

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

Studijní program: Ekologie



**Mgr. Marie Altmanová**

Evolve pohlavních chromozomů a karyotypů u leguánů (Squamata: Pleurodonta)

Evolution of sex chromosomes and karyotypes in iguanas (Squamata: Pleurodonta)

Disertační práce

Vedoucí práce/Školitel: prof. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Martina Johnson Pokorná, Ph.D.

Praha, 2017



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Mé zapojení do výzkumu prezentovaného v této práci je vyjádřeno pořadím autorství v zahrnutých publikacích a rukopisech.

**V Praze, 27. července 2017**

.....

Mgr. Marie Altmanová

## PODÍL AUTORA NA VÝSLEDKÁCH ZAŘAZENÝCH DO DISERTACE

**Publikace I:** Rovatsos M, **Altmanová M**, Pokorná M, Kratochvíl L (2014) Conserved sex chromosomes across adaptively radiated *Anolis* lizards. *Evolution* 68:2079–2085.

*Korespondující autor: Lukáš Kratochvíl*

**IF**<sub>2014</sub>: 4,612

**Příspěvek autorky:** Spolupráce při odběru/získání vzorků, rešerše dat o pohlavních chromosomech anolisů, příprava obrazové části rukopisu, spolupodílení se na přípravě rukopisu, péče o experimentální zvířata

**Publikace II:** Rovatsos M, Pokorná M, **Altmanová M**, Kratochvíl L (2014) Cretaceous park of sex determination: Sex chromosomes are conserved across iguanas. *Biology Letters* 10:20131093–20131093.

*Korespondující autor: Lukáš Kratochvíl*

**IF**<sub>2014</sub>: 3,248

**Příspěvek autorky:** Spolupráce při odběru/získání vzorků, příprava obrazové části rukopisu, spolupodílení se na přípravě rukopisu, péče o experimentální zvířata

**Rukopis III:** **Altmanová Marie**, Rovatsos Michail, Johnson Pokorná Martina, Veselý Milan, Wagner Florian, Lukáš Kratochvíl. Sex chromosomes in iguanas (Squamata: Pleurodonta): All but basilisks the same. (submitovaný rukopis)

*Korespondující autor: Lukáš Kratochvíl*

**Příspěvek autorky:** Spolupráce s chovateli (v ČR a v Německu) za účelem získání vzorků vzácných druhů, izolace DNA, PCR test funkčnosti primerů pro následnou qPCR analýzu, kultivace leukocytů a příprava chromosomálního preparátu druhu *Polychrus peruvianus*, obrazové zpracování karyotypu, příprava obrazové části rukopisu, první draft a finalizace rukopisu

**Publikace IV:** Pokorná M, **Altmanová M**, Kratochvíl L (2014) Multiple sex chromosomes in the light of female meiotic drive in amniote vertebrates. *Chromosome Research* 22:35–44.

*Korespondující autoři: Martina Pokorná a Lukáš Kratochvíl*

**IF**<sub>2014</sub>: 2,608

**Příspěvek autorky:** Spolupráce při rešerši dat o mnohačetných pohlavních chromosomech v rámci amniot (zejména u leguánů), spolupodílení se na přípravě rukopisu

**Publikace V:** Altmanová M, Rovatsos M, Kratochvíl L, Johnson Pokorná M (2016) Minute Y chromosomes and karyotype evolution in Madagascan iguanas (Squamata: Iguania: Opluridae). *Biological Journal of the Linnean Society* 118:618–633.

*Korespondující autor: Lukáš Kratochvíl*

IF<sub>2016</sub>: 2,288

**Příspěvek autorky:** Odběr vzorků, kultivace leukocytů a příprava chromosomálních preparátů, metody základní cytogenetiky, příprava a aplikace sond pro FISH a CGH, obrazová analýza, izolace DNA, spolupráce na barcodingu, příprava obrazové části rukopisu, první draft rukopisu a finalizace rukopisu, péče o experimentální zvířata

**Publikace VI:** Rovatsos M, Kratochvíl L, Altmanová M, Johnson Pokorná M (2015) Interstitial telomeric motifs in squamate reptiles: When the exceptions outnumber the rule. *PLoS One* 10:e0134985.

*Korespondující autor: Lukáš Kratochvíl*

IF<sub>2015</sub>: 3,057

**Příspěvek autorky:** Spolupráce při kultivaci leukocytů, přípravě chromosomálních preparátů a telomerické FISH vybraných druhů, spolupodílení se na přípravě rukopisu

**Ancestrální analýza typu determinace pohlaví a karyotypu u leguánů:** část dat do prvoautorské publikace (v přípravě)

**Příspěvek autorky:** Rozsáhlá rešerše dostupných dat o karyotypu a pohlavních chromosomech, doplněná o nově získané a dosud nepublikované karyotypy osmi druhů (péče o experimentální zvířata, odběr vzorků, kultivace leukocytů a příprava chromosomálních preparátů, sestavení karyotypu), analýzy a zpracování dat, příprava obrazové dokumentace a rukopisu

**Prohlašujeme, že příspěvky Marie Altmanové k jednotlivým rukopisům, jak jsou zde uvedeny, jsou pravdivé a míru jejího zapojení do výzkumu odráží taktéž pořadí autorů.**

V Praze 27. července 2017

Školitel: prof. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Školitel-konzultant: RNDr. Martina Johnson Pokorná, Ph.D.



## **Poděkování**

Přestože disertační práce nese jméno pouze jednoho autora, vznikla i díky mnoha dalším lidem. Proto bych chtěla těmto všem velmi poděkovat za jejich spolupráci, pomoc, podporu a společně strávený čas. Za fakultní (širší) tým jsou to zejména Lukáš Kratochvíl, Martina Johnson Pokorná, Michail Rovatsos, Klára Farkačová, Jenda Ehl a Nikola Šimková, Bára Augstenová, Sofia Mazzoleni, Lukáš Kubička, Tereza Schořálková, Zuzka Starostová, Jasna Vukić, Martina Gregorovičová, Martina Koubová, Petr Rauner, Lenka Krejčířiková a Jana Vokurková. Druhý domov na AV v Liběchově – laboratoř genetiky ryb: Petr Ráb, Šárka Pelikánová, Petra Šejnohová, Janička Čechová, Saša Sember, Zuzka Majtánová, Maruška Doležálková. A mým nejbližším, neboť ačkoliv (nebo právě protože?) tušili nejmíň, podpořili mě nejvíc. A Honzovi, který věděl vše a nezbláznil se z toho :)

Na závěr bych chtěla poděkovat všem "mým" ještěřům z fakultních chovů za sedm let neustálého úžasu nad jejich dokonalostí.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy – projekty č. 591712 a č. 1012216; a Grantové agentury České republiky – projekty č. 506/10/0718 a č. 17-22141Y.

## ABSTRAKT

Disertační práce je souborem pěti publikovaných původních prací a jednoho rukopisu a je zaměřena na evoluci pohlavních chromosomů a karyotypu leguánů (Pleurodonta). Na základě primární rešerše dostupných dat byla u leguánů zjištěna pouze samčí heterogamie (XX/XY) s ancestrálním karyotypem  $2n = 36$  chromosomů. U řady vyšetřených druhů však nebyly základními cytogenetickými metodami pohlavní chromosomy odhaleny pravděpodobně z důvodu jejich homomorfie. Částečně známý obsah pohlavního chromosomu X druhu *Anolis carolinensis* umožnil porovnání relativní genové dávky X-specifických genů mezi samcem a samicí u zástupců všech leguáních čeledí, čímž byly odhaleny homologické a dobře diferencované pohlavní chromosomy napříč všemi leguány s výjimkou bazilišků. Vzhledem ke srovnatelnému stáří s pohlavními chromosomy savců a ptáků, zpochybňují výsledky význam endotermie pro vznik stabilních pohlavních chromosomů. Nápadným znakem leguánů je v karyotypu poměrně častý výskyt mnohočetných pohlavních chromosomů. Analýzou ancestrálního stavu typu pohlavních chromosomů bylo zjištěno, že se tyto mnohočetné pohlavní chromosomy vyvinuly minimálně dvanáctkrát nezávisle a některé z těchto vzniků mohou být asociované s dalšími přestavbami v karyotypu. Jelikož u ptáků (ZZ/ZW) nebyl dosud zaznamenán jediný výskyt mnohočetných pohlavních chromosomů, je v práci diskutován a statisticky prověřen možný vliv typu heterogamie na vznik těchto odvozených pohlavních chromosomů a jejich fixaci v karyotypu amniotických obratlovců. Detailním molekulárně cytogenetickým vyšetřením madagaskarských leguánů z čeledi Opluridae bylo zjištěno, že i přes geografickou vzdálenost sdílí tato čeleď většinu cytogenetických znaků s novosvětskými leguány. Současně charakter Y chromosomu čeledi poukázal na možné limity komparativní genomové hybridizace, metody běžně používané k cytogenetické detekci pohlavních chromosomů. Prověření karyotypu zástupců 17 čeledí šupinatých plazů na přítomnost intersticiálních telomerických sekvencí v karyotypu a porovnání s již dostupnými údaji odhalilo jejich častý výskyt a vzhledem k poměrně konzervativnímu uspořádání karyotypu v této skupině naznačilo možné kryptické přestavby chromosomů nebo šíření telomerických sekvencí v genomech v důsledku působení mobilních elementů. Zahrnuté publikace rozšířily studovanou problematiku o experimentální i teoretické výstupy a umožnily posouzení obecné platnosti hypotéz o evoluci pohlavních chromosomů a základního uspořádání genomu v širším kontextu.



## ABSTRACT

This PhD thesis is composed of five published articles and one manuscript, and is focused on the evolution of the sex chromosomes and karyotype of the iguanas (Pleurodonta). Based on our primary research of available data, only male heterogamety (XX/XY) with ancestral karyotype  $2n = 36$  chromosomes was recorded in iguanas. However, in many species sex chromosomes have not been uncovered by classical cytogenetics, probably due to their homomorphy. The partially-known X chromosome content of *Anolis carolinensis* allowed us to compare the relative gene doses of X-specific genes between male and female of representatives of all iguana families, and to reveal homologous and well-differentiated sex chromosomes across all iguanas, with the exception of basilisks. Thus, due to the comparable age with sex chromosomes of mammals and birds, the results put into question the importance of endothermy for the formation of stable sex chromosomes. The striking feature of the iguanas is the relatively frequent occurrence of multiple sex chromosomes in their karyotypes. Using the ancestral state analysis of the type of sex chromosomes, it has been found that these multiple sex chromosomes developed at least twelve times independently, and some of these origins are probably associated with other karyotype rearrangements. In comparison, in birds (ZZ/ZW) there is no single occurrence of this derived type of sex chromosome. Therefore the possible influence of the heterogamety on evolution of this type of sex chromosome and their fixation in the karyotype of amniotic vertebrates is discussed in this thesis and supported by statistics. A deep molecular cytogenetic examination of the Madagascan iguanas (Opluridae), revealed that despite the geographical distance, this family shares most of the cytogenetic traits with the New-World iguanas. Additionally in this family, the nature of the Y chromosome indicated the possible limitations of comparative genomic hybridization, the technique commonly used for detection of sex chromosomes. Our examination of the representatives of 17 families of squamate reptiles for the presence of interstitial telomeric sequences (ITS) in the karyotype and comparison with already available data revealed frequent occurrence of ITS in this group. Due to the relatively conserved karyotype in this group, this suggests possible cryptic chromosomal rearrangements or telomere sequence distribution in genomes through the activity of mobile elements. The publications included in this thesis develop the studied subjects by experimental and theoretical outcomes, helping to assess the general validity of hypotheses about the evolution of sex chromosomes and the basic genome organization even in the broader context.



# OBSAH

## ABSTRAKT

## ABSTRACT

ÚVOD ..... 12

PUBLIKACE I ..... 43

**Conserved sex chromosomes across adaptively radiated *Anolis* lizards.**

Michail Rovatsos, Marie Altmanová, Martina Pokorná,  
Lukáš Kratochvíl  
*Evolution* (2014) 68:2079–2085

PUBLIKACE II ..... 59

**Cretaceous park of sex determination: Sex chromosomes are conserved across iguanas.**

Michail Rovatsos, Martina Pokorná, Marie Altmanová,  
Lukáš Kratochvíl  
*Biology Letters* (2014) 10:20131093

PUBLIKACE III ..... 69

**Sex chromosomes in iguanas (Squamata: Pleurodonta): All but basilisks the same.**

Marie Altmanová, Michail Rovatsos, Johnson Pokorná,  
Milan Veselý, Florian Wagner, Lukáš Kratochvíl  
*Rukopis*

PUBLIKACE IV ..... 87

**Multiple sex chromosomes in the light of female meiotic drive in amniote vertebrates.**

Martina Pokorná, Marie Altmanová, Lukáš Kratochvíl  
*Chromosome Research* (2014) 22:35–44

PUBLIKACE V ..... 99

**Minute Y chromosomes and karyotype evolution in Madagascan iguanas (Squamata: Iguania: Opluridae).**

Marie Altmanová, Michail Rovatsos, Lukáš Kratochvíl,  
Martina Johnson Pokorná  
*Biological Journal of the Linnean Society* (2016) 118: 618–633

PUBLIKACE VI ..... 121

**Interstitial telomeric motifs in squamate reptiles: When the exceptions outnumber the rule.**

Michail Rovatsos, Lukáš Kratochvíl, Marie Altmanová,  
Martina Johnson Pokorná  
*PLoS One* (2015) 10: e0134985

ZÁVĚR ..... 137

## ÚVOD

Způsob určení pohlaví a uspořádání genomu patří mezi základní charakteristiky všech obratlovců a zásadně ovlivňují biologické vlastnosti nejen na úrovni jedince či populace, ale i celých evolučních linií. Předkládaná disertační práce se věnuje těmto fenoménům v rámci monofyletické skupiny šupinatých ještěřů – leguánů *sensu lato* (Pleurodonta). Leguáni jsou pro tyto studie ideální skupinou, neboť jsou fylogeneticky vzdáleni od tradičních savců a ptačích modelových organismů. Současně byla u jednoho zástupce, anolise rudohrdlého (*Anolis carolinensis*), přečtena a anotována celogenomová sekvence (Alföldi et al. 2011). Ke studiu způsobu determinace pohlaví a karyotypu leguánů byly použity metody klasické a molekulární cytogenetiky kombinované s dalšími molekulárně biologickými technikami. Dále byly aplikovány fylogenetické přístupy umožňující navržení evolučních scénářů, zejména v případě rozsáhlých srovnávacích analýz. Primárním cílem disertační práce bylo přinést nové poznatky o pohlavních chromosomech a uspořádání genomu leguánů, konfrontovat je s dosavadními znalostmi této problematiky nejen v rámci zmiňované skupiny, ale i v kontextu známých údajů u dalších skupin obratlovců a následně diskutovat současné hypotézy o evoluci obou těchto charakteristik.

Napříč živočišnou i rostlinnou říší se vyvinuly rozličné mechanismy určení pohlaví. Podle toho, zda jsou za determinaci pohlaví jedince zodpovědné vnější podmínky nebo genetická informace, rozlišujeme tzv. environmentálně určené pohlaví (ESD; z angl. *environmental sex determination*) a genotypově určené pohlaví (GSD; z angl. *genotypic sex determination*). ESD je možné chápat jako optimalizaci pohlavně specifického fenotypu v určitých podmínkách okolního prostředí. U plazů s ESD je pohlaví určeno teplotou během inkubace. Ve vysokých teplotách se u některých skupin plazů líhnou téměř výhradně samci, u jiných samice, nicméně např. u kajmanky dravé (*Chelydra serpentina*) se samice líhnou ve vysokých a nízkých teplotách a samci ve středních (Bull 1980, Schoemaker et al. 2009). U ESD se na molekulární úrovni uplatňují různé epigenetické mechanismy, zatímco genotyp je u obou pohlaví shodný. Oproti tomu u druhů s GSD se samec od samice vždy genotypě liší a o pohlaví je tedy rozhodnuto už v momentě oplození vajíčka. Pohlaví určující faktor může působit na základě jeho dominance, například gen *Sry* vázaný na Y chromosom zajišťující ontogenezi samčího fenotypu u savců, nebo prostřednictvím rozdílného počtu kopií genu mezi pohlavími jako v případě kandidátního pohlaví determinujícího genu *DMRT1* vázaného na Z chromosom ptáků (shrnutí ve Ferguson-Smith [2006]).

GSD je spojeno se vznikem pohlavních chromosomů. Podle obecně uznávané hypotézy se pohlavní chromosomy nejčastěji vyvíjejí z páru autosomů vznikem genu určujícího pohlaví na jednom chromosomu z páru (Ohno 1967). Následně v blízkosti tohoto genu dochází k akumulaci pohlavně antagonistických alel (Rice 1984). Uvažujeme-li samčí heterogamii, je potřeba v tomto počátečním stádiu pohlavních chromosomů zamezit rekombinaci mezi X a Y pohlavně specifickou oblastí samců, nejčastěji inverzí celého úseku, a předejít tak vzniku pohlavních hybridů a pohlavních revertantů (Charlesworth 1996). Bez opravy podle vzoru na chromosomu X je nerekombinující část chromosomu Y vystavena škodlivým mutacím, akumulaci repetitivních sekvencí a invazi transponovatelných elementů (Ezaz a Deakin 2014, Hobza et al. 2015, Chalopin et al. 2015). Výsledkem je postupující pseudogenizace a potřeba nefunkční geny spolu s parazitickými elementy umlčet nejčastěji heterochromatinizací, anebo je z genomu trvale odstranit rozsáhlými delecemi (shrnutí v Bachtrog 2013). V některých případech (pokročilá stádia degenerace Y chromosomu,

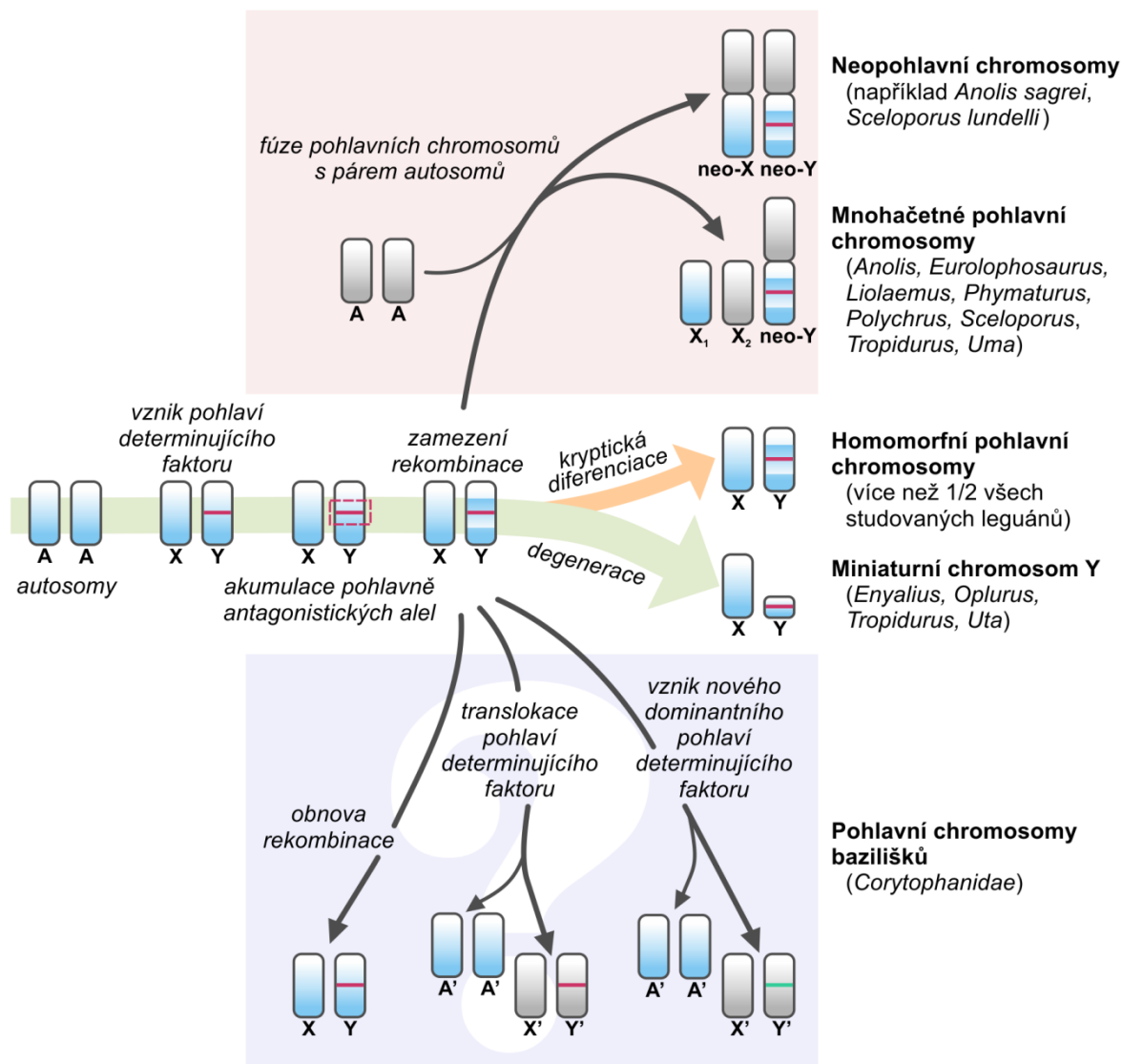
translokace celého chromosomu nebo jeho části apod.) se pohlavní chromosomy rozrůžňují i morfologicky a hovoříme o tzv. heteromorfii pohlavních chromosomů (Ohno 1967). Progresivní degenerace nepárového pohlavního chromosomu patrně může vyústit v jeho eliminaci z karyotypu a tedy ke vzniku systému XX/X0 (Just et al. 1995, Sutou et al. 2001). Párový pohlavní chromosom X zůstává více konzervativní. Podobné procesy postihující Y chromosom se účastní i diferenciaci W chromosomu v rámci samičí heterogamie (ZZ/ZW). Míra a rychlost diferenciaci pohlavních chromosomů se mezi různými liniemi organismů liší (například Kamiya et al. 2012, Liu et al. 2004) a nemusí odrážet evoluční stáří linií (příkladem jsou méně diferencované pohlavní chromosomy běžců ve srovnání s neognátními ptáky [Yazdi a Ellegren 2014, Zhou et al. 2014]). Někdy mohou původní pohlavní chromosomy prodělat přestavbu často zahrnující pár nebo více párů autosomů a vytvořit tzv. neopohlavní chromosomy. V současné době je známo několik možných mechanismů jejich vzniku (Yoshida a Kitano 2012, Kitano a Peichel 2012, Giovannotti et al. 2017) a díky svým unikátním vlastnostem výborně slouží mimo jiné ke studiu diferenciaci pohlavních chromosomů (Bachtrog 2005, Bachtrog et al. 2008).

Přestože se pohlavní chromosomy a typy heterogamie vyvinuly v různých skupinách organismů mnohokrát nezávisle, pozorujeme řadu zajímavých evolučních konvergencí. Z těch nejznámějších jsou to například maskulinizace Y a feminizace X chromosomů (Rice 1984), evoluční strata (specifické bloky dokumentující postupnou redukci rekombinace na pohlavních chromosomech; Lahn a Peige 1999, Zhou et al. 2014, Wright et al. 2016), evoluce protektivního uspořádání Y/W-specifických funkčních genů před jejich degenerací (Rozen et al. 2003, Backström et al. 2005, Davis et al. 2010, Marais et al. 2010), rychlejší evoluce genů vázaných na X/Z chromosomy ve srovnání s autosomy (Mank et al. 2010, Kousathanas et al. 2014, Dean et al. 2015), vznik mechanismů kompenzace genové dávky (shrnuto v Graves [2015]), či vznik reprodukční izolace (Lima 2014). Z evolučního pohledu přináší GSD s dobře vyvinutými pohlavními chromosomy několik výhod, jako například zajištěný stabilní poměr pohlaví v populaci i za extrémních a dlouhotrvajících klimatických podmínek a možnost části genomů specializovat se na pohlavně specifické funkce.

V rámci obratlovců se setkáváme s ohromnou rozmanitostí ve způsobech určení pohlaví (Ashman et al. 2014, Schartl et al. 2016). Při detailnějším pohledu je patrné, že některé skupiny mají stabilní dobře diferencované pohlavní chromosomy (což je notoricky známo u živorodých savců a ptáků; Veyrunes et al. 2008, Zhou et al. 2014), zatímco jiné procházejí častými změnami pohlavních chromosomů (ryby a obojživelníci; Kikuchi a Hamaguchi 2013, Miura 2008, Dufresnes et al. 2015, Sessions et al. 2016) nebo se u nich v hojně míře vyskytuje kromě GSD i ESD (plazi; Janzen a Krenz 2004, Mitchell et al. 2006, Gamble 2010, Badenhorst et al. 2013). Tato zajímavá distribuce způsobů určení pohlaví fascinuje evoluční biology již léta a je tak nasnadě, že již byla postulována řada hypotéz snažících se objasnit tuto nevyváženost mezi jednotlivými skupinami a pochopit, který způsob je evolučně původnější a zda, případně jakým směrem, mohou jednotlivé typy určení pohlaví mezi sebou navzájem přecházet. Někteří autoři (Grossen et al. 2011, Kikuchi a Hamaguchi 2013) spekulují, že odlišná míra přesmyků pohlavních chromosomů souvisí se schopností efektivní termoregulace (ptáci a savci), která zabraňuje vzniku teplotně indukovaných pohlavních revertantů. Plazi jsou považováni za skupinu velmi variabilní ve způsobech určení pohlaví (Sarre et al. 2004, Ezaz et al. 2009a). Pozorovaná variabilita tak může mít příčinu v jejich poikilotermii, a tedy výrazně vyšší citlivosti k faktorům prostředí, včetně teploty, jako u již zmíněných ryb a obojživelníků (Perrin 2009).

Oproti dřívějším hypotézám (například ESD a GSD jako kontinuum s možnými obousměrnými přechody; Sarre et al. 2004), je v současnosti poměrně dobře podpořená hypotéza ancestrálního ESD a mnohokrát nezávisle vzniklého GSD (Pokorná a Kratochvíl 2009). Hypotéza se opírá o předpoklad, že pohlavní chromosomy jsou již natolik specializovanou částí genomu, že není možné je jednoduše „ztratit“ a přejít zpět k ESD (dediferenciace pohlavních chromosomů je dobře prostudována jen u octomilek s přechodem mezi dvěma typy GSD [Vicoso a Bachtrog 2013]). Pro tuto skutečnost svědčí i dobrá podpora v provedených fylogenetických analýzách mechanismů určení pohlaví pro amniotické obratlovce (Johnson Pokorná a Kratochvíl 2016). Pozorovaná variabilita u šupinatých plazů (především gekonů [Gamble 2010] a agam [Ezaz et al. 2009a, 2009b]) je pak vysvětlována ancestrálním ESD a opakovaným vznikem pohlavních chromosomů (Johnson Pokorná a Kratochvíl 2016, Gamble et al. 2015) stejně jako u želv (Badenhorst et al. 2013).

V době, kdy jsme se leguánům začali věnovat, byla znalost leguáních pohlavních chromosomů omezena pouze na výsledky detekce rozdílů mezi samcem a samicí v karyotypu pomocí základních cytogenetických metod. Bylo tak zjištěno, že se u leguánů vyskytuje nejspíš pouze samčí heterogamie s jednoduchým systémem pohlavních chromosomů XX/XY nebo s odvozeným systémem mnohočetných pohlavních chromosomů typu  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  (Olmo a Signorino 2005; a práce zde uvedené). U více než poloviny leguáních druhů však nebyly pohlavní chromosomy odhaleny vůbec (Obr. 1) a tento fakt spolu s negativními výsledky testů na výskyt teplotně určeného pohlaví u zástupců z této skupiny byl vyhodnocen jako přítomnost homomorfních (tj. morfologicky nediferencovaných) pohlavních chromosomů v karyotypu mnoha druhů a tento závěr byl obecně přijat (například [Gorman 1973, Leaché a Sites 2009]). Je ovšem nutné dodat, že jelikož se zpravidla jedná o mikrochromosomy, detekce pohlavních rozdílů u takto malých chromosomů je metodologicky značně náročná.



**Obr. 1 Evoluce pohlavních chromosomů u leguánů**

Zelená šipka představuje tradiční hypotézu vzniku a diferenciaci pohlavních chromosomů (terminální eliminace Y chromosomu není znázorněna, neboť nebyla u leguánů odhalena). V oranžovém boxu je znázorněn vznik odvozených pohlavních chromosomů fúzí s autosomy. Fialový box zahrnuje schéma teoretických scénářů dediferenciaci a přesmyků pohlavních chromosomů u bazilišků. A'A' představují ancestrální XY pohlavní chromosomy zde autosomální povahy, X'Y' pohlavní chromosomy vzniklé z jiného autosomálního páru než ancestrální XY. Leguání pohlaví určující faktor nebyl zatím odhalen. Znázorněný dominantní Y-vázaný faktor determinující samce je tedy ryze hypotetický

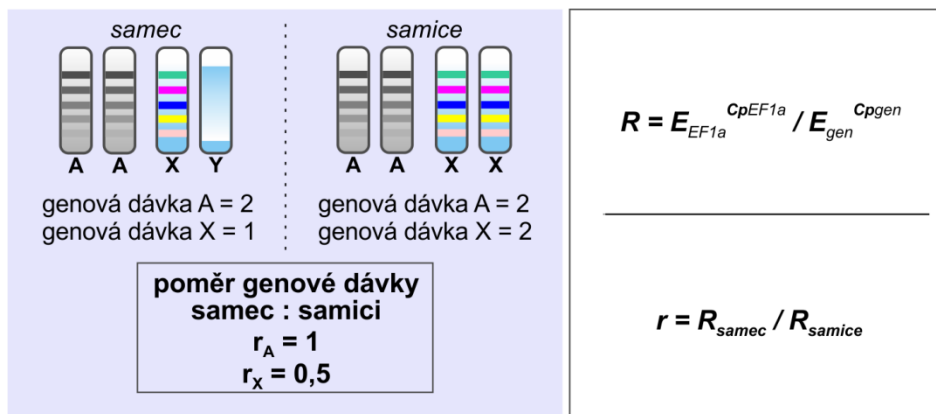
Zapojení informace o pohlavních chromosomech leguánů do fylogenetických souvislostí ukazuje, že distribuce homomorfních a heteromorfních pohlavních chromosomů je značně variabilní a nemá jasnou fylogenetickou logiku (Příloha 1). Pozorovaný různý stupeň heteromorfie pohlavních chromosomů tak patrně nesouvisí se změnami v karyotypu. Odvozené mnohočetné pohlavní chromosomy vznikly nepochybně v evoluci několikrát – minimálně dvanáctkrát – nezávisle na sobě.

Nicméně, pouze osm nezávislých vzniků mnohočetných pohlavních chromosomů poukazuje na možnou souvislost s druhovou bohatostí skupiny anebo vyšší mírou chromosomových přestaveb měnících diploidní počet chromosomů. Oproti dřívějším studiím jsme v naší fylogenetické analýze ancestrálního stavu odhadli pouze dvě nezávislé evoluční události vedoucí ke vzniku mnohočetných pohlavních chromosomů u anolisů. Tři dříve uvažované vzniky byly patrně odvozeny ze špatné interpretace karyotypu u druhu *Anolis sagrei* v práci Gamble et al. (2014). Naopak v recentní práci Giovannotti et al. (2017) dospěli na základě znalosti karyotypu *A. sagrei* ke stejnému závěru jako naše studie, tj. že zmiňované systémy pohlavních chromosomů vznikly pouze dvakrát nezávisle na sobě. Naše práce také naznačuje až čtyři nezávislé vzniky v rodě *Sceloporus*, oproti třem předpokládaným v práci Leaché a Sites (2009), kteří ale uvažovali jinou topologii linie *bicanthalis* – *aeneus* – *scalaris* – *goldmani*. Nutno však připomenout, že druhy zahrnuté v analýze představují přibližně pouze 1/4 celkové diverzity leguánů, a tak mohou být zmíněné charakteristiky do jisté míry podhodnocené. Pro přesnější náhled do této problematiky bude proto do budoucna nezbytné cytogeneticky prozkoumat co nejvíce ze zbývajících diverzity.

Z výše uvedeného je zřejmé, že pomocí základní cytogenetiky bylo prakticky nemožné usuzovat na původ pohlavních chromosomů. Přítomnost pouze samčí heterogamie v celé skupině leguánů naznačuje, že by se eventuálně mohlo jednat o homologické pohlavní chromosomy, nicméně mozaikovitá distribuce výskytu heteromorfních pohlavních chromosomů by mohla stejně tak odrážet častý přesmyk pohlavních chromosomů podobně jako například u lososovitých ryb (Woram et al. 2003). K přímému testu homologie a detailnímu posouzení evoluce pohlavních chromosomů však dosud chyběly základní znalosti genového obsahu pohlavních chromosomů a cytogenetické nástroje v podobě sond specificky značících pohlavní chromosomy. Odpověď na naši otázku o možné homologii pohlavních chromosomů leguánů tak bylo možné nalézt až po zveřejnění genomu anolise rudohrdlého *Anolis carolinensis* (dále jako ACA; Alföldi et al. 2011). Zásadní posun pro náš projekt představovalo nalezení genů vázaných exkluzivně na X chromosom, tj. chybějících na chromosomu Y. Tyto poznatky nám umožnily ověřit pohlavně specifickou vazbu těchto genů i u dalších druhů anolisů a posléze i u jiných leguánů, a zodpovědět tak dlouhotrvající otázku, zda se pohlavní chromosomy vyvinuly u společného předka studované skupiny. Tomuto tématu se věnují **první tři kapitoly disertační práce**.

V **první publikaci** jsme se díky známému genomu ACA zaměřili právě na druhově bohatý rod *Anolis*. Využili jsme znalosti X-vázaných genů druhu *Anolis carolinensis* – dále v textu jako ACA-X (Alföldi et al. 2011) a metodologicky jsme se inspirovali prací Nguyen et al. (2013), kteří použili metodu kvantitativní real time PCR (qPCR) k testu pohlavně specifické vazby genů u obalečů. Výhodou qPCR testu je jeho rychlost a aplikovatelnost i na druhy, u kterých nemáme k dispozici cytogenetický materiál. Ve srovnání s cytogenetickými přístupy odpadá náročná příprava chromosomových preparátů a sond pro *in situ* hybridizaci. Navíc lze DNA získat neinvazivními metodami (bukální stěr a sliny) nebo dokonce ze sbírkového materiálu.





### Obr. 2 Teoretický základ testu homologie pohlavních chromosomů pomocí qPCR

Samec a samice se neliší v genové dávce autosomálních genů, ale v případě X specifických genů má samec pouze jednu dávku oproti samici, která má dávky dvě. Pro měření a výpočty relativní genové dávky byl použit referenční single-copy gen *EF1a*, za „*gen*“ byly dosazeny hodnoty konkrétních testovaných autosomálních genů a ACA X-vázaných genů. Pokud za *E* dosadíme 2 (výchozí hodnota efektivity amplifikace genu) a za *Cp* hodnotu *crossing point* příslušného genu (počet cyklů amplifikace, kdy přírůstek produktu vstupuje do exponenciální fáze), získáme normalizovanou hodnotu pro výpočet poměru genové dávky mezi pohlavími.

V samotném testu vazby jsme vycházeli z předpokladu, že pokud jsou geny X-vázané a na Y chromosomu chybí nebo jsou sekvenčně pozměněné, samicím by měla být naměřena dvojnásobná genová dávka oproti samecům (viz schéma testu na Obr. 2). Naopak v případě autosomálních genů by se dávka neměla mezi pohlavími lišit. Po úspěšném pilotním testu metodiky u ACA jsme následně prověřili vazbu ACA-X genů na pohlavní chromosomy dalších 17 druhů anolisů, vybraných tak, aby co nejlépe pokrývaly diverzitu rodu, a tři druhy z čeledi Phrynosomatidae jako outgroup. Výsledky studie přinesly jednoznačný důkaz homologie pohlavních chromosomů zkoumaných druhů a druhu *A. carolinensis* bez závislosti na tom, zda jsou v jejich karyotypech přítomny heteromorfni, homomorfni nebo mnohočetné pohlavní chromosomy. Na význam takového zjištění upozorňuje i fakt, že ve stejné době se stejné otázky věnoval i další tým a výsledky obou kolektivů byly publikovány současně v téže časopise (Publikace I, Gamble et al. 2014). Jelikož studované druhy z čeledi Phrynosomatidae zvolené jako outgroup k anolisům také vykazovaly hodnoty testovaných genů odpovídající vazbě na X chromosom, předpokládali jsme, že homologie pohlavních chromosomů může být rozšířená uvnitř celé skupiny Pleurodonta. V další fázi jsme se tedy zaměřili na experimentální ověření naší hypotézy testováním dalších čeledí leguánů (**Publikace II**).

Představy o fylogenetických vztazích uvnitř šupinatých plazů jsou značně neustálené a v rámci leguánů to platí obzvláště (Pyron et al. 2013, Reeder et al. 2015, Zheng a Wiens 2016). Přesto monofylie celé skupiny Pleurodonta zahrnující 12 aktuálně rozlišovaných čeledí (Crotaphytidae, Corytophanidae, Dactyloidae, Hoplocercidae, Iguanidae, Leiocephalidae, Leiosauridae, Liolaemidae, Opluridae, Phrynosomatidae, Polychrotidae a Tropicuridae) je dobře podpořena a všeobecně uznávána (Uetz a Hošek 2015). Abychom co nejlépe vyhodnotili přítomnost homologických pohlavních chromosomů, nashromáždili jsme vzorky druhů z dalších šesti čeledí (konkrétně Crotaphytidae, Corytophanidae, Iguanidae, Leiocephalidae, Opluridae a Tropicuridae), v té době jediných

dostupných, a se stejným schématem experimentu jako v předchozí studii prověřili celkem 14 druhů, včetně tří druhů z čeledi Dactyloidae a Phrynosomatidae, které byly zastoupeny i v předchozí studii, sloužících jako kontroly. Ve srovnání s anolisy, primery navržené pro ACA-X sekvenční byly vzhledem k větší fylogenetické vzdálenosti mezi testovanými druhy méně specifické, což se u některých primerů projevilo v jejich celkovém nenesednutí nebo amplifikaci nespecifických produktů. Nicméně alespoň dva geny byly úspěšně amplifikovány v každém druhu. U všech druhů jsme získali X-specifický relativní poměr genové dávky ACA-X genů, a tedy silnou podporu konzervativních pohlavních chromosomů uvnitř leguánů. Analýza také prokázala, že agama *Pogona vitticeps* (ZZ/ZW), kterou jsme zahrnuli jako outgroup, nemá pohlavní chromosomy homologické s leguány (přestože se jedná také o mikrochromosomy), což bylo později potvrzeno při sekvenování genomu tohoto druhu (Deakin et al. 2016). Jedinou výjimkou mezi leguány byli bazilišci (čeleď Corytophanidae). Všechny tři testované druhy překvapivě vykazovaly relativní poměr genové dávky ACA-X genů  $r_X = 1$ , tedy hodnotu odpovídající vazbě genů na autosomy nebo jejich přítomnost v pseudoautosomální oblasti pohlavních chromosomů. Vzhledem k tomu, že i přes neustálenost názoru na fylogenetické vztahy leguáních čeledí bazilišci nikdy nebyli považováni za linii sesterskou ke všem ostatním leguánům a v některých studiích jsou dokonce pokládáni za jednu z nejodvozenějších čeledí (Pyron et al. 2013), domníváme se, že se jedná o odvozený stav vůči ostatním leguánům. Obě varianty (autosomální i pseudoautosomální) tedy předpokládají přesmyk nebo dediferenciaci pohlavních chromosomů, jevu, který by u dobře diferencovaných pohlavních chromosomů měl nastat pouze ojedinele, a který byl dosud podrobněji probádán pouze u octomilek (Vicoso a Bachtrog 2013). Jako možné mechanismy dediferenciace a přesmyku pohlavních chromosomů bazilišků (znázorněno na Obr. 1) uvažujeme tři – zvětšení pseudoautosomální oblasti obnovenou rekombinací (nastíněno v Perrin [2009]), translokaci pohlaví determinujícího genu na jiný pár autosomů a vznik nového pohlaví determinujícího genu (shrnuto v Bachtrog et al. [2014]). Na odhalení skutečné příčiny je však potřeba detailních analýz pohlavních rozdílů v genomech bazilišků, nalezení pohlavně specifických lokusů a pohlaví určujícího genu a posouzení homologie s ostatními leguány.

Zjištěné výsledky nás motivovaly k závěrečnému testu, totiž abychom zjistili, zda bazilišci jsou jedinou výjimkou jinak stabilního způsobu určení pohlaví mezi leguány. Z toho důvodu bylo potřeba získat vzorky DNA ze zástupců zbývajících čtyř čeledí. Po téměř třech letech sledování herpetologických fór, návštěv teraristických burz, domluv s chovateli (i mimo ČR) a expedici zoologa Milana Veselého do Panamy (získány vzorky druhu *Morunasaurus groi*) se nám podařilo nashromáždit potřebné vzorky a provést závěrečnou analýzu, která je zpracovaná **ve formě rukopisu v Publikaci III**. Kromě zástupců dosud netestovaných čtyř leguáních čeledí jsme do analýzy zahrnuli další rod bazilišků (*Corytophanes*), čímž jsme pokryli všechny tři rody čeledi Corytophanidae, a některé další potenciálně zajímavé druhy. Podařilo se nám získat například vzorky z rodu *Brachylophus*, který se vyskytuje výhradně na souostroví Fidži a přilehlých ostrovech v jihozápadním Pacifiku (Uetz a Hošek 2015; a reference uvnitř), a *Polychrus*, který má výrazně přestavěný karyotyp a disponuje mnohočetnými pohlavními chromosomy (Gorman et al. 1969, Gorman et al 1967, Bertolotto et al. 2001). Výsledky qPCR testování byly v souladu s výsledky z předchozích experimentů. Testovaný zástupce z rodu *Corytophanes* podpořil odlišnou povahu pohlavních chromosomů bazilišků, zatímco ostatní druhy vykazovaly opět X-specifickou vazbu ACA-X genů.

Díky analýze relativní genové dávky ACA X-vázaných genů mezi samcem a samicí ve skupině Pleurodonta jsme ukázali, že leguáni disponují značně konzervativním způsobem určení pohlaví. Vzhledem k odhadovanému stáří skupiny Pleurodonta (bazální štěpení Pleurodonta a Acrodonta zhruba před 120 miliony let; Townsend et al. 2011), upozornily naše studie na skutečnost, že evolučně staré a dobře diferencované pohlavní chromosomy nejsou znakem pouze endotermních ptáků a savců, ale že takové pohlavní chromosomy lze nalézt i u poikilotermních plazů. Shodným metodickým přístupem se nám v dalších navazujících studiích podařilo potvrdit stabilní pohlavní chromosomy i v dalších liniích šupinatých plazů, jmenovitě u ještěrek (Rovatsos et al. 2016a), hadů (Rovatsos et al. 2015a; Rovatsos et al., v tisku) a želv (Rovatsos et al. 2017). Lze tedy usuzovat, že evoluční stabilita pohlavních chromosomů není podmíněna homoiotermní endotermií živočichů, jak se dříve uvažovalo (Grossen et al. 2011, Kikuchi a Hamaguchi 2013). Přestože výsledky analýzy ukazují, že jednou vzniklé diferencované pohlavní chromosomy jsou evolučně stálé a může se tak opravdu jednat o jakousi evoluční past (Pokorná a Kratochvíl 2009), lze na příkladu bazilišků demonstrovat, že ve výjimečných případech může dojít k jejich přesmyku nebo dediferenciaci. Ačkoliv se v rámci amniot jedná o jev vzácný, u šupinatých plazů jsme na něj narazili v našem týmu již dvakrát (kromě bazilišků ještě v gekoním rodě *Paroedura*, Koubová et al. 2014). Nejedná se zde však o přechod od GSD k ESD, ale pravděpodobně pouze k jinému typu GSD (Koubová et al. 2014). Jediným dobře podloženým případem pohlavní reverze způsobené vysokou inkubační teplotou (za vzniku samic se ZZ pohlavními chromosomy), a tím tedy přechod k ESD, je agama *Pogona vitticeps* (Holleley et al. 2015). Přestože W chromosom tohoto druhu obsahuje značnou akumulaci heterochromatinu (Ezaz et al. 2005), fyzické mapování na chromosomech (sekvence ze samčího genomu) zatím neodhalilo geny, které by byly Z unikátní (Deakin et al. 2016). Jelikož se ukazuje, že během časných stádií diferenciací nepárových pohlavních chromosomů patrně dochází nejdříve k epigenetickým modifikacím, které utlumí jejich genovou expresi, a k pseudogenizaci dochází teprve až později u transkripčně neaktivních genů (Zhou a Bachtrog 2012), pohlavní chromosom W *P. vitticeps* by mohl být mnohem méně degenerovaný, než se dříve uvažovalo. Vysvětlovalo by to také, proč reverze pohlaví u tohoto konkrétního druhu není spojena s nižší *fitness* (Holleley et al. 2015). Navíc jsou v rámci čeledi agamovitých známy linie, u kterých je pohlaví v senzitivní periodě embryogeneze determinováno teplotou, tudíž citlivost na vysoké teploty je zřejmě charakteristická pro celou čeleď Agamidae (Ezaz et al. 2009). Tyto částečně spekulativní interpretace je však potřeba experimentálně prověřit.

V rámci leguánů přispěl nejnovější cytogenetický/cytogenomický výzkum zejména v oblasti pochopení evoluce tzv. neopohlavních chromosomů. Celochromosomové sondy připravené z rozsortovaných chromosomů druhu *A. carolinensis* ukázaly, že dvě odvozené linie anolisů se liší v evoluci neopohlavních chromosomů, totiž že ancestrální XY chromosomy fúzovaly s odlišnými autosomy. Zajímavý je i samotný fakt, že nesfúzovaly pouze s jedním ale se dvěma páry autosomů (Giovannotti et al. 2017). Navíc následné osekvenování ACA rozsortovaných chromosomů ukázalo, že v případě *A. sagrei* se fúze účastnily dokonce tři páry autosomů (Kichigin et al. 2016), a že jedna tato fúze tedy nebyla zachycena malovacími sondami. Jelikož fúze pohlavních chromosomů s autosomy je u leguánů poměrně častá (viz distribuce mnohočetných pohlavních chromosomů ve fylogenetickém kontextu, Příloha 1), zajímalo nás, zda by se dal tento výskyt vysvětlit nějakým obecnějším mechanismem. Tomuto se věnuje **Publikace IV**.

V rámci šupinatých plazů se s mnohočetnými pohlavními chromosomy setkáváme poměrně často a jenom v našem týmu jsme tento odvozený systém popsali ve třech čeledích (Pokorná et al. 2010; Rovatsos et al. 2015b, 2016b). Při detailnějším pohledu je ale patrná nerovnováha v distribuci tohoto typu pohlavních chromosomů mezi druhy se samčí a samičí heterogamií. A to sice, že systémy mnohočetných pohlavních chromosomů se vyskytují mnohem častěji u XX/XY než u ZZ/ZW. Tento jev je ještě daleko patrnější, vezmeme-li v úvahu také savce s mnohokrát nezávisle vzniklými mnohočetnými pohlavními chromosomy (Yoshida a Kitano [2012]) a ptáky, u kterých dosud nebyl zaznamenán jediný jejich výskyt (Pala et al. 2012). Silný efekt typu heterogamie naznačuje, že by se mohlo jednat o rozdílné zapojení pohlavních chromosomů v samičí meióze. Oproti samčí meióze, kde všechny produkty dělení ve formě spermií mají stejnou šanci na splnutí s vajíčkem, v samičí meióze má pouze jeden produkt dělení ze čtyř (vzniká vajíčko a tři pólová tělíška) šanci uplatnit svou genetickou informaci v další generaci. Za těchto podmínek pak může docházet k tzv. samičímu meiotickému tahu, ve kterém mohou soupeřit jednotlivé alely genu nebo i celé chromosomy o segregaci do vajíčka. Zatímco v systému XX/XY během samičí meiózy segregují kromě autosomů pouze X chromosomy (Y chromosom není přítomen), v systému ZZ/ZW meiotický tah ovlivňuje segregaci Z a W chromosomů. Pokud by proto meiotický tah samic upřednostňoval akrocentrické nebo metacentrické chromosomy (tzn. dělicí vřeténko by bylo polarizované na větší nebo menší počet centromer; de Villena a Sapienza 2001, Chmátal et al. 2014), a tím i představbu jednoho z pohlavních chromosomů, tak v případě systému XX/XY by se kromě vzniku neopohlavních chromosomů nic nezměnilo a samičí meiotický tah by neovlivnil poměr pohlaví potomků. V systému ZZ/ZW by zvýhodnění jednoho z pohlavních chromosomů (neo-Z nebo neo-W) vedlo k vychýlenému poměru pohlaví. Naše hypotéza je proto založena na předpokladu, že proti preferenci takto přestavěného Z nebo W chromosomu během meiotické segregace bude pracovat selekce.

Kromě působení samičího meiotického tahu by mohl být výrazný rozdíl v četnosti výskytu mnohočetných pohlavních chromosomů mezi ptáky a savci vysvětlen celkově vyšší rychlostí přestaveb karyotypu savců (Nakatani et al. 2007), jelikož ptáci mají mnohem konzervativnější uspořádání genomu (Ellegren 2010). Nicméně stabilita v uspořádání genomu byla doložena pro všechna Sauropsida (plazi a ptáci; například Kawai et al. [2009], Pokorná et al. [2011, 2012] a Kasai et al. [2012]), a pokud se porovná výskyt mnohočetných pohlavních chromosomů pouze uvnitř sauropsidů, tak i zde byla nalezena vyšší četnost výskytu u skupin se samčí heterogamií.

V Publikaci IV jsme proto otestovali, zda frekvence vzniku mnohočetných pohlavních chromosomů koreluje s typem heterogamie. Abychom v analýze ošetřili určitou nevyváženost v počtu známých karyotypů a také vliv druhové početnosti v jednotlivých liniích, použili jsme místo počtu druhů disponujících mnohočetnými pohlavními chromosomy počet nezávislých vzniků mnohočetných pohlavních chromosomů odvozený z fylogenetických vztahů. Statistická analýza pak prokázala, že mnohočetné neopohlavní chromosomy se opravdu vyskytují s větší pravděpodobností ve skupinách amniot se samčí heterogamií. Předpokládáme tedy, že aby v důsledku působení meiotického tahu nedocházelo při vzniku mnohočetných pohlavních chromosomů u samičí heterogamie k vychýlenému poměru pohlaví, selekce potlačuje fixaci takto vzniklých neopohlavních chromosomů. Proto pro nás bylo velmi překvapivé, když jsme o rok později při vyšetřování karyotypů chameleonů odhalili systém mnohočetných pohlavních chromosomů  $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W$  u druhu *Furcifer pardalis* (Rovatsos et al. 2015b). Možné vysvětlení podávají Guerrero a Kirckpatrick (2014), kteří poukazují na silný efekt

lokální adaptace podporující fixaci fúzí. Podobně byl dokumentován adaptivní význam fúze mezi Z chromosomem a autosomem, která přispěla ke speciaci u obalečů (Nguyen et al. 2013).

Práce také ukázala, že leguánům v porovnání s ostatními liniemi amniotických obratlovců poměrně často fúzují pohlavními chromosomy s autosomy za vzniku mnohočetných pohlavních chromosomů. Odhadnutý počet jedenáct (v současné chvíli dvanáct, viz Příloha 1) nezávislých vzniků odvozených systémů pohlavních chromosomů však může být stále podhodnocen, neboť u velkého množství druhů dosud chybí relevantní cytogenetický popis. Jedním z případů nedostačující znalosti cytogenetických charakteristik byla také čeleď Opluridae, které se věnuje **následující část disertační práce (Publikace V)**.

Během řešení projektu se nám podařilo nashromáždit unikátní kolekci madagaskarských leguánů z čeledi Opluridae. Pro tuto čeleď byl poměrně dlouhou dobu ustálen počet druhů (sedm) a jednalo se konkrétně o tyto druhy: *Chalarodon madagascariensis*, *Oplurus cuvieri*, *O. cyclurus*, *O. fierinensis*, *O. grandidieri*, *O. quadrimaculatus* a *O. saxicola*. V roce 2015 byl popsán ještě druh *Chalarodon steinkampi* (Miralles et al. 2015). Všechny uvedené druhy se vyskytují endemicky na Madagaskaru a dosud není úplně jasné, jakým způsobem se tam dostali (Noonan a Chippindale 2006, Okajima a Kumazawa 2009, Noonan a Sites 2010). Z literárních údajů byl znám pouze karyotyp jediné samice jednoho druhu (Gorman et al. 1967) a poměrně kvalitní popis makrochromosomů ostatních druhů (Blanc a Blanc 1977, Blanc et al. 1983). Nicméně zápis diploidního počtu chromosomů nebyl přiložen a Blanc a Blanc (1977) ve své práci pouze poznamenali, že počet mikrochromosomů je variabilní. Chyběla i zmínka o pohlavních chromosomech. Hlavním důvodem našeho studia leguánů z této čeledi byl fakt, že se jedná o linii zcela izolovanou od ostatních zástupců leguánů, a to již poměrně značnou dobu (více než 50 milionů let; Townsend et al. 2011, Pyron et al. 2013), tudíž by se dal předpokládat potenciál nejen pro fixaci přestaveb, ale i další změny v uspořádání genomu. Dalším aspektem, kterému jsme se chtěli věnovat, bylo prozkoumání pohlavních chromosomů – zda je možné nalézt rozdíl mezi samčím a samičím karyotypem a pomocí metody qPCR ověřit homologii pohlavních chromosomů s novosvětskými leguány. Se snahou co nejlépe porozumět organizaci genomu uvnitř studované skupiny jsme chromozomy obou pohlaví všech zmíněných druhů s výjimkou druhů *O. saxicola* a *C. steinkampi* prověřili molekulárně, molekulárně cytogeneticky i cytogeneticky.

Zjistili jsme, že podobně jako ostatní leguáni i tato čeleď je velmi konzervativní v karyotypu s typickým  $2n = 36$  (12 makro- a 24 mikrochromosomů). U samců jsme však našli miniaturní chromosom Y – nejmenší chromosom v karyotypu. V porovnání s autosomy tento postrádal nápadnou akumulaci heterochromatinu v centromere a spíše euchromatické povaze nasvědčoval i převážně GC bohatý chromatin. Vzhledem k výrazně odlišné morfologii Y chromosomu jsme předpokládali, že pohlavní chromosomy jsou dobře diferencované a tedy, že bychom se mohli pokusit o vizualizaci pohlavně specifického chromatinu pomocí metody CGH (z angl. *Comparative Genomic Hybridization*). Předpokládali jsme, že by se nám tak mohlo podařit detekovat i X chromosom podobně, jako se nám to podařilo s chromosomem Z u madagaskarského gekona *Paroedura lohatsara* (Koubová et al. 2014). Nicméně CGH ukázala pohlavně specifický obsah pouze na Y chromosomu a pouze u druhu *O. cuvieri*, zatímco u druhu *O. fierinensis* byl výsledek dosti spekulativní a v zásadě negativní. Během diferenciací pohlavních chromosomů někdy dochází ke značné akumulaci repetitivních sekvencí na nepárovém pohlavním chromosomu, jak bylo prokázáno i u některých

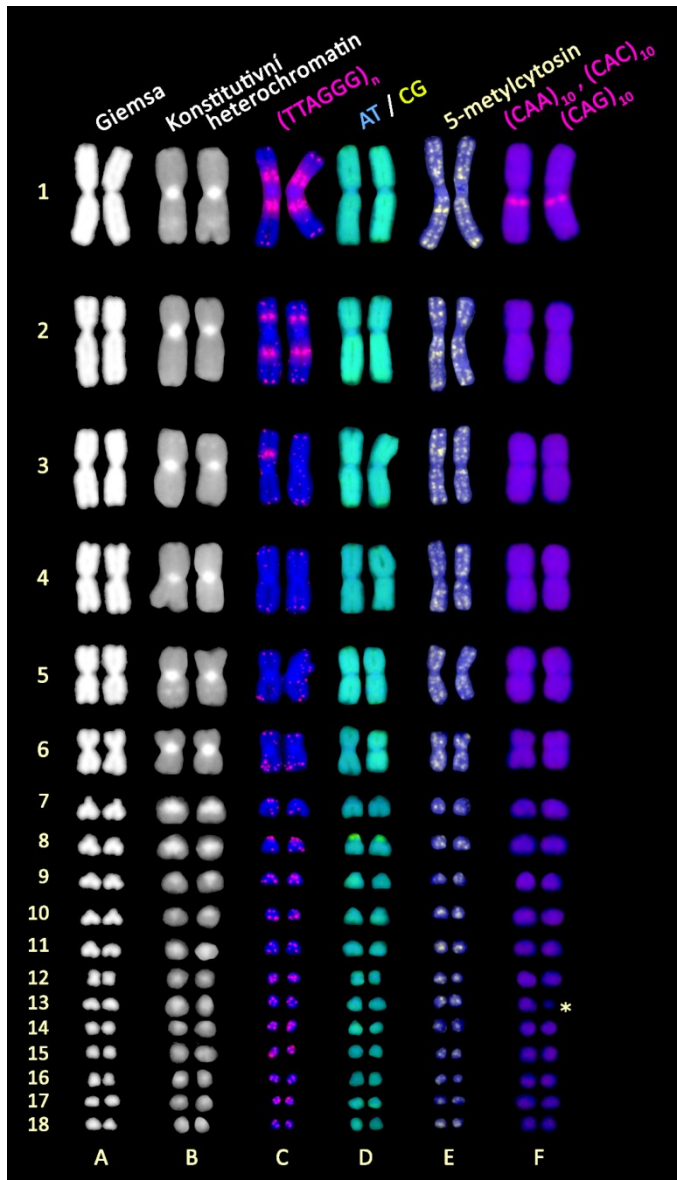
šupinatých plazů (O'Meally et al. 2010; Pokorná et al. 2011b; Ezaz a Deakin 2014; Gamble et al. 2014; Rovatsos et al. 2015c, 2016b; Matsubara et al. 2006, 2013, 2014, 2016). Hybridizovali jsme proto chromosomy s různými sondami nesoucími celé spektrum repetitivních motivů. V tomto typu experimentu dochází k amplifikaci signálu, a jedná se tedy o citlivější test. V souladu s předchozími výsledky, FISH odhalila akumulaci repetice na Y chromosomu opět pouze u druhu *O. cuvieri*. Současně porovnání počtu kopií ACA X-vázaných genů ukázalo, že se madagaskarští leguáni od ostatních novosvětských leguánů neliší a jejich pohlavní chromosomy pocházejí od společného předka všech leguánů. Všechny tyto výsledky nás přivedly k závěru, že pohlavní chromosomy u opluridů jsou značně diferencované, nicméně u Y chromosomu patrně nedochází k akumulaci repetice (spíše k úbytku chromatinu vedoucímu k celkovému zmenšení), které by bylo potřeba heterochromatinizovat a z toho důvodu také pravděpodobně CGH není dostatečně citlivá k odhalení rozdílu v genomu mezi pohlavími. V současnosti se ukazuje, že leguáni X chromosom druhů s homomorfními pohlavními chromosomy lze vizualizovat jen pomocí specifických sond (Gamble et al. 2014, Giovannotti et al. 2017), nebo je možné odhalit drobné rozdíly v morfologii X a Y chromosomů studiem synaptonemálních komplexů (Lisachov et al. 2017).

Kromě čeledi Opluridae byla pozorována tendence k výrazné degeneraci až miniaturizaci Y chromosomu i v některých dalších liniích leguánů (např. v rodech *Enyalius* [Bertolotto et al. 2002] a *Uta* [Pennock et al. 1968], nebo u některých druhů rodu *Tropidurus* [Kasahara et al. 1996]). V žádném z uvedených příkladů však zatím nebyl doložen případ celkové eliminace Y chromosomu a vzniku odvozeného systému X0 (kromě práce Peccinini et al. [1971] o rodě *Polychrus*, kde tak byl mylně označen systém mnohočetných pohlavních chromosomů  $X_1X_2Y$ ). Možným vysvětlením udržení pohlavně determinacího systému s miniaturním silně degenerovaným Y chromosomem je teoretický předpoklad, že tento chromosom obsahuje jen malý počet funkčních genů. Předpokládá se tak mnohem menší prostor pro vznik výhodných anebo škodlivých mutací, které by mohly segregovat v populaci a vzájemně interagovat. Jelikož četnost interakcí mezi segregujícími mutacemi přímo ovlivňuje rychlost degenerace Y chromosomu, u Y chromosomu s malým množstvím funkčních genů se degenerativní proces významně zpomalí (Bachtrog 2008). Z toho důvodu patrně není potřeba mít obavy o osud lidského Y chromosomu nebo na něj vázaných genů (s experimentální podporou Hughes et al. [2012, 2015]), jako se domnívala Jennifer Graves (Aitken a Graves 2002, Graves 2008).

S mírou diferenciací pohlavních chromosomů se pojí i určitá potřeba heterogametického pohlaví vyrovnat dávku mezi X a Y chromosomy a i mezi pohlavními chromosomy a autosomy (kompenzace genové dávky). V souvislosti s poměrně malou prozkoumaností pohlavních chromosomů se u šupinatých plazů o tomto jevu prakticky nic nevědělo, až recentně byla doložena kompenzace genové dávky na lokální úrovni, podobně jako u ptáků (Itoh et al. 2007), u chřestýška zakrslého (*Sistrurus miliaris*; Vicoso et al. 2013). Nutno podotknout, že ačkoliv u ptáků i hadů jsou heterogametickým pohlavím samice (ZW), a tedy by se mohlo zdát, že mechanismus balancující dávku genů je závislý na typu heterogamie (Mank et al. 2013), patrně tomu tak není, neboť nové studie (Walters a Hardcastle 2011, Smith et al. 2014, Gu et al. 2017) ukázaly, že i někteří motýli (ZW) disponují kompletní kompenzací genové dávky. Podobně na základě porovnání transkriptomů dvou samců a dvou samic bylo zjištěno, že i u anolise je dávka pohlavně vázaných genů kompenzována, a že se tak děje zvýšením exprese X-vázaných genů u samců (Rupp et al. 2017). Je zajímavé, že ve všech vazebných skupinách X chromosomu vykazují stejný mechanismus, u některých totiž k úplné

kompenzaci nedochází. U těchto by se mohlo jednat o podobný jev jako u kura domácího, kde jsou kompenzovány pouze geny citlivé na dávku (Zimmer et al. 2016) a děje se tak pouze na lokální úrovni „gen po genu“ (Mank a Ellegren 2009). Již funkční kompenzace genové dávky patrně umožňuje rychlejší degeneraci mladých neo-Y chromosomů, neboť se už jen rozšíří na nově přidanou část neo-Y (shrnutí v Bachtrog 2013), což vysvětluje i detekovaný heterochromatin na neopohlavních chromosomech leguánů, zatímco u většiny druhů s ancestrálním Y chromosomem je neodhalitelný (Altmanová 2013; viz také Y chromosom opluridů).

Již dříve jsme se pokusili na chromosomy druhu *O. cuvieri* aplikovat sondu detekující 5-metylcytosin s cílem vizualizovat silně metylované části genomu, a především odhalit případnou inaktivaci X chromosomu u samic (se stejným protokolem použitým v práci Rens et al. 2010). Jak je patrné na Obr. 3e, žádný z mikrochromosomů nevykazoval zvýšenou míru metylace, která by naznačovala inaktivaci jednoho z X chromosomů, což je v souladu s později publikovanými výsledky studia kompenzace genové dávky u anolise (Rupp et al. 2017). Zajímavým zjištěním však bylo, že se sonda vážala do stejných oblastí, ve kterých byly nalezeny intersticiální telomerické sekvence (ITS; viz Obr. 3c). Ačkoliv mechanismů vzniku ITS je diskutováno podstatně více (Bolzán a Bianchi 2006, Lin a Yan 2008, Ruiz-Herrera et al. 2008), jsou často považovány za pozůstatky pravých telomer po fúzích chromosomů (Slijepcevic 1998, 2016) nebo také aktivity mobilních elementů (Ruiz-Herrera et al. 2008). Použitím sondy nesoucí konzervativní telomerickou sekvenci se nám podařilo odhalit mimořádnou variabilitu a množství ITS (zejména u druhu *Chalarodon madagascariensis*) s téměř druhově specifickým vzorem v rámci celé čeledi Opluridae. Vzhledem k velmi konzervativnímu základnímu uspořádání genomu se však nedomníváme, že by ITS v tomto případě dokládaly přítomnost přestaveb mezi chromosomy. Navíc tyto ITS také často kolokalizují s heterochromatinem (odtud označení het-ITS, Ruiz-Herrera et al. 2008) a jak je patrné z Obr. 3, u opluridů jsme tuto kolokalizaci nepozorovali. Na základě objeveného variabilního vzoru a množství ITS nás zajímalo, zda jsou ITS relativně běžné v karyotypu šupinatých plazů, anebo zda se jedná o unikátní jev v čeledi Opluridae. Tímto se zabývá následující část disertační práce (**Publikace VI**).



**Obr. 3 Vizualizace organizace genomu u druhu *Oplurus cuvieri*.**

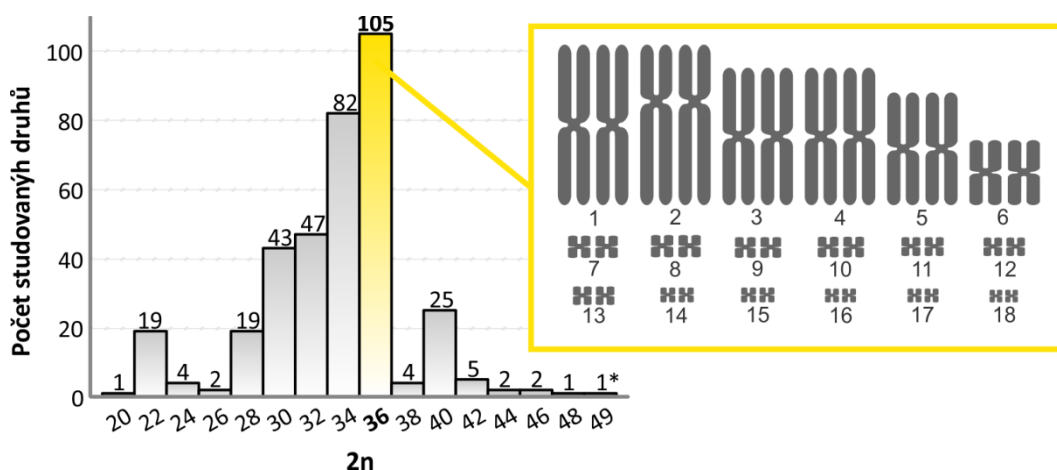
(A-E) samice; (F) samec, hvězdička označují Y chromosom. Použité metody: (B) C-pruhování, (D) barvení chromomycinem A3, (C, E, F) FISH s různými sondami. (C) Polymorfismus ITS pozorovaný u samice na páru 3, samec homozygotní se signály na obou chromosomech. (D) AT-bohaté centromery všech chromosomů a GC-bohaté oblasti sekundární konstriktce nesoucí geny organizátoru jadérka na páru 8. (C+E) Kolokalizace signálů ITS a 5-metylcytosinu. (F) Akumulace repetitivních motivů na páru 1 shodná se sesterským druhem *O. cyclurus*, ostatní druhy z čeledi bez akumulace.



V porovnání s rybami, žábami a ptáky, pro šupinaté plazy dosud chyběla práce studující výskyt ITS v karyotypu na větší fylogenetické škále, která by alespoň částečně propojila dosavadní znalosti často omezené na případové studie (Nanda et al. 2002, Schmid et al. 2010, Ocalewicz 2013, Schmid a Steinlein 2016), a dosud jediná toho druhu byla pilotní průřezová studie přes všechny hlavní linie obratlovců (Meyne et al. 1990). Naším cílem proto bylo zrevidovat výskyt ITS u šupinatých plazů, dataset doplnit o nová experimentální zjištění a distribuci a množství ITS diskutovat v evoluční perspektivě. Vzhledem ke značně konzervativnímu základnímu uspořádání genomu šupinatých plazů (karyotypu) by měl být výskyt ITS v této skupině poměrně vzácný. V práci zahrnuté v Publikaci VI jsme nashromáždili dostupná data pro celkem 38 druhů z 15 čeledí. Dále jsme metodou FISH se sondou nesoucí telomerickou sekvenci prozkoumali celkem 30 druhů, které nebyly dříve testovány, a které zastupující celkem 17 čeledí. Všechna získaná data jsme zasadili do fylogenetických vztahů skupiny. Poměrně překvapivým výsledkem bylo zjištění, že zhruba polovina všech zahrnutých druhů má ITS a tedy, že se patrně jedná o jev mnohem častější, než jsme předpokládali. Fylogenetická distribuce ITS v rámci šupinatých plazů nevykazuje žádný vzor, lze jen konstatovat častější výskyt v čeledích Teiidae, Gymnophthalmidae a infrařádu Iguania, což může být částečně způsobeno rozdíly v počtech a výběru zkoumaných druhů. Mechanismy vzniku ITS u šupinatých plazů nebyly dosud detailně studovány. Nicméně, vzhledem k tomu, že metodologicky různé přístupy opakovaně prokázaly u plazů mnohem častější výskyt přestaveb uvnitř chromosomů než mezi chromosomy (Alföldi et al. 2011; Pokorná et al. 2011a, 2012; Skinner et al. 2012; Srikulnath et al. 2009a, 2013; Lithgow et al. 2014; Rovatsos et al. 2014; Johnson Pokorná et al. 2015), domníváme se, že jedním z hlavních mechanismů vzniku ITS by mohly být právě kryptické přestavby uvnitř chromosomů, jako jsou inverze nebo také obecně dynamická povaha ITS – součást satelitní DNA či transponovatelných elementů (Rovatsos et al. 2011, Ruiz-Herrera et al. 2008). Naše domněnka je podpořena rozdílným vzorem ITS u blízce příbuzných druhů s prakticky totožným karyotypem v leguání čeledi Opluridae (Publikace V) nebo u agam rodu *Leiolepis* (Srikulnath et al. 2009b, 2011). Variabilní vzor ITS byl recentně nalezen také u hadů (Viana et al. 2016, Rovatsos et al. 2015d). U šupinatých plazů může být zvýšená amplifikace ITS způsobena i skutečností, že v somatických buňkách si telomeráza ponechává aktivitu i v dospělosti jedince. Bylo pozorováno, že nedochází ke zkracování telomer (k tzv. „buněčnému stárnutí“), ale že délka telomer může být až několikanásobná v dospělosti oproti délce v čase vylíhnutí (Ujvari a Madsen 2009).

S evolucí determinace pohlaví a pohlavních chromosomů by mohla souviset také **evoluce karyotypu** (z plazů předpokládáno například u želv; Valenzuela a Adams 2011, Montiel et al. 2016). Leguáni byli a stále jsou, jednou z cytogeneticky nejvíce zkoumaných skupin šupinatých plazů (odhadnuto na základě dat o počtu studovaných druhů napříč šupinatými plazy například v Bull [1980] nebo Olmo a Signorino [2005]). Nejvíce pozornosti si získali ve dvou obdobích – v 70. a 80. letech 20. století, které přinesly většinu dosud známých základních popisů karyotypů (Gorman 1973; Aiassa et al. 2005; Sites et al. 1992; Hall 1973, 2009; Olmo a Signorino 2005); a v současnosti, kdy se velkému zájmu těší zejména v oblasti genomiky (Aföldi et al. 2011, Eckelbar et al. 2013, Kichigin et al. 2016, Constantini et al. 2016, Rupp et al. 2017) a odvozenějších metod molekulární cytogenetiky (Gamble et al. 2014, Giovannotti et al. 2017). Genom leguánů je v rámci plazů spíše menší (přibližně 2 pg; Aföldi et al. 2011, Canapa et al. 2015) a je organizován do dvou frakcí, makrochromosomů a mikrochromosomů, což je považováno za společný znak všech plazů (Organ et al. 2008, Olmo

2008). Z tohoto schématu (na širší fylogenetické škále) částečně vybočují pouze krokodýli, u nichž je hranice mezi makro- a mikrochromosomy méně zřetelná (Organ et al. 2008). Dosud je znám karyotyp pro více než 350 druhů leguánů (shrnuto v Olmo a Signorino [2005]). Diploidní počet chromosomů se pohybuje od  $2n = 19/20$  (*Polychrus acutirostris*, samec/samice; Bertolotto et al. 2001) až do  $2n = 48$  (*Anolis monticola*; Webster et al. 1972) a ve skupině nejrozšířenější diploidní počet čítá 36 chromosomů (Obr. 4). Zvláštním případem je recentně popsáný vůbec první partenogenetický druh leguána *Liolaemus parthenos* s  $2n = 49$ , který je triploidní a jeho karyotyp patrně vznikl spojením dvou chromosomových sádek maternálního předka z druhového komplexu *L. darwinii* a jedné sádky chromosomů zatím neznámého paternálního druhu (Abdala et al. 2016). Pro lepší vhléd do evoluce leguáního karyotypu jsme provedli analýzu ancestrálního stavu diploidního počtu chromosomů metodou maximální parsimonie (Příloha 1). Dataset jsme převzali z práce Altmanová (2013) a doplnili jej o nově dostupná data. Fylogenetické vztahy jsme přejali ze současné práce Zheng a Wiens (2016). Naše analýza ancestrálního stavu ukázala, že leguáni jsou v karyotypu poměrně konzervativní. Kromě čeledi Phrynosomatidae (ancestrálně  $2n = 34$ ) a Polychrotidae (značně odvozené karyotypy s  $2n = 20 - 30$ , ancestrální stav nerozřešen) nalezneme karyotyp s  $2n = 36$  na bázi všech čeledí. Také u bazálních druhů chameleonů a agam (linie Acrodonta sesterská k leguánům) pozorujeme shodně  $2n = 36$  a značnou konzervativnost karyotypu nacházíme i u většiny ostatních plazů; vybočují pouze některé čeledi želv s výrazně vyšším diploidním počtem (Organ et al. 2008). Nicméně i v těchto případech jsou na nižších taxonomických úrovních v karyotypu poměrně stabilní (Olmo a Signorino 2005).



**Obr. 4 Distribuce diploidních počtů chromosomů (2n) u leguánů.**

Počet  $2n = 36$  představuje nejrozšířenější a patrně ancestrální karyotyp zahrnující 12 dvouramenných makrochromosomů a 24 mikrochromosomů (vpravo). Hvězdička označuje triploidní partenogenetický druh *Liolaemus parthenos*. Publikace v přípravě, data přejata z práce Altmanová (2013) a doplněna o nově dostupné záznamy (Publikace V, Abdala et al. 2016, Giovannotti et al. 2017, Grosso et al. 2017, de Matos et al. 2016).

Dále u leguánů pozorujeme, že zvýšená variabilita v diploidním počtu a tedy zvýšené tempo chromosomových přestaveb se soustřeďuje především do druhově bohatých rodů *Anolis* ( $2n = 26 - 48$ ), *Liolaemus* ( $2n = 28 - 44$ ; bez zahrnutého polymorfismu ve formě triploidního jedince jinak diploidního druhu *Liolaemus chiliensis* a již diskutovaného druhu *L. partenos*) a *Sceloporus* ( $2n = 22 - 46$ ). Některé druhy z těchto rodů disponují značným vnitrodruhovým polymorfismem, často označovaným jako „chromosomové rasy“ či „karyomorfy“ (Blake 1986; Hall 1973, 2009; Lamborot et al. 2012; de Matos et al. 2017; a reference uvnitř). Chromosomy leguánů jsou zpravidla metacentrického typu a dosavadní práce v rodě *Sceloporus* a *Anolis* ukazují, že hlavními mechanismy evoluce leguáního karyotypu jsou centrické fúze a méně často také centrické rozpady (Leaché a Sites 2009, Hall 2009, Castiglia et al. 2013). Značně odvozené karyotypy se však liší i celkovým počtem ramének, což naznačuje i přítomnost jiných typů přestaveb jako jsou tandemové fúze či pericentrické inverze (příkladem je velmi netypický karyotyp u druhu *Polychrus peruvianus* v Publikaci III). Podle fylogenetické analýzy diploidního počtu chromosomů (Příloha 1) a na základě vztahu mezi diploidním počtem a počtem cytogeneticky studovaných druhů, které daným  $2n$  disponují (na Obr. 4), je zřejmé, že během diverzifikace leguánů docházelo spíše ke snižování celkového počtu chromosomů s nápadnou výjimkou v nejodvozenější linii kontinentálních druhů anolisů. Společný předek zmíněných anolisů, vzhledem ke sdílenému počtu mikrochromosomů s nejpříbuznějšími druhy, patrně prodělal štěpení pěti párů makrochromosomů (Castiglia et al. 2013).

Korelace mezi variabilitou v karyotypu a druhovou diverzitou je patrná u mnoha skupin obratlovců, a tak vliv chromosomových přestaveb na speciaci je stále předmětem dlouhodobých diskuzí a mnoha studií. Někteří autoři poukazují na přestavby chromosomů jako na přímý mechanismus speciace skrze reprodukční izolaci způsobenou sníženou *fitness* hybridů (např. White 1973, King 1993). Podle současných představ o vlivu základního uspořádání genomu na adaptaci a speciaci mohou mít přestavby chromosomů dva zásadní efekty – potlačení rekombinace a přeuspořádání genových vazeb. Omezení rekombinace u heterozygotů, pravděpodobně v důsledku nedokonalého párování chromosomů v první fázi meiotického dělení (Dumas a Britton-Davidian 2002), umožní genům z oblasti chromosomové přestavby začít více diverzifikovat díky akumulaci rozdílů na úrovni vlastní sekvence DNA. Ve druhém případě chromosomová přestavba přímo a zásadním způsobem přetváří genové vazby v místě zlomu/fúze, čímž je ovlivněna exprese postižených genů nebo celých genových klastrů. Oba zmíněné mechanismy spojuje hypotéza lokální adaptace, která říká, že fúze se rychle zafixuje, pokud dojde k vazbě lokálně adaptovaných genů (Guerrero a Kirckpatrick 2014), což by mohlo vysvětlit snižování počtu chromosomů ve značně diverzifikovaných rodech *Anolis*, *Liolaemus* a *Sceloporus*. Vzniklé lokálně adaptivní výhody jsou natolik preferované selekcí, že pak ke speciaci může docházet i v prostředí genového toku, tj. v sympatrii (shrnuto v Gavrilets 2014). Alternativním vysvětlením k hypotéze lokální adaptace je samičí meiotický tah (podrobněji zmíněný v Publikaci IV), který ale neobjasní vznik některých akrocentrických chromosomů a musel by tedy být následován ještě pericentrickými inverzemi. Qumsiyeh (1994) navrhl, že samotný počet a morfologie chromosomů má vliv na míru rekombinace, což bylo později podpořeno (například v Dumas a Britton-Davidian [2002]) a zcela recentně potvrzeno i imunologickým značením crossing-overů u pouštních agam (spolu s chameleony sesterská skupina k leguánům) s vysokým  $2n$  pouze akrocentrických chromosomů (Artem Lisachov, nepublikováno). Kromě toho Qumsiyeh (1994) také spekuluje, že v souvislosti s mírou rekombinace

může být určitá forma karyotypu výhodnější ve stabilních podmínkách, zatímco jiná umožní rychlejší adaptaci na extrémní a měnící se prostředí. Což nás opět vrací zpět k vyšší variabilitě v karyotypu v rodech, které patrně prodělaly adaptivní radiaci.

Disertační práce a publikace v ní zahrnuté přináší nové teoretické i experimentální poznatky o evoluci pohlavních chromosomů a karyotypu leguánů. Přínosný vhled do celé problematiky je zde umožněn propojením fylogeneticky úzce zaměřených studií, zkoumajících detailně situaci z nejrůznějších úhlů pohledu s použitím rozmanitých experimentálních metod, a prací studujících konkrétní vlastnost pohlavních chromosomů nebo základní uspořádání genomu na široké fylogenetické škále.

## Literatura

- Abdala CS, Baldo D, Juárez RA, Espinoza RE** (2016) The first parthenogenetic pleurodont iguanian: A new all-female *Liolaemus* (Squamata: Liolaemidae) from Western Argentina. *Copeia* 104:487–497.
- Aiassa D, Martori R, Gorla N** (2005) Citogenética de los lagartos del género *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae) de América del Sur. *Cuadernos de Herpetología* 18:23–36.
- Aitken RJ, Marshall Graves JA** (2002) The future of sex. *Nature* 415:963.
- Alföldi J, Di Palma F, Grabherr M, Williams C, Kong L, Mauceli E, Russell P, Lowe CB, Glor RE, Jaffe JD, et al.** (2011) The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature* 477:587–591.
- Altmanová M** (2013) *Evoluce karyotypů a určování pohlaví u leguánů (Squamata: Pleurodonta)*. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Ashman TL, Bachtrog D, Blackmon H, Goldberg EE, Hahn MW, Kirkpatrick M, Kitano J, Mank JE, Mayrose I, Ming R, et al.** (2014) Tree of sex: A database of sexual systems. *Scientific Data* 1:140015.
- Backström N, Ceplitis H, Berlin S, Ellegren H** (2005) Gene conversion drives the evolution of *HINTW*, an ampliconic gene on the female-specific avian W chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 22:1992–1999.
- Badenhorst D, Stanyon R, Engstrom T, Valenzuela N** (2013) A ZZ/ZW microchromosome system in the spiny softshell turtle, *Apalone spinifera*, reveals an intriguing sex chromosome conservation in Trionychidae. *Chromosome Research* 21:137–147.
- Bachtrog D** (2005) Sex chromosome evolution: Molecular aspects of Y-chromosome degeneration in *Drosophila*. *Genome Research* 10:1393–1401.
- Bachtrog D** (2008) The temporal dynamics of processes underlying Y chromosome degeneration. *Genetics* 179:1513–1525.
- Bachtrog D** (2013) Y-chromosome evolution: Emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Reviews Genetics* 14:113–124.
- Bachtrog D, Hom E, Wong KM, Maside X, de Jong P** (2008) Genomic degradation of a young Y chromosome in *Drosophila miranda*. *Genome Biology* 9:R30.
- Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL, Kirkpatrick M, Otto SP, Ashman T-L, Hahn MW, Kitano J, Mayrose I, Ming R, et al.** (2014) Sex determination: Why so many ways of doing it? *PLoS Biology* 12:e1001899.
- Bertolotto C, Rodrigues M, Yonenaga-Yassuda Y** (2001) Banding patterns, multiple sex chromosome system and localization of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences by FISH on two species of *Polychrus* (Squamata). *Caryologia* 54:217–226.

- Bertolotto CEV, Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y** (2002) Comparative cytogenetics and supernumerary chromosomes in the Brazilian lizard genus *Enyalius* (Squamata, Polychrotidae). *Hereditas* 136:51–57.
- Blake JA** (1986) Complex chromosomal variation in natural populations of the Jamaican lizard *Anolis grahami*. *Genetica* 69:3–17.
- Blanc CP, Blanc F** (1977) Cytologie. In: **Blanc CP**. Reptiles Sauriens Iguanidae. *Faune de Madagascar*, Vol. 45. Paris: Orstom pp. 155–161.
- Blanc CP, Blanc F, Rouault J** (1983) The interrelationships of Malagasy iguanids. *Journal of Herpetology* 17:129–136.
- Bolzán AD, Bianchi MS** (2006) Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutation Research* 612:189–214.
- Bull J** (1980) Sex determination in reptiles. *Quarterly Review of Biology* 55:3–21.
- Canapa A, Barucca M, Biscotti MA, Forconi M, Olmo E** (2015) Transposons, genome size, and evolutionary insights in animals. *Cytogenetic and Genome Research* 147:217–239.
- Castiglia R, Flores-Villela O, Maria A, Bezerra R, Muñoz A, Gornung E** (2013) Pattern of chromosomal changes in “beta” *Anolis* (*Norops* group) (Squamata: Polychrotidae) depicted by an ancestral state analysis. *Zoological Studies* 52:60.
- Costantini M, Greif G, Alvarez-Valin F, Bernardi G** (2016) The *Anolis* lizard genome: An amniote genome without isochores? *Genome Biology and Evolution* 8:1048–1055.
- Davis JK, Thomas PJ, Thomas JW** (2010) A W-linked palindrome and gene conversion in New World sparrows and blackbirds. *Chromosome Research* 18:543–553.
- Deakin JE, Edwards MJ, Patel H, O’Meally D, Lian J, Stenhouse R, Ryan S, Livernois AM, Azad B, Holleley CE, et al.** (2016) Anchoring genome sequence to chromosomes of the central bearded dragon (*Pogona vitticeps*) enables reconstruction of ancestral squamate macrochromosomes and identifies sequence content of the Z chromosome. *BMC Genomics* 17:447.
- Dean R, Harrison PW, Wright AE, Zimmer F, Mank JE** (2015) Positive selection underlies faster-Z evolution of gene expression in birds. *Molecular Biology and Evolution* 32:2646–2656.
- Dufresnes C, Borzée A, Horn A, Stöck M, Ostini M, Sermier R, Wassef J, Litvinchuck SN, Kosch TA, Waldman B, et al.** (2015) Sex-chromosome homomorphy in Palearctic tree frogs results from both turnovers and X–Y recombination. *Molecular Biology and Evolution* 32:2328–2337.
- Dumas D, Britton-Davidian J** (2002) Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: Comparison of chiasma distribution patterns in standard and Robertsonian populations of the house mouse. *Genetics* 162:1355–1366.

- Eckalbar WL, Hutchins ED, Markov GJ, Allen AN, Corneveaux JJ, Lindblad-Toh K, Di Palma F, Alföldi J, Huentelman MJ, Kusumi K** (2013) Genome reannotation of the lizard *Anolis carolinensis* based on 14 adult and embryonic deep transcriptomes. *BMC Genomics* 14:49.
- Ellegren H** (2010) Evolutionary stasis: The stable chromosomes of birds. *Trends in Ecology and Evolution* 25:283–291.
- Ezaz T, Deakin JE** (2014) Repetitive sequence and sex chromosome evolution in vertebrates. *Advances in Evolutionary Biology* 2014:1–9.
- Ezaz T, Quinn AE, Miura I, Sarre SD, Georges A, Graves JAM** (2005) The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Research* 13:763–776.
- Ezaz T, Sarre SD, O’Meally D, Marshall Graves JA, Georges A** (2009a) Sex chromosome evolution in lizards: Independent origins and rapid transitions. *Cytogenetic and Genome Research* 127:249–260.
- Ezaz T, Quinn AE, Sarre SD, O’Meally D, Georges A, Graves JAM** (2009b) Molecular marker suggests rapid changes of sex-determining mechanisms in Australian dragon lizards. *Chromosome Research* 17:91–98.
- Ferguson-Smith M** (2006) The evolution of sex chromosomes and sex determination in vertebrates and the key role of *DMRT1*. *Sexual Development* 1:2–11.
- Gamble T** (2010) A review of sex determining mechanisms in geckos (Gekkota: Squamata). *Sexual Development* 4:88–103.
- Gamble T, Geneva AJ, Glor RE, Zarkower D** (2014) *Anolis* sex chromosomes are derived from a single ancestral pair. *Evolution* 68:1027–1041.
- Gamble T, Coryell J, Ezaz T, Lynch J, Scantlebury DP, Zarkower D** (2015) Restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) reveals an extraordinary number of transitions among gecko sex-determining systems. *Molecular Biology and Evolution* 32:1296–1309.
- Gavrilets S** (2014) Models of speciation: Where are we now? *Journal of Heredity* 105:743–755.
- Giovannotti M, Trifonov VA, Paoletti A, Kichigin IG, O’Brien PCM, Kasai F, Giovagnoli G, Ng BL, Ruggeri P, Cerioni PN, et al.** (2017) New insights into sex chromosome evolution in anole lizards (Reptilia, Dactyloidae). *Chromosoma* 126:245–260.
- Gorman GC, Atkins L, Holzinger T** (1967) New karyotypic data on 15 genera of lizards in the family Iguanidae, with discussion of taxonomic and cytological implications. *Cytogenetics* 6:286–299.
- Gorman GC, Huye RB, Williams EE** (1969) Cytotaxonomic studies on some unusual iguanid lizards assigned to the genera *Chamaeleolis*, *Polychrus*, *Polychroides*, and *Phenacosaurus*, with behavioral notes. *Breviora* 316:1–17.

- Gorman GC** (1973) The chromosomes of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation. **In: Chiarelli AB, Cappana E.** *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Academic Press, New York, pp 349–423.
- Graves JAM** (2008) Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annual Review of Genetics* 42:565–586.
- Graves JAM** (2015) Evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. *Nature Reviews Genetics* 17:33–46.
- Grossen C, Neuenschwander S, Perrin N** (2011) Temperature-dependent turnovers in sex determination mechanisms: A quantitative model. *Evolution* 65:64–78.
- Grosso JR, Cardozo D, Baldo D, Lobo F** (2017) Multiple sex chromosome system and Robertsonian rearrangements involved in the chromosome evolution of the *Phymaturus palluma* group (Iguania: Liolaemidae). *Journal of Herpetology* 51:154–160.
- Gu L, Walters JR, Knipple DC** (2017) Conserved patterns of sex chromosome dosage compensation in the Lepidoptera (WZ/ZZ): Insights from a moth neo-Z chromosome. *Genome Biology and Evolution* 9:802–816.
- Guerrero RF, Kirkpatrick M** (2014) Local adaptation and the evolution of chromosome fusions. *Evolution* 68:2747–2756.
- Hall WP** (1973) *Comparative population cytogenetics, speciation, and evolution of the iguanid lizard genus Sceloporus*. PhD Thesis. Harvard University Cambridge. Massachusetts.
- Hall WP** (2009) Chromosome variation, genomics, speciation and evolution in *Sceloporus* lizards. *Cytogenetic and Genome Research* 127:143–165.
- Hobza R, Kubat Z, Cegan R, Jesionek W, Vyskot B, Kejnovsky E** (2015) Impact of repetitive DNA on sex chromosome evolution in plants. *Chromosome Research* 23:561–570.
- Holley CE, O’Meally D, Sarre SD, Marshall Graves JA, Ezaz T, Matsubara K, Azad B, Zhang X, Georges A** (2015) Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature* 523:79–82.
- Hughes JF, Skaletsky H, Brown LG, Pyntikova T, Graves T, Fulton RS, Dugan S, Ding Y, Buhay CJ, Kremitzki C, et al.** (2012) Strict evolutionary conservation followed rapid gene loss on human and rhesus Y chromosomes. *Nature* 483:82–86.
- Hughes JF, Skaletsky H, Koutseva N, Pyntikova T, Page DC** (2015) Sex chromosome-to-autosome transposition events counter Y-chromosome gene loss in mammals. *Genome biology* 16:104.
- Chalopin D, Volf J-N, Galiana D, Anderson JL, Schartl M** (2015) Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. *Chromosome Research* 23:545–560.
- Charlesworth B** (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology* 6:149–162.



- Chmátal L, Gabriel SI, Mitsainas GP, Martínez-Vargas J, Ventura J, Searle JB, Schultz RM, Lampson MA** (2014) Centromere strength provides the cell biological basis for meiotic drive and karyotype evolution in mice. *Current Biology* 24:2295–2300.
- Itoh Y, Melamed E, Yang X, Kampf K, Wang S, Yehya N, Van Nas A, Replogle K, Band MR, Clayton DF, et al.** (2007) Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. *Journal of Biology* 6:2.
- Janzen FJ, Krenz JG** (2004) Phylogenetics: Which was first, TSD or GSD? In: **Valenzuela N, Lance VA.** *Temperature dependent sex determination in vertebrates*. Washington: Smithsonian Books, pp 121–130.
- Johnson Pokorná M, Trifonov VA, Rens W, Ferguson-Smith MA, Kratochvíl L** (2015) Low rate of interchromosomal rearrangements during old radiation of gekkotan lizards (Squamata: Gekkota). *Chromosome Research* 23:299–309.
- Johnson Pokorná M, Kratochvíl L** (2016) What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates? *Biological Reviews* 91:1–12.
- Just W, Rau W, Vogel W, Akhverdian M, Fredga K, Graves JAM, Lyapunova E** (1995) Absence of *Sry* in species of the vole *Ellobius*. *Nature Genetics* 11:117–118.
- Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, Fujita M, Suetake H, Suzuki S, Hosoya S, et al.** (2012) A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics* 8:e1002798.
- Kasahara S, Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y** (1996) Comparative cytogenetic studies of eleven species of the *Tropidurus torquatus* group (Sauria, Tropiduridae), with banding patterns. *Hereditas* 125:37–46.
- Kasai F, O'Brien PCM, Martin S, Ferguson-Smith MA** (2012) Extensive homology of chicken macrochromosomes in the karyotypes of *Trachemys scripta elegans* and *Crocodylus niloticus* revealed by chromosome painting despite long divergence times. *Cytogenetic and Genome Research* 136:303–307.
- Kawai A, Ishijima J, Nishida C, Kosaka A, Ota H, Kohno S, 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.
- Kichigin IG, Giovannotti M, Makunin AI, Ng BL, Kabilov MR, Tupikin AE, Barucchi VC, Splendiani A, Ruggeri P, Rens W, et al.** (2016) Evolutionary dynamics of *Anolis* sex chromosomes revealed by sequencing of flow sorting-derived microchromosome-specific DNA. *Molecular Genetics and Genomics* 291:1955–1966.
- Kikuchi K, Hamaguchi S** (2013) Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics* 242:339–353.
- King M** (1993) *Species Evolution: The Role of Chromosome Change*. Cambridge University Press, New York.

- Kitano J, Peichel CL** (2012) Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. *Environmental Biology of Fishes* 94:549–558.
- Koubová M, Pokorná MJ, Rovatsos M, Farkačová K, Altmanová M, Kratochvíl L** (2014) Sex determination in Madagascar geckos of the genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae): Are differentiated sex chromosomes indeed so evolutionary stable? *Chromosome Research* 22:441–452.
- Kousathanas A, Halligan DL, Keightley PD** (2014) Faster-X adaptive protein evolution in house mice. *Genetics* 196:1131–1143.
- Lahn BT, Page DC** (1999) Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 286:964–967.
- Lambrot M, Ossa CG, Vásquez M** (2012) Population cytogenetics of the “Northern Mod 1” chromosomal race of *Liolaemus monticola* Müller & Helmich (Iguanidae) from Central Chile. *Gayana* 76:10–21.
- Leaché AD, Sites Jr. JW** (2009) Chromosome evolution and diversification in North American spiny lizards (genus *Sceloporus*). *Cytogenetic and Genome Research* 127:166–181.
- Lima TG** (2014) Higher levels of sex chromosome heteromorphism are associated with markedly stronger reproductive isolation. *Nature Communications* 5:4743.
- Lin KW, Yan J** (2008) Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation Research* 658:95–110.
- Lisachov AP, Trifonov VA, Giovannotti M, Ferguson-Smith MA, Borodin PM** (2017) Heteromorphism of “homomorphic” sex chromosomes in two anole species (Squamata, Dactyloidae) revealed by synaptonemal complex analysis. *Cytogenetic and Genome Research* 151:89–95.
- Lithgow PE, O’Connor R, Smith D, Fonseka G, Al Mutery A, Rathje C, Frodsham R, O’Brien P, Kasai F, Ferguson-Smith MA, et al.** (2014) Novel tools for characterising inter and intra chromosomal rearrangements in avian microchromosomes. *Chromosome Research* 22:85–97.
- Liu ZY, Moore PH, Ma H, Ackerman CM, Ragiba M, Yu Q, Pearl HM, Kim MS, Charlton JW, Stiles JI, et al.** (2004) A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* 427:348–352.
- Mank JE** (2013) Sex chromosome dosage compensation: Definitely not for everyone. *Trends in Genetics* 29:677–683.
- Mank JE, Ellegren H** (2009) All dosage compensation is local: Gene-by-gene regulation of sex-biased expression on the chicken Z chromosome. *Heredity* 102:312–320.
- Mank JE, Nam K, Ellegren H** (2010) Faster-Z evolution is predominantly due to genetic drift. *Molecular Biology and Evolution* 27:661–670.

- Marais GA, Campos PR, Gordo I** (2010) Can intra-Y gene conversion oppose the degeneration of the human Y chromosome? A simulation study. *Genome Biology and Evolution* 12:347–357.
- de Matos NB, Ferreira M, de Jesus Silva F, Rodrigues MT, Santos da Silva E, Garcia C** (2016) Taxonomy and evolution of *Tropidurus* (Iguania, Tropiduridae) based on chromosomal and DNA barcoding analysis. *Journal of Herpetology* 50:316–326.
- Matsubara K, Tarui H, Toriba M, Yamada K, Nishida-Umehara C, Agata K, Matsuda Y** (2006) Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:18190–18195.
- Matsubara K, Knopp T, Sarre SD, Georges A, Ezaz T** (2013) Karyotypic analysis and FISH mapping of microsatellite motifs reveal highly differentiated XX/XY sex chromosomes in the pink-tailed worm-lizard (*Aprasia parapulchella*, Pygopodidae, Squamata). *Molecular Cytogenetics* 6:60.
- Matsubara K, Sarre SD, Georges A, Matsuda Y, Marshall Graves J a, Ezaz T** (2014) Highly differentiated ZW sex microchromosomes in the Australian *Varanus* species evolved through rapid amplification of repetitive sequences. *PloS One* 9:e95226.
- Matsubara K, O’Meally D, Azad B, Georges A, Sarre SD, Graves JAM, Matsuda Y, Ezaz T** (2016) Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in Sauropsida. *Chromosoma* 125:111–123.
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK** (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99:3–10.
- Miralles A, Glaw F, Ratsavina FM, Vences M** (2015) A likely microendemic new species of terrestrial iguana, genus *Chalarodon*, from Madagascar. *Zootaxa* 3946:201–220.
- Mitchell NJ, Nelson NJ, Cree A, Pledger S, Keall SN, Daugherty CH** (2006) Support for a rare pattern of temperature-dependent sex determination in archaic reptiles: Evidence from two species of tuatara (*Sphenodon*). *Frontiers in Zoology* 3:9.
- Miura I** (2008) An evolutionary witness: The frog *rana rugosa* underwent change of heterogametic sex from XY male to ZW female. *Sexual Development* 1:323–331.
- Montiel EE, Badenhorst D, Lee LS, Literman R, Trifonov V, Valenzuela N** (2016) Cytogenetic insights into the evolution of chromosomes and sex determination reveal striking homology of turtle sex chromosomes to amphibian autosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 148:292–304.
- Nakatani Y, Takeda H, Kohara Y, Morishita S** (2007) Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome Research* 17:1254–1265.

- Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Scharl M, Schmid M** (2002) Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* 111:215–227.
- Noonan BP, Chippindale PT** (2006) Vicariant origin of malagasy reptiles supports Late Cretaceous antarctic land bridge. *The American Naturalist* 168:730–741.
- Noonan BP, Sites Jr. JW** (2010) Tracing the origins of iguanid lizards and boine snakes of the Pacific. *The American Naturalist* 175:61–72.
- Nguyen P, Sýkorová M, Šíchová J, Kůta V, Dalíková M, Čapková Frydrychová R, Neven LG, 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* 110:6931–6936.
- Ocalewicz K** (2013) Telomeres in fishes. *Cytogenetic and Genome Research* 141:114–125.
- Ohno S** (1967) *Sex Chromosomes And Sex-Linked Genes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Okajima Y, Kumazawa Y** (2009) Mitogenomic perspectives into iguanid phylogeny and biogeography: Gondwanan vicariance for the origin of Madagascan oplurines. *Gene* 441:28–35.
- Olmo E** (2008) Trends in the evolution of reptilian chromosomes. *Integrative and Comparative Biology* 48:486–493.
- Olmo E, Signorino G** (2005) *Chromorep: A reptile chromosomes database*. <http://chromorep.univpm.it>.
- O’Meally D, Patel HR, Stiglec R, Sarre SD, Georges A, Graves JAM, Ezaz T** (2010) Non-homologous sex chromosomes of birds and snakes share repetitive sequences. *Chromosome Research* 18:787–800.
- Organ CL, Moreno RG, Edwards SV** (2008) Three tiers of genome evolution in reptiles. *Integrative and Comparative Biology* 48:494–504.
- Pala I, Naurin S, Stervander M, Hasselquist D, Bensch S, Hansson B** (2012) Evidence of a neo-sex chromosome in birds. *Heredity* 108:264–272.
- Peccinini D, Frota-Pessoa O, Ferrari I** (1971) Sex determination of the « pseudo-X0/XX » type in the brazilian lizard *Polychrus* sp. (Sauria, Iguanidae). *Caryologia* 24:129–139.
- Pennock LA, Tinkle DW, Shaw MW** (1968) Chromosome number in the lizard genus *Uta* (family Iguanidae). *Chromosoma* 24:467–476.
- Perrin N** (2009) Sex reversal: A fountain of youth for sex chromosomes? *Evolution* 63:3043–3049.
- Pokorná M, Kratochvíl L** (2009) Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: Are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zoological Journal of the Linnean Society* 156:168–183.

- Pokorná M, 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, Giovannotti M, Kratochvíl L, Kasai F, Trifonov VA, O'Brien PCM, Caputo V, Olmo E, Ferguson-Smith MA, Rens W** (2011a) Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence. *Chromosoma* 120:455–468.
- Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E** (2011b) Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics* 12:90.
- Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Caputo V, Olmo E, Ferguson-Smith MA, Rens W** (2012) Conservation of chromosomes syntenic with avian autosomes in squamate reptiles revealed by comparative chromosome painting. *Chromosoma* 121:409–418.
- Pyron RA, Burbrink FT, Wiens JJ** (2013) A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* 13:93.
- Qumsiyeh MB** (1994) Evolution of number and morphology of mammalian chromosomes. *The Journal of Heredity* 85:455–465.
- Reeder TW, Townsend TM, Mulcahy DG, Noonan BP, Wood PL, Sites JW, Wiens JJ** (2015) Integrated analyses resolve conflicts over squamate reptile phylogeny and reveal unexpected placements for fossil taxa. *PLoS One* 10:e0118199.
- Rens W, Wallduck MS, Lovell FL, Ferguson-Smith MA, Ferguson-Smith AC** (2010) Epigenetic modifications on X chromosomes in marsupial and monotreme mammals and implications for evolution of dosage compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:17657–17662.
- Rice WR** (1984) Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution* 38:1416–1424.
- Rovatsos MT, Marchal JA, Romero-Fernández I, Fernández FJ, Giagia-Athanosopoulou EB, Sánchez A** (2011) Rapid, independent, and extensive amplification of telomeric repeats in pericentromeric regions in karyotypes of arvicoline rodents. *Chromosome Research* 19:869–882.
- Rovatsos M, Altmanová M, Johnson Pokorná M, Kratochvíl L** (2014) Novel X-linked genes revealed by quantitative polymerase chain reaction in the green anole, *Anolis carolinensis*. *G3: Genes-Genomes-Genetics* 4:2107–2113.
- Rovatsos M, Vukić J, Lymberakis P, Kratochvíl L** (2015a) Evolutionary stability of sex chromosomes in snakes. *Proceedings of the Royal Society B* 282:20151992.

- Rovatsos M, Pokorná MJ, Altmanová M, Kratochvíl L** (2015b) Female heterogamety in Madagascar chameleons (Squamata: Chamaeleonidae: *Furcifer*): Differentiation of sex and neo-sex chromosomes. *Scientific Reports* 5:13196.
- Rovatsos M, Johnson Pokorná M, Kratochvíl L** (2015c) Differentiation of sex chromosomes and karyotype characterisation in the dragonsnake *Xenodermus javanicus* (Squamata: Xenodermatidae). *Cytogenetic and Genome Research* 147:48–54.
- Rovatsos M, Johnson Pokorná M, Kratochvíl L** (2015) differentiation of sex chromosomes and karyotype characterisation in the dragonsnake *Xenodermus javanicus* (Squamata: Xenodermatidae). *Cytogenetic and Genome Research* 147:48–54.
- Rovatsos M, Pokorná MJ, Altmanová M, Kratochvíl L, Velenský P, Vodička R, Rehák I** (2015e) Sexing of Komodo dragons, *Varanus komodoensis* / Určování pohlaví varanů komodských, *Varanus komodoensis*. *Gazella* 42:93–107.
- Rovatsos M, Vukić J, Altmanová M, Johnson Pokorná M, Moravec J, Kratochvíl L** (2016a) Conservation of sex chromosomes in lacertid lizards. *Molecular Ecology* 25:3120–3126.
- Rovatsos M, Johnson Pokorná M, Altmanová M, Kratochvíl L** (2016b) Mixed-up sex chromosomes: Identification of sex chromosomes in the  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  system of the legless lizards of the genus *Lialis* (Squamata: Gekkota: Pygopodidae). *Cytogenetic and Genome Research* 149:282–289.
- Rovatsos M, Prashag P, Fritz U, Kratochvíl L** (2017) Stable Cretaceous sex chromosomes enable molecular sexing in softshell turtles (Testudines: Trionychidae). *Scientific Reports* 7:42150.
- Rovatsos M, Kratochvíl L** (2017) Molecular sexing applicable in 4000 species of lizards and snakes? From dream to real possibility. *Methods in Ecology and Evolution*, v tisku. doi: 10.1111/2041-210X.12714
- Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Page DC** (2003) Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature* 423:873–876.
- Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E** (2008) Telomeric repeats far from the ends: Mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and genome research* 122:219–228.
- Rupp SM, Webster TH, Olney KC, Hutchins ED, Kusumi K, Wilson Sayres MA** (2017) Evolution of dosage compensation in *Anolis carolinensis*, a reptile with XX/XY chromosomal sex determination. *Genome Biology and Evolution* 9:231–240.
- Sarre SD, Georges A, Quinn A** (2004) The ends of a continuum: Genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays* 26:639–645.
- Sessions SK, Bizjak Mali L, Green DM, Trifonov V, Ferguson-Smith M** (2016) Evidence for sex chromosome turnover in proteid salamanders. *Cytogenetic and Genome Research* 148:305–313.

- Shoemaker CM, Crews D** (2009) Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20:293–303.
- Schmid M, Bogart JP, Hedges SB** (2010) The chromosomes of terraranan frogs. Insights into vertebrate cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research* 130–131:1–568.
- Schmid M, Steinlein C** (2016) Chromosome Banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal Telomeric DNA Sequences in Anura. *Cytogenetic and Genome Research* 148:211–226.
- Sites JW, Archie JW, Cole CJ, Villela OF** (1992) A review of phylogenetic hypotheses for lizards of the genus *Sceloporus* (Phrynosomatidae): Implications for ecological and evolutionary studies. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 213: 1–110.
- Skinner BM, Griffin DK** (2012) Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: Evidence for regions prone to breakpoints. *Heredity* 108:37–41.
- Slijepcevic P** (1998) Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107:136–140.
- Slijepcevic P** (2016) Mechanisms of the evolutionary chromosome plasticity: Integrating the “centromere-from-telomere” hypothesis with telomere length regulation. *Cytogenetic and Genome Research* 148:268–278.
- Smith G, Chen Y-R, Blissard GW, Briscoe AD** (2014) Complete dosage compensation and sex-biased gene expression in the moth *Manduca sexta*. *Genome Biology and Evolution* 6:526–537.
- Srikulnath K, Nishida C, Matsubara K, Uno Y, Thongpan A, Suputtitada S, Apisitwanich S, Matsuda Y** (2009a) Karyotypic evolution in squamate reptiles: Comparative gene mapping revealed highly conserved linkage homology between the butterfly lizard (*Leiolepis reevesii rubritaeniata*, Agamidae, Lacertilia) and the Japanese four-striped rat snake (*Elaphe quadrivirgata*). *Chromosome Research* 17:975–986.
- Srikulnath K, Matsubara K, Uno Y, Thongpan A, Suputtitada S, Apisitwanich S, Matsuda Y, Nishida C** (2009b) Karyological characterization of the butterfly lizard (*Leiolepis reevesii rubritaeniata*, Agamidae, Squamata) by molecular cytogenetic approach. *Cytogenetic and Genome Research* 125:213–223.
- Srikulnath K, Uno Y, Matsubara K, Thongpan A, Suputtitada S, Apisitwanich S, Nishida C, Matsuda Y** (2011) Chromosomal localization of the *18S-28S* and *5S rRNA* genes and (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences of butterfly lizards (*Leiolepis belliana belliana* and *Leiolepis boehmei*, Agamidae, Squamata). *Genetics and Molecular Biology* 34:582–586.
- Srikulnath K, Uno Y, Nishida C, Matsuda Y** (2013) Karyotype evolution in monitor lizards: Cross-species chromosome mapping of cDNA reveals highly conserved synteny and gene order in the Toxicofera clade. *Chromosome Research* 21:805–819.
- Sutou S, Mitsui Y, Tsuchiya K** (2001) Sex determination without the Y chromosome in two Japanese rodents *Tokudaia osimensis osimensis* and *Tokudaia osimensis* spp. *Mammalian Genome* 12:17–21.

- Townsend TM, Mulcahy DG, Noonan BP, Sites JW, Kuczynski CA, Wiens JJ, Reeder TW** (2011) Phylogeny of iguanian lizards inferred from 29 nuclear loci, and a comparison of concatenated and species-tree approaches for an ancient, rapid radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61:363–380.
- Uetz P, Hošek J** (2015) *The Reptile Database*. <http://www.reptile-database.org>.
- Ujvari B, Madsen T** (2009) Short telomeres in hatchling snakes: Erythrocyte telomere dynamics and longevity in tropical pythons. *PLoS One* 4:e7493.
- Valenzuela N, Adams DC** (2011) Chromosome number and sex determination coevolve in turtles. *Evolution* 65:1808–1813.
- Veyrunes F, Waters PD, Miethke P, Rens W, Mcmillan D, Alsop AE, Grützner F, Deakin JE, Whittington CM, Schatzkamer K, et al.** (2008) Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Research* 18:965–973.
- Viana PF, Ribeiro LB, Souza GM, Chalkidis H de M, Gross MC, Feldberg E** (2016) Is the karyotype of neotropical boid snakes really conserved? Cytotaxonomy, chromosomal rearrangements and karyotype organization in the boidae family. *PLoS One* 11:e0160274.
- Vicoso B, Bachtrog D** (2013) Reversal of an ancient sex chromosome to an autosome in *Drosophila*. *Nature* 499:332–335.
- Vicoso B, Emerson JJ, Zektser Y, Mahajan S, Bachtrog D** (2013) Comparative sex chromosome genomics in snakes: Differentiation, evolutionary strata, and lack of global dosage compensation. *PLoS Biology* 11:e1001643.
- de Villena PM, Sapienza C** (2001) Female meiosis drives karyotypic evolution in mammals. *Genetics* 159:1179–1189.
- Walters JR, Hardcastle TJ** (2011) Getting a full dose? Reconsidering sex chromosome dosage compensation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genome Biology and Evolution* 3:491–504.
- Webster TP, Hall WP, Williams EE** (1972) Fission in the evolution of a lizard karyotype. *Science* 177: 611-613.
- White MJD** (1973) *Animal Cytology and Evolution*. Cambridge University Press, London.
- Woram RA, Gharbi K, Sakamoto T, Hoyheim B, Holm LE, Naish K, McGowan C, Ferguson MM, Phillips RB, Stein J, et al.** (2003) Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes. *Genome Research* 13:272–280.
- Wright AE, Dean R, Zimmer F, Mank JE** (2016) How to make a sex chromosome. *Nature Communications* 7:1–8.
- Yazdi HP, Ellegren H** (2014) Old but not (so) degenerated – slow evolution of largely homomorphic sex chromosomes in ratites. *Molecular Biology and Evolution* 31:1444–1453.



- Yoshida K, Kitano J** (2012) The contribution of female meiotic drive to the evolution of neo-sex chromosomes. *Evolution* 66:3198–3208.
- Zheng Y, Wiens JJ** (2016) Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94:537–547.
- Zhou Q, Bachtrog D** (2012) Chromosome-wide gene silencing initiates Y degeneration in *Drosophila*. *Current Biology* 22:522–525.
- Zhou Q, Zhang J, Bachtrog D, An N, Huang Q, Jarvis ED, Gilbert MTP, Zhang G** (2014) Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa. *Science* 346:1246338–1246338.
- Zimmer F, Harrison PW, Dessimoz C, Mank JE** (2016) Compensation of dosage-sensitive genes on the chicken Z chromosome. *Genome Biology and Evolution* 8:1233–1242.



**Conserved sex chromosomes across  
adaptively radiated *Anolis* lizards**

Rovatsos Michail, Altmanová Marie, Pokorná Martina,  
Kratochvíl Lukáš

*Evolution*



Don McLeish laskavě svolil s použitím své originální fotografie. <http://dmcleish.com>





























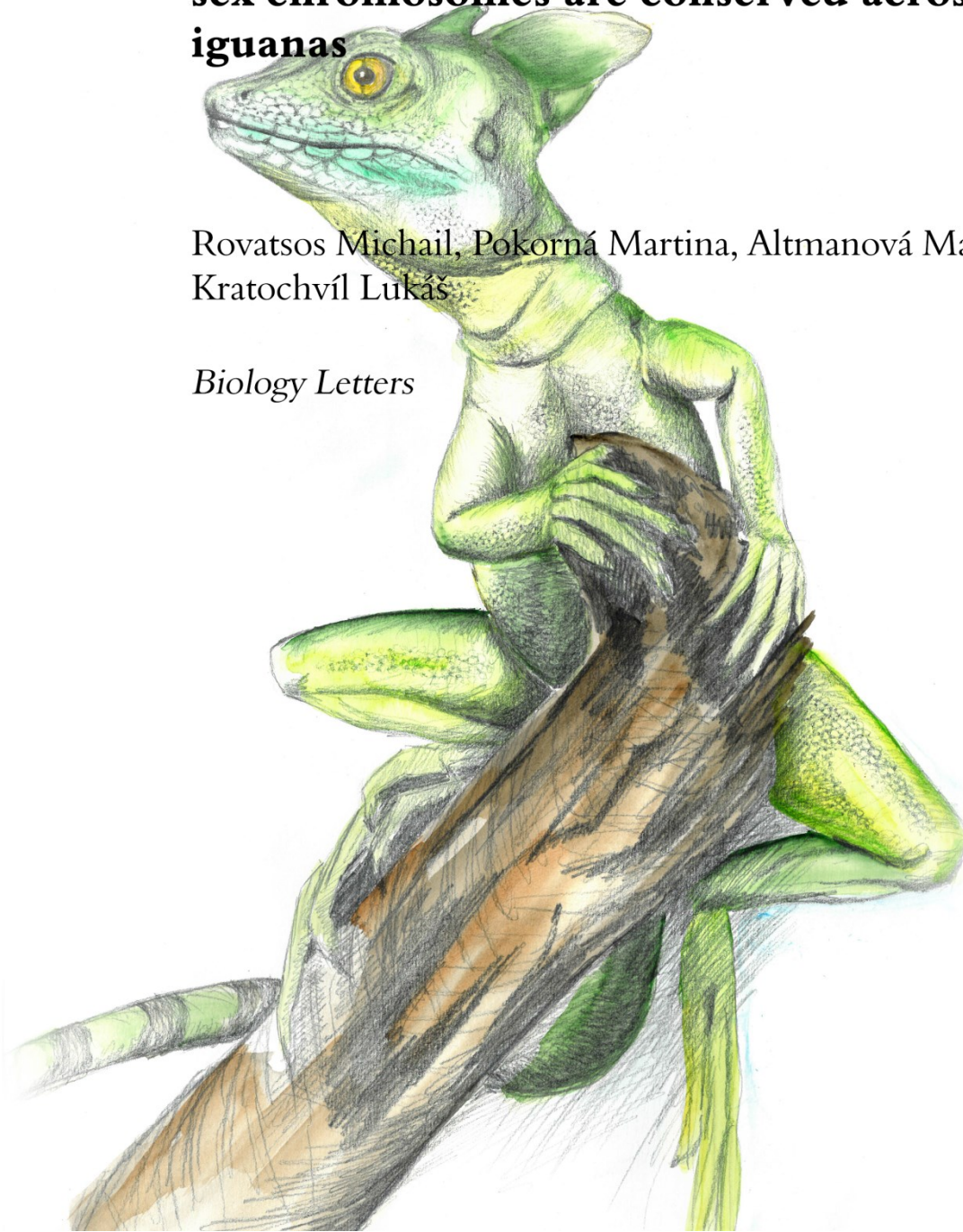




**Cretaceous park of sex determination:  
sex chromosomes are conserved across  
iguanas**

Rovatsos Michail, Pokorná Martina, Altmanová Marie,  
Kratochvíl Lukáš

*Biology Letters*



















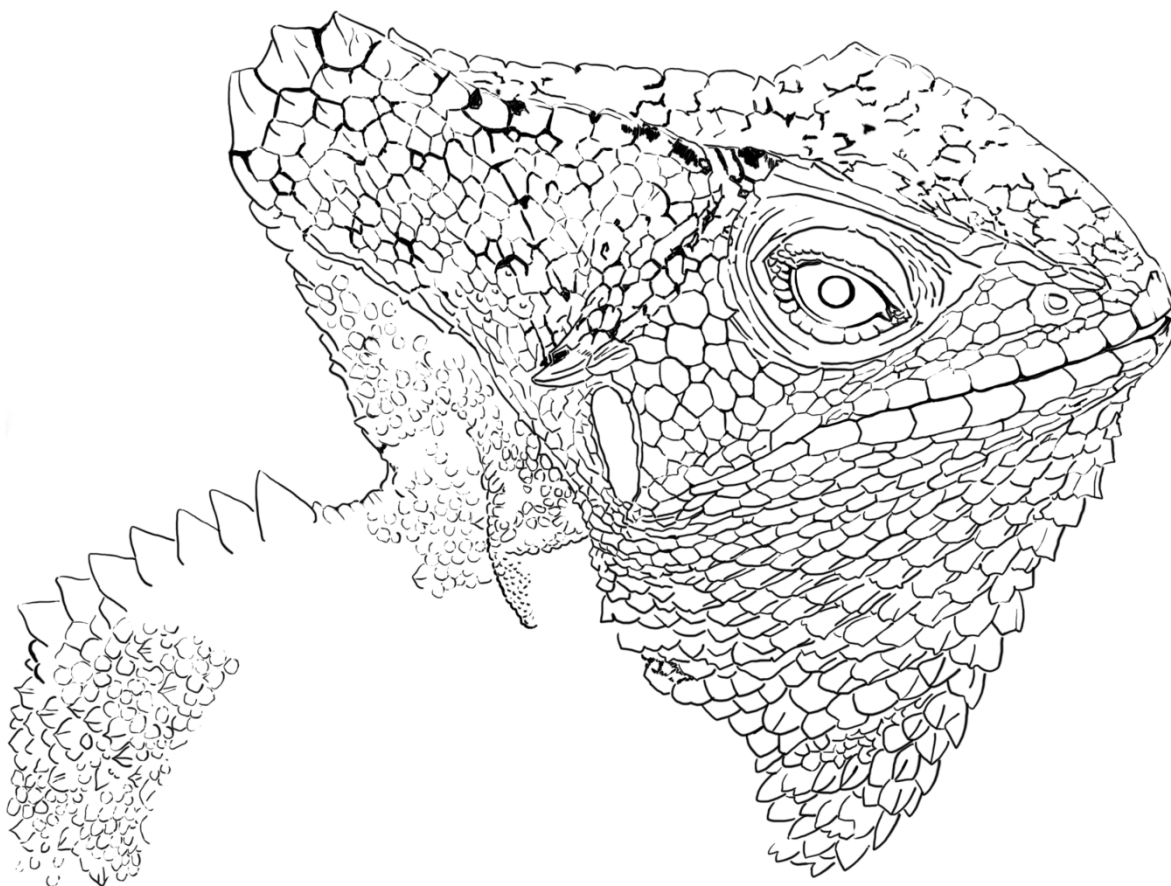




**Sex chromosomes in iguanas (Squamata: Pleurodonta): All but basilisks the same**

Altmanová Marie, Rovatsos Michail, Johnson Pokorná Martina, Veselý Milan, Wagner Florian, Kratochvíl Lukáš

*Rukopis*









































## PUBLIKACE IV

---

### **Multiple sex chromosomes in the light of female meiotic drive in amniote vertebrates**

Pokorná Martina, Altmanová Marie,  
Kratochvíl Lukáš

*Chromosome Research*

























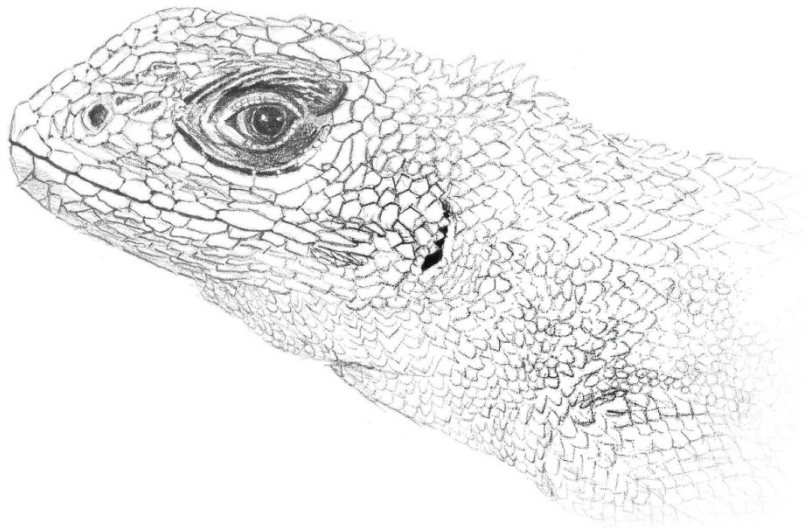
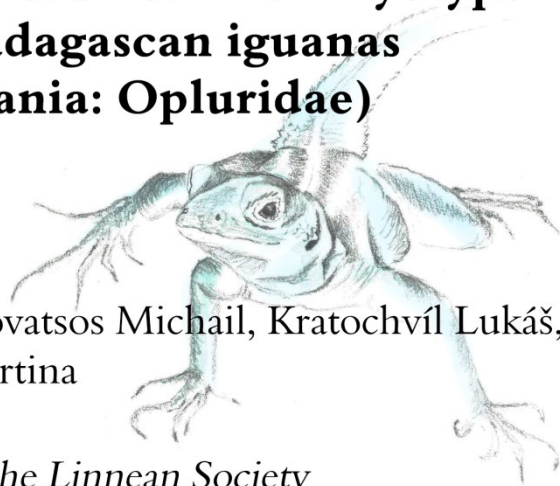
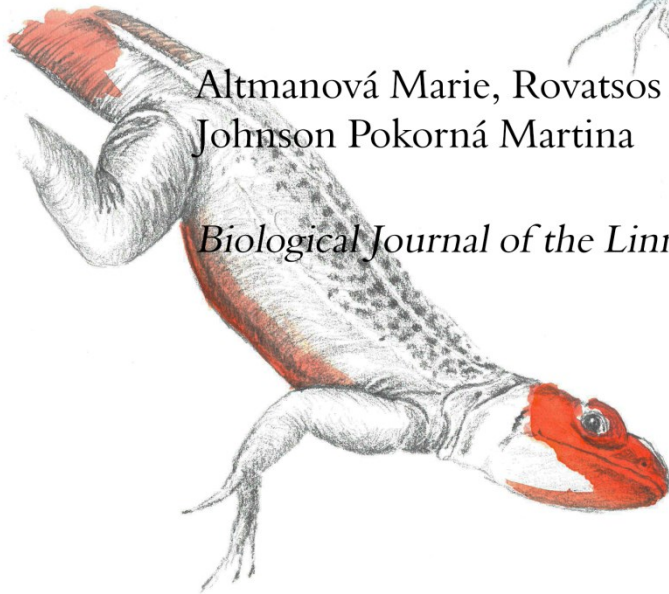




**Minute Y chromosomes and karyotype evolution in Madagascan iguanas (Squamata: Iguania: Opluridae)**

Altmanová Marie, Rovatsos Michail, Kratochvíl Lukáš,  
Johnson Pokorná Martina

*Biological Journal of the Linnean Society*



















































**Interstitial telomeric motifs in  
squamate reptiles: When the exceptions  
outnumber the rule**

Rovatsos Michail, Kratochvíl Lukáš, Altmanová Marie,  
Johnson Pokorná Martina

*PLoS ONE*





































## ZÁVĚR

Leguáni jsou v karyotypu poměrně konzervativní, což je pravděpodobně synapomorfii všech šupinatých plazů, a tyto cytogenetické charakteristiky sdílejí i v liniích prostorově izolovaných velkou geografickou vzdáleností (**Úvod, Publikace V**). Ancestrální karyotyp s  $2n = 36$  je v linii široce rozšířený a je sdílen se sesterskou skupinou Acrodonta. Zvýšené tempo chromosomových přestaveb bylo pozorováno v rodě *Polychrus* a u dalších rodů koreluje s jejich druhovou bohatostí (**Úvod, Publikace III**). V rámci leguánů byla dosud detekována pouze samčí heterogamie, což lze považovat za jejich apomorfii vzhledem k infrařádu Iguania, kam náleží. Značná část druhů však disponuje homomorfními pohlavními chromosomy, jejichž odhalení zřejmě komplikuje euchromatická povaha chromosomu Y (**Úvod, Publikace V**). Ve skupině byl zaznamenán překvapivě častý nezávislý vznik mnohočetných pohlavních chromosomů  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ , který je částečně spjat s vyšší mírou chromosomových přestaveb v karyotypu (**Úvod**). Statistická analýza distribuce mnohočetných pohlavních chromosomů u amniotických obratlovců ukázala, že evoluce těchto pohlavních chromosomů je významně ovlivněna typem heterogamie s mnohem častějším vznikem v systému XX/XY, neboť selekce na vyvážený poměr pohlaví zřejmě potlačuje fixaci mnohočetných pohlavních chromosomů v systému ZZ/ZW, které by jinak upřednostnil samičí meiotický tah (**Publikace IV**). Molekulárními přístupy se podařilo předložit přímý důkaz existence homologických pohlavních chromosomů v rámci šupinatých plazů, konkrétně v rodě *Anolis* (**Publikace I**). Následně bylo prokázáno, že tyto pohlavní chromosomy vznikly již u společného předka všech leguánů a jejich stáří lze odhadnout na 120 miliónů let. Tímto byla vyvrácena všeobecně tradovaná hypotéza, že stabilní pohlavní chromosomy jsou apomorfii teplokrevných obratlovců (**Publikace II a III**). Současně bylo demonstrováno, že bazilišci tuto homologii nesdílí a tedy, že i značně diferencované pohlavní chromosomy s vyvinutou kompenzací genové dávky mohou vzácně projít „turn-overem pohlavních chromosomů“. Avšak mechanismus tohoto jevu spolu s pohlavními chromosomy bazilišků a jejich genetickým obsahem zůstávají zatím neznámými (**Publikace II a III**).

Přestože aktuální studie zabývající se homologii pohlavních chromosomů leguánů a několika výše zmíněných skupin plazů značně upravily pohled, jak vnímat stabilitu determinace pohlaví u šupinatých plazů, dosavadní detailní znalosti v rámci celkové diverzity jsou stále velmi malé a o některých liniích není známo prakticky nic. Samotné cytogenetické přístupy mohou být v některých případech, jako například u slabě diferencovaných pohlavních chromosomů, příliš hrubé. Byla, a stále tak je patrná, evidentní nutnost propojit několik přístupů, abychom získali hlubší vhled do řešené problematiky. Pro odhalení pohlavních chromosomů a části jejich genového obsahu se ukazuje jako velmi vhodná kombinace cytogenetických metod vizualizujících diferencované pohlavní chromosomy a následná SNP (*single nucleotide polymorphism*) analýza transkriptomu heterogametického pohlaví. Takto se podařil odkrýt částečný genový obsah Z chromosomu ještěrky *Takydromus sexlineatus* a odhalit, že ještěřčí pohlavní chromosomy obsahují stejné geny jako pohlavní chromosomy savců včetně člověka (Rovatsos et al. 2016). Na základě analogické analýzy u chameleonů již například víme, že pohlavní chromosomy v infrařádu Iguania (leguáni, chameleoni a agamy) vznikly nezávisle, což opět potvrzuje platnost obecné hypotézy ancestrálního ESD a odvozeného GSD (nepublikováno). Dalším perspektivním přístupem se jeví metoda RAD (*Restriction Associated DNA*) sekvenování (Gamble a Zarkower 2014, Gamble 2016), která umožnila odhalit typ heterogamie u celého spektra gekoních druhů a odhadnout až 25 přechodů mezi pohlavně

determinačními systémy gekonů (Gamble et al. 2015). Zcela recentně byl touto metodou potvrzen výskyt pohlavních chromosomů typu XX/XY krajty a hroznýše (Gamble et al. 2017). Výhodou tohoto přístupu je fakt, že jej lze použít „naslepo“ bez znalosti mechanismu určení pohlaví. Na druhou stranu oproti SNP analýze transkriptomu je potřeba RAD-sekvenovat více jedinců stejného pohlaví a získanou informací jsou sice pohlavně specifické markery heterogametického pohlaví, avšak s velmi malou šancí získat sekvence genů (Gamble a Zarkower 2014).

Přibývající znalosti o pohlavních chromosomech a jejich genetickém obsahu, pak díky možnosti aplikovat nejrůznější pokročilé analýzy (Deakin et al. 2016, Rupp et al. 2017, Vicoso et al. 2013) umožňují již komplexnější evoluční vzhled do celé problematiky. Ukazuje se například, že zatímco v některých liniích se pohlavní chromosomy vyvinuly z různých autosomů, v jiných případech pozorujeme nezávislý výběr stejného páru autosomů pro funkci pohlavních chromosomů (shrnutí v Ezaz et al. [2017]). Příkladem nezávislé ko-opce pohlavních chromosomů jsou například leguáni (XY) a želvy čeledi Trionychidae (ZW; Kawagoshi et al. 2009); ještěrky (ZW; Rovatsos et al. 2016c) a živořodí savci (XY). Zajímavé je, že přestože pohlavní chromosomy vznikly ze stejného páru autosomů, liší se v typu heterogamie. Studium skupin s nezávisle ko-optovanými pohlavními chromosomy tak umožní studovat evoluci stejného genetického materiálu v různých podmínkách evolučních procesů.

Výzkum pohlavních chromosomů plazů poskytuje kromě zásadních informací pro celkové porozumění evoluci pohlavních chromosomů a determinaci pohlaví už i konkrétní praktické výstupy. Jedním z nich je například molekulární identifikace pohlaví u druhů s velmi malým pohlavním dimorfismem, případně u mláďat. Toto bylo aplikovatelné donedávna pouze u savců a ptáků (například Fridolfsson a Ellegren 1999, Fernando a Melnick 2001). V současnosti je možné určit pohlaví z malého vzorku tkáně kromě leguánů také pro dalších zhruba 3000 druhů plazů a tedy celkem zhruba polovinu diverzity této skupiny (nepočítaje ptačí linii; Rovatsos a Kratochvíl, v tisku). Kromě chovatelských ambicí je znalost pohlaví jedince nebo poměru pohlaví v populacích zcela zásadní například pro ochrannářské účely *in situ* nebo v managementu zoologických zahrad (Rovatsos et al. 2015e).

Disertační práce a publikace v ní zařazené přináší důležité poznatky o evoluci pohlavních chromosomů a karyotypů leguánů. Přestože je práce omezena na jediný, byť široký taxon, zjištěné výsledky umožňují ověřit obecné platnosti hypotéz o evoluci pohlavních chromosomů a základního uspořádání genomu stanovených studiem jiných (savčích a ptačích) modelových organismů. Získané znalosti také otevírají řadu dalších otázek spojených se studovanými tématy. Například jaký je funkční rozsah leguáního Y chromosomu? Jak velká je pseudoautosomální oblast? Obsahuje Y-specifická část chromosomu pouze pohlaví určující gen nebo i další funkční geny a jsou patrné mechanismy, které tyto geny chrání před degenerací? Lze pozorovat jednotlivá strata na pohlavních chromosomech podobně jako u příbuzných ptáků? Pokud ano, jak se liší stratum/strata ancestrálních pohlavních chromosomů a neopohlavních chromosomů? Který gen je faktorem rozhodujícím o pohlaví a zastává tento gen stejnou funkci i u jiných živočichů? Jaký je osud stejného genetického materiálu u leguáního (XX/XY) a želvího (ZZ/ZW) systému pohlavních chromosomů v rozdílném typu heterogamie? Co se stalo s pohlavními chromosomy bazilišků? A je známa tato situace i u jiných organismů? Fúzí některé chromosomy častěji než jiné? Co se dělo s karyotypem v rodě *Polychrus*? Jsme schopni ověřit

platnost hypotézy lokální adaptace a nalézt konkrétní geny, které táhly chromosomovou speciaci? S každým krokem poznání nám paradoxně vyvstávají další a další otázky, které je potřeba zodpovědět.

Současná doba nám nabízí dech beroucí možnosti čtení a softwarové analýzy jednotlivých genů i celých genomů z nejrůznějších vzorků a v tomto světle přínos a atraktivita cytogenetických přístupů bledne. Proto jedním z dílčích cílů předkládané disertační práce bylo také ukázat, že u značné části biodiverzity nevíme o genomu a pohlavních chromosomech prakticky vůbec nic a v takovém případě i základní cytogenetika stále hraje nezastupitelnou roli. Moderní cytogenetické metody, jako je sortování chromosomů či jejich mikrodisekce a vizualizace *in situ* fyzickým mapováním konkrétních sekvencí či malovacími sondami, tak do jisté míry zpřesňují základní cytogenetické analýzy, z jejichž poznatků a výsledků vychází, a vytváří esenciální propojení mikroskopického světa chromosomů a sekvencí nukleových kyselin.

## Literatura

- Deakin JE, Edwards MJ, Patel H, O’Meally D, Lian J, Stenhouse R, Ryan S, Livernois AM, Azad B, Holleley CE, et al.** (2016) Anchoring genome sequence to chromosomes of the central bearded dragon (*Pogona vitticeps*) enables reconstruction of ancestral squamate macrochromosomes and identifies sequence content of the Z chromosome. *BMC Genomics* 17:447.
- Ezaz T, Srikulnath K, Graves JAM** (2017) Origin of amniote sex chromosomes: An ancestral super-sex chromosome, or common requirements? *Journal of Heredity* 108:94–105.
- Fernando P, Melnick DJ** (2001) Molecular sexing eutherian mammals. *Molecular Ecology Notes* 1:350–353.
- Fridolfsson AK, Ellegren H** (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 31:116–121.
- Gamble T** (2016) Using RAD-seq to recognize sex-specific markers and sex chromosome systems. *Molecular Ecology* 25:2114–2116.
- Gamble T, Zarkower D** (2014) Identification of sex-specific molecular markers using restriction site-associated DNA sequencing. *Molecular Ecology Resources* 14:902–913.
- Gamble T, Coryell J, Ezaz T, Lynch J, Scantlebury DP, Zarkower D** (2015) Restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) reveals an extraordinary number of transitions among gecko sex-determining systems. *Molecular Biology and Evolution* 32:1296–1309.
- Gamble T, Castoe TA, Nielsen SV, Banks JL, Card DC, Schield DR, Schuett GW, Booth W** (2017) The discovery of XY sex chromosomes in a *Boa* and *Python*. *Current Biology* 27:1–6.
- Kawagoshi T, Uno Y, Matsubara K, Matsuda Y, Nishida C** (2009) The ZW micro-sex chromosomes of the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae, Testudines) have the same origin as chicken chromosome 15. *Cytogenetic and Genome Research* 125:125–131.
- Rovatsos M, Vukić J, Kratochvíl L** (2016) Mammalian X homolog acts as sex chromosome in lacertid lizards. *Heredity* 117:8–13.
- Rupp SM, Webster TH, Olney KC, Hutchins ED, Kusumi K, Wilson Sayres MA** (2017) Evolution of dosage compensation in *Anolis carolinensis*, a reptile with XX/XY chromosomal sex determination. *Genome Biology and Evolution* 9:231–240.
- Vicoso B, Emerson JJ, Zektser Y, Mahajan S, Bachtrog D** (2013) Comparative sex chromosome genomics in snakes: Differentiation, evolutionary strata, and lack of global dosage compensation. *PLoS Biology* 11:e1001643.

## Seznam spoluautorských publikací souvisejících se studovanou problematikou, které nejsou součástí disertační práce

- Rovatsos M, Johnson Pokorná M, **Altmanová M**, Kratochvíl L (2016) Mixed-up sex chromosomes: identification of sex chromosomes in the X1X1X2X2/X1X2Y system of the legless lizards of the genus *Lialis* (Squamata: Gekkota: Pygopodidae). *Chromosome Research* 149:282–289.
- Johnson Pokorná M, **Altmanová M**, Rovatsos M, Velenský P, Vodička R, Rehák I, Kratochvíl L (2016) First description of the karyotype and sex chromosomes in the Komodo dragon (*Varanus komodoensis*). *Cytogenetic and Genome Research* 148:284–291.
- Rovatsos M, Vukić J, **Altmanová M**, Johnson Pokorná M, Moravec J, Kratochvíl L (2016) Conservation of sex chromosomes in lacertid lizards. *Molecular Ecology* 25:3120–3126.
- Rovatsos M, Johnson Pokorná M, **Altmanová M**, Kratochvíl L, Velenský P, et al. (2015) Sexing of Komodo dragons, *Varanus komodoensis*. *Gazella (Zoo Praha)* 42:93–107.
- Rovatsos M, Johnson Pokorná M, **Altmanová M**, Kratochvíl L (2015) Female heterogamety in Madagascar chameleons (Squamata: Chamaeleonidae: *Furcifer*): differentiation of sex and neo-sex chromosomes. *Scientific Reports* 5:13196.
- Rovatsos M, **Altmanová M**, Johnson Pokorná M, Kratochvíl L (2014) Novel X-linked genes revealed by qPCR in the green anole, *Anolis carolinensis*. *G3-Genes Genomes Genetics* 4:2107–2113.
- Koubová M, Johnson Pokorná M, Rovatsos M, Farkačová K, **Altmanová M**, Kratochvíl L (2014) Sex determination in Madagascar geckos of the genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae): are differentiated sex chromosomes indeed so evolutionary stable? *Chromosome Research* 22:441–452.