The ZW sex chromosomes of *Gekko hokouensis* (Gekkonidae, Squamata) represent highly conserved homology with those of avian species. *Chromosoma* 118:43-51
- Kratochvíl L, Kubička L, Landová E (2008) Does the mechanism of sex determination constrain the potential for sex manipulation? A test in geckos with contrasting sex-determining systems. *Naturwissenschaften* 95:209-215
- Ohno S. 1967. *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Berlin: Springer-Verlag Berlin

- O'Meally D, Patel HR, Stiglec R, Sarre SD, Geordes A, Graves JAM, Ezaz T (2010) Non-homologous sex chromosomes of birds and snakes share repetitive sequences. *Chromosome Res* 18:787-800
- Rens W, O'Brien PCM, Grützner F, Clarke O, Graphodatskaya D, Tsend-Ayush E, Trifonov VA, Skelton H, Wallis MC, Johnston S, Veyrunes F, Graves JAM, Ferguson-Smith MA (2007) The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. *Genome Biol* 8:R243
- Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ (2003) Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? *Am Nat* 161: 676-683
- Viets BE, Ewert MA, Talent LG, Nelson CE (1994) Sex-determining mechanisms in squamate reptiles. *J Exp Zool* 270:45-56

Introduction

This Ph.D. thesis is focused on the evolution of sex-determining mechanisms and on the evolution of genome organisation in squamate reptiles.

Vertebrates possess two general modes of sex determination. The first type is environmental sex determination (ESD), where sex chromosomes are absent and sex is determined by nongenetic factors. The second type is genotypic sex determination (GSD), where the sex of an individual is dictated by the sex determining genes linked to the sex chromosomes, i.e. by sex-specific differences in genotype (Ohno 1967, Bull 1983, Valenzuela et al. 2003). There is huge interest devoted to questions about the possible evolutionary transitions of those two systems in both directions (Bull 1983, Valenzuela et al. 2003, Janzen & Phillips 2006), however, there are still few phylogenetic analyses testing these possibilities. The first chapter of this thesis is focused on this topic. We collected data about sex-determining mechanisms for more than 400 species of squamate reptiles and employed comparative phylogenetic analyses to reconstruct the evolution of sex determination in Squamata.

In the second part of the thesis we tested our hypothesis as to which sex chromosomes might act as an evolutionary trap, where once they are evolved, sex chromosomes cannot transform back to autosomes. At the same time we tested the following hypothesis about an ancestral amniote ZW sex determining system. Graves (2009) postulated that ZW-like sex chromosomes were the ancestral sex determining system for all amniotes. This hypothesis is based on the finding that sex chromosomes of one gecko species (*Gekko hokouensis*) and the sex chromosome of the chicken (*Gallus gallus*) are syntenic (Kawai et al. 2009) and at the same time, the sex chromosome of the chicken is partly syntenic with several sex chromosomes in the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*; Rens et al. 2007). We tested this hypothesis using the chicken Z chromosome as a probe for chromosome painting with metaphases of those species representing major squamate lineages. Our aim was to find out whether sex chromosomes of those lineages are homologous or evolved independently. This topic represents also the content of the third part of the thesis.

In the next part of the thesis we focused on a detailed cytogenetic study inside one family of squamate reptiles. We studied eyelid geckos (family Eublepharidae) because this group includes both species with temperature-dependent sex determination, and species where genotypic sex determination (GSD) was suggested based on the observation of equal sex ratios at several incubation temperatures (Viets et al. 1994, Kratochvíl et al. 2008). Our aim

was to obtain more detailed information about the evolution of genome organisation and the origin of sex chromosomes inside this group.

The last part of the thesis is based on the comparison of microsatellites distribution in heteromorphic euchromatic sex chromosomes and sex chromosomes which are homomorphic but very heterochromatinized. Currently there is only very limited knowledge about the accumulation of microsatellites on sex chromosomes. Of the studies that have been carried out, it has been discovered that in snakes GATA microsatellites are accumulated on sex chromosomes, which has also been found in other groups of vertebrates (O'Meally et al. 2010). Based on these results it was proposed that GATA accumulation might be specific for sex chromosomes (O'Meally et al. 2010). In this study we wanted to compare the distribution of microsatellite sequences on sex chromosomes and integrate those results into the more general model of sex chromosomes differentiation.

Aims of the thesis

The aim of this thesis was to analyse up-to-date knowledge about sex-determining mechanisms in squamate reptiles using phylogenetic approaches, and then, based on these analyses, to determine the most important lineages on the different phylogenetic scale for the detailed study of the evolution of genome organisation, and the evolution of sex-determining mechanisms. This was done using the principals of classical and molecular cytogenetics. Overall, the aim was to obtain new experimental data, analyse it, and then integrate these results into the current knowledge about the evolution of the studied phenomena.

Material and methods

For the research of the topic of this thesis methods of classical cytogenetics were used including cell cultures preparation, preparation of chromosome suspensions and various techniques of chromosome staining. A number of molecular cytogenetic methods were also applied, especially different kinds of fluorescent in situ hybridisation, chromosome sorting using flow cytometry, methods of chromosome painting and gene mapping. For data analyses phylogenetic approaches such as analyses of maximum parsimony or maximum likelihood were also applied.

Results and discussion

The first part of this thesis was focused on collecting and analysing the data about sex determining mechanisms in squamate reptiles. Our results suggest relative uniformity in sex-determining mechanisms in the majority of the squamate lineages. Well-documented variability is found only in dragon lizards (Agamidae) and geckos (Gekkota). The polarity of the sex-determining mechanisms in outgroups identified ESD as the ancestral mode for Squamata. After extensive review of the literature, we concluded that to date there is no known well-documented transition from GSD to ESD in reptiles, although transitions in the opposite direction are plentiful and well corroborated by cytogenetic evidence. We postulate that the evolution of sex-determining mechanisms in Squamata was probably restricted to the transitions from ancestral ESD to GSD. In other words, transitions were from the absence of sex chromosomes to the emergence of sex chromosomes, which have never disappeared and constitute an evolutionary trap. This evolutionary trap hypothesis could change the understanding of phylogenetic conservatism of sex-determining systems, even though it is in concordance with general model of sex chromosomes differentiation (Charlesworth 1991).

The divergence of lineages leading to extant squamate reptiles (lizards, snakes and amphisbaenians) and birds occurred about 275 million years ago. Birds, unlike squamates, have karyotypes that are typified by the presence of a number of very small chromosomes. Hence, a number of chromosome rearrangements might be expected between bird and squamate genomes. We used chromosome-specific DNA from flow sorted chicken (*Gallus gallus*) Z sex chromosomes as a probe in cross-species hybridization to metaphase spreads of 28 species from 17 families representing most main squamate lineages and single species of crocodiles and turtles. In all but one case, the Z chromosome was conserved intact despite the very ancient divergence of sauropsid lineages. Furthermore, the probe painted an autosomal region in seven species from our sample with characterized sex chromosomes, and this provides evidence against an ancestral avian-like system of sex determination in Squamata. The avian Z chromosome synteny is, therefore, conserved albeit it is not a sex chromosome in these squamate species. The more general conclusion based on our results is that ancestral amniot ZW sex determining mechanisms is at least less parsimonious than ancestral amniot ESD. This scenario of the evolution of sex-determining mechanisms was described in details in the third part of the thesis. Important conclusion is, that we cannot predict past or future evolutionary events based only on their statistical probabilities.

The next part of the thesis was focused on a more detailed description of the evolution of genome organisation and sex chromosomes inside one family of squamate reptiles. This group was represented by the family Eublepharidae where we can find variability in sex-

determining modes and in the number and morphology of chromosomes in this particular species. In this study, we obtained data on karyotypes and chromosomal characteristics in 12 species covering all genera of the family, and searched for the presence of heteromorphic sex chromosomes. Phylogenetic mapping of chromosomal changes showed a long evolutionary stasis of karyotypes with all acrocentric chromosomes followed by numerous chromosomal rearrangements in the ancestors of two lineages. We have found heteromorphic sex chromosomes in only one species, which suggests that sex chromosomes in most GSD species of the eyelid geckos are not morphologically differentiated. The sexual difference in karyotype was detected only in *Coleonyx elegans* which has a multiple sex chromosome system (X_1X_2Y). The metacentric Y chromosome evolved most likely via centric fusion of two acrocentric chromosomes. We conclude that the eyelid geckos exhibit diversity in sex determination ranging from the absence of any sexual differences to heteromorphic sex chromosomes, which makes them an interesting system for exploring the evolutionary origin of sexually dimorphic genomes.

In the last part of our study we focused on the comparison of microsatellite distribution on sex chromosomes between two species of squamate reptiles. We studied the accumulation of microsatellite repeats on sex chromosomes in a lizard with heteromorphic euchromatic sex chromosomes (the gecko *Coleonyx elegans*) and in a lizard with homomorphic sex chromosomes, where the W chromosome is highly heterochromatic (the lacertid *Eremias velox*). Heteromorphic sex chromosomes of *C. elegans* do not show any sign of microsatellite accumulation. On the other hand, certain repetitive sequences are extensively accumulated over the whole length or parts of the W chromosome, while others are notably missing on this heterochromatinized sex chromosome in *E. velox*. We can conclude that the comparison of microsatellite sequences accumulated on sex chromosome in *E. velox* and other eukaryotic organisms suggests that historical contingency, not characteristics of particular sequences, plays a major role in the determination of which microsatellite sequence will be accumulated on sex chromosomes in particular lineages.

Conclusions

The new experimental data obtained by working on this Ph.D. thesis, based on four studies, contributes greatly to the general knowledge of evolution of sex-determining mechanisms and the genome organisation on different scales of phylogeny of squamate reptiles using various methodological approaches. Conclusions from the particular studies included in this thesis may be generalized and used for answering questions about more

general evolutionary mechanisms not only in squamate reptiles but also in amniotes or vertebrates.

References

- Bull JJ (1983) *Evolution of sex determining mechanisms*. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company
- Charlesworth B (1991) The evolution of sex chromosomes. *Science* 251:1030-1033
- Graves JAM (2009) Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annu Rev Genet* 42:565-586
- Janzen FJ, Phillips PC (2006) Exploring the evolution of environmental sex determination, especially in reptiles. *J Evolutionary Biol* 19:1775-1784
- Kawai A, Ishijima J, Nishida C, Kosaka A, Ota H, Kohno SI, Matsuda Y (2009) The ZW sex chromosomes of *Gekko hokouensis* (Gekkonidae, Squamata) represent highly conserved homology with those of avian species. *Chromosoma* 118:43-51
- Kratochvíl L, Kubička L, Landová E (2008) Does the mechanism of sex determination constrain the potential for sex manipulation? A test in geckos with contrasting sex-determining systems. *Naturwissenschaften* 95:209-215
- Ohno S. 1967. *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Berlin: Springer-Verlag Berlin
- O'Meally D, Patel HR, Stiglec R, Sarre SD, Geordes A, Graves JAM, Ezaz T (2010) Non-homologous sex chromosomes of birds and snakes share repetitive sequences. *Chromosome Res* 18:787-800
- Rens W, O'Brien PCM, Grützner F, Clarke O, Graphodatskaya D, Tsend-Ayush E, Trifonov VA, Skelton H, Wallis MC, Johnston S, Veyrunes F, Graves JAM, Ferguson-Smith MA (2007) The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. *Genome Biol* 8:R243
- Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ (2003) Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined? *Am Nat* 161: 676-683
- Viets BE, Ewert MA, Talent LG, Nelson CE (1994) Sex-determining mechanisms in squamate reptiles. *J Exp Zool* 270:45-56

Životopis/Curriculum Vitae:

Narozena/Born: 21. 5. 1981 v Praze, Československo/21 May 1981 in Prague, Czechoslovakia

Vzdělání/Education:

od/since 2007 postgraduální studium, katedra zoologie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta/Ph.D. study, Department of Zoology, Charles University in Prague, Faculty of Science

2002 - 2007 magisterské studium, katedra zoologie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta/MSc. study, Department of Zoology, Charles University in Prague, Faculty of Science

Zaměstnání/Professional experience:

od/since 2010 vědecký pracovník, katedra ekologie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta/researcher, Department of Ecology, Charles University in Prague, Faculty of Science

od/since 2008 vědecký pracovník, Sekce evoluční biologie a genetiky obratlovců, Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd České republiky/researcher at the Department of Vertebrate Evolutionary Biology and Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of the Sciences of the Czech Republic

1999 - 2007 laboratorní technik, Ústav histologie a embryologie, 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze/laboratory assistant at the Department of Histology and Embryology, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Pedagogická činnost/Teaching:

2007 - 2011 účast na praktiku „Zoologie obratlovců“; Katedra Zoologie, Univerzita Karlova v Praze/participation in the course „ Zoology of Vertebrates“; Department of Zoology, Charles University in Prague

Zahraníční stáže/Research fellowships:

- 2010 a/and 2009 Molecular Cytogenetics Laboratory, Centre for Veterinary Science, Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, UK
- 2009 CIBIO – Research Center in Biodiversity and Genetic Resources, Porto –Vairao, Portugal
- 2008 Department Systematics and Evolution, Muséum National d’Histoire Naturelle, Paris, France

Granty/Grants:

- 2009 - 2011 hlavní řešitelka grantového projektu GAUK (Grantová agentura Univerzity Karlovy) č. 94209/*principal investigator of the project GAUK (Grant Agency of Charles University) No. 94209*
- 2009 grantový projekt/*grant project* „Thermal adaptation in ectotherms: Linking life history, physiology, behaviour and genetics“ spravovaný/*provided by* European Science Foundation
- 2008 grantový projekt/*grant project* „Synthesys“ spravovaný Evropskou unií/*provided by European Union*
- 2006 - 2008 hlavní řešitelka grantového projektu GAUK (Grantová agentura Univerzity Karlovy) 130/2006/B-BIO/PrF/*principal investigator of project GAUK (Grant Agency of Charles University) 130/2006/B-BIO/PrF*

Publikace/Publications:

Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Kasai F, Trifonov VA, O'Brien PCM, Caputo V, Olmo E, Ferguson-Smith MA, Rens W. Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 My divergence. *Chromosoma*, in press (DOI 10.1007/s00412-011-0322-0)

Pokorná M, Rábová M, Ráb P, Ferguson-Smith MA, Rens W, Kratochvíl L (2010) Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination. *Chromosome Research* 18:809-820

Pokorná M, Kratochvíl L (2009) Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: Are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zoological Journal of the Linnean Society* 156:168-183

Rukopisy/Manuscripts:

Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stage of heteromorphism and heterochromatinization in lizards (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*)

Pokorná M, Kratochvíl L, Rens W. Can we predict emergence of a key evolutionary novelty? Reconstruction of ancestral sex-determining mechanism in Amniote vertebrates questions predictions for extinct marine reptiles

Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Caputo V, Olmo E, Ferguson-Smith MA, Rens W. Conservation of chromosomes syntenic with avian autosomes in squamate reptiles revealed by comparative chromosome painting

Vybrané konferenční příspěvky/Selected conference presentations:

Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Caputo V, Ferguson-Smith MA, Rens W (2010) Comparative painting reveals strong conservation between bird sex chromosomes and chromosomes in several lizard families. *19th International Colloquium on Animal Cytogenetics and Gene Mapping, Krakow, Poland* (oral presentation)

Pokorná M, Kratochvíl L (2009) Evolution of sex-determining systems in squamate reptiles: macroevolutionary pattern and a case study in eye-lid geckos (Gekkota: Eublepharidae). *Workshop - The evolution of sex determination systems, La Sage, Switzerland* (oral presentation)

Pokorná M, Kratochvíl L, Rábová M (2008) Searching for sex chromosomes in eye-lid geckos (Squamata: Eublepharidae), a group with contrasting sex-determining systems. I. Karyotypes of TSD versus GSD species. *XX. International Congress of Genetics, Berlin, Germany* (poster presentation)

Pokorná M, Golinski A, Kratochvíl L, John-Alder H (2008) Are sexually dimorphic traits controlled differently in animals with and without sexual differences in genotype? Test in two closely related gecko species. *12th Congress of the International Society for Behavioral Ecology, Ithaca, USA* (poster presentation)

Pokorná M, Kratochvíl L, Rábová M (2007) Searching for sex chromosomes in eye-lid geckos (Squamata: Eublepharidae), a group with contrasting sex-determining systems. I. Conventional karyotypes of TSD and GSD species. *The 11th congress of the European Society for Evolutionary Biology at Uppsala University in Sweden* (poster presentation)