

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie**

**Charles University, Faculty of Science
Department of Ecology**

Doktorský studijní program: Ekologie
Doctoral study programme: Ecology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Doctoral thesis



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

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

Mgr. Marie Altmanová

Školitel / Supervisor: prof. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

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

Praha, 2017

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 / Contents

1. Úvod / <i>Introduction</i> —————	5 10
2. Cíle práce / <i>Aims of study</i> —————	7 12
3. Materiál a metodika / <i>Material and methods</i> —————	7 12
4. Výsledky a diskuze / <i>Results and discussion</i> —————	8 13
5. Závěr / <i>Conclusions</i> —————	9 14
Použitá literatura / <i>References</i> —————	15
Životopis / <i>Curriculum vitae</i> —————	17
Seznam publikací s abstrakty / <i>Selected publications with abstracts</i> —————	20

1. Úvod

Disertační práce se věnuje evoluci pohlavních chromosomů a karyotypu u leguánů (Pleurodonta). Pohlaví obratlovců je určeno jedním ze dvou základních typů determinace pohlaví. V environmentálně určeném pohlaví (ESD; *environmental sex determination*) se genotyp samce a samice neliší a spouštěčem diferenciaci gonády embrya je epigenetická informace, zatímco v genotypově určeném pohlaví (GSD; *genotypic sex determination*) je o pohlaví embrya rozhodnuto pohlaví determinujícími geny vázanými na pohlavní chromosomy (Bull 1980). Pohlavní chromosomy mají celou řadu unikátních vlastností, které je odlišují od autosomů, a jejich diferenciaci je tak spojena se vznikem dalších mechanismů zajišťujících funkčnost pohlavně specifických genomů. Dle současných hypotéz se pohlavní chromosomy vyvinuly mnohokrát nezávisle a v rámci obratlovců pozorujeme značnou stabilitu pohlavních chromosomů u ptáků a savců (Veyrunes et al. 2008, Zhou et al. 2014), zatímco u ryb a obojživelníků panuje značná rozmanitost a častý přesmyk mezi jednotlivými typy pohlavních chromosomů (Miura 2008, Kikuchi a Hamaguchi 2013, Sessions et al. 2016). U plazů bývá tradičně uváděna variabilita pohlavně determinačních systémů (Sarre et al. 2004, Ezaz et al. 2009), ale zanesením dat o determinaci pohlaví do fylogenetických vztahů se ukázalo, že v rámci jednotlivých linií jsou také poměrně stabilní (Pokorná a Kratochvíl 2009, Johnson Pokorná a Kratochvíl 2016). Například u leguánů byl zaznamenán výskyt pouze GSD a to se samčí heterogamií (XX/XY) (shrnuto v Olmo a Signorino [2005]). Nicméně u leguánů i u dalších šupinatých plazů chyběla molekulární podpora prokazující původ pohlavních chromosomů a na toto téma bylo po dlouhou dobu publikováno pouze několik prací (Matsubara et al. 2006, Kawai et al. 2009, Pokorná et al. 2011).

Abychom mohli blíže diskutovat evoluci pohlavních chromosomů a karyotypu u leguánů, vypracovali jsme rešerši dostupných cytogenetických prací o leguánech a na základě vytvořeného datasetu a současné představy o fylogenezi skupiny jsme provedli analýzy ancestrálního stavu obou charakteristik. Z výsledků nebylo jasné, zda homomorfie či heteromorfie pohlavních chromosomů odráží pouze specifickou míru jejich diferenciaci v různých liniích nebo dokládá přítomnost přesmyků pohlavních chromosomů. Díky nově odhalené části genového obsahu X chromosomu leguána *Anolis carolinensis* (dále jako ACA; Alföldi et al. 2011) však bylo možné provést přímý test stability determinačního systému ověřením homologie pohlavních chromosomů.

První tři části disertační práce jsou proto zaměřeny na prozkoumání homologie pohlavních chromosomů metodou porovnání relativní genové dávky ACA X-specifických genů mezi samcem a samicí za použití metody kvantitativní real-time PCR (qPCR). Nejdříve jsme metodu optimalizovali a ověřili její funkčnost na ACA a následně otestovali další druhy anolisů vybraných tak, abychom co nejlépe pokryli diverzitu rodu (Publikace I). Poté jsme již prověřenou metodu qPCR použili na zástupce dalších sedmi čeledí leguánů, v té době pro nás dostupné, a agamu *Pogona vitticeps* s pohlavními chromosomy typu ZZ/ZW (Ezaz et al. 2005) jako outgroup (Publikace II). Díky velmi překvapivým výsledkům u bazilišků (čeled'

Corytophanidae) jsme byli silně motivováni získat zástupce i ze zbývajících čtyř čeledí a zhodnotit celkovou stabilitu mechanismu determinace pohlaví u leguánů (Publikace III).

Ve čtvrté části se zabýváme teoretickou úvahou vzniku mnohočetných pohlavních chromosomů v různých typech heterogamie. Naši pozornost upoutal fakt, že podobně jako leguánů jsou mnohočetné pohlavní chromosomy velmi časté u savců (XX/XY), ale u ptáků (ZZ/ZW) nebyl zaznamenán jediný výskyt tohoto odvozeného typu pohlavních chromosomů (Yoshida a Kitano 2012, Pala et al. 2012). Dosavadní práce ukázaly možnost fixace mnohočetných pohlavních chromosomů samičím meiotickým tahem preferujícím přestavěné chromosomy (Yoshida a Kitano 2012). Proto jsme na základě rozdílného zapojení XY a ZW chromosomů v samičí meióze vytvořili hypotézu předpokládající, že přestavěné pohlavní chromosomy Z nebo W budou sice také upřednostňovány meiotickým tahem, ale jejich fixaci zabrání silná selekce na vyrovnaný poměr pohlaví. K testu této hypotézy jsme nashromáždili údaje o mnohočetných pohlavních chromosomech a typu heterogamie ve skupině Amniota (savci a plazi včetně ptáků) a otestovali naši stanovou hypotézu statistickými přístupy (Publikace IV).

Pátá část práce je věnována detailnější cytogenetické analýze leguání čeledi Opluridae, která je unikátní vzhledem ke svému endemickému výskytu na Madagaskaru. Kompletní geografická izolace trvající patrně déle než 50 milionů let (Townsend et al. 2011, Pyron et al. 2013) a možnost cytogeneticky prověřit šest z celkových osmi recentně uznávaných druhů čeledi, nám umožnily porovnat obecné trendy v evoluci karyotypu a pohlavních chromosomů leguánů. Specifické vlastnosti pohlavních chromosomů opluridů nám také dovolily posoudit obecné možnosti detekce pohlavních chromosomů v karyotypu (Publikace V).

Poslední část práce dokumentuje výskyt intersticiálních telomerických sekvencí (ITS) v karyotypech šupinatých plazů. Shromáždili jsme již dostupná data o (ne)přítomnosti ITS v karyotypech a doplnili je výsledky experimentů, které jsme provedli u zástupců dosud nezkoumaných či málo probádaných čeledí. Výsledky jsme uvedli ve fylogenetickém kontextu, zhodnotili jsme frekvenci výskytu ITS a diskutovali možný mechanismus vzniku ITS v karyotypech šupinatých plazů.

V samotném závěru disertační práce jsou představeny výsledky analýzy ancestrálního stavu diploidního počtu chromosomů leguánů a diskutovány možné souvislosti druhové bohatosti jednotlivých linií se zvýšenou variabilitou v základním uspořádání genomu (nepublikováno).

2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo prozkoumat evoluci pohlavních chromosomů a karyotypů leguánů a zjistit, zda je možné pozorovat určitou podobnost s pohlavními chromosomy savců a ptáků, a zda evoluce pohlavních chromosomů souvisí s uspořádáním karyotypu. Dosažení tohoto základního cíle pak bylo podmíněno splněním celé řady cílů dílčích:

Shromáždit dostupné informace o základním uspořádání genomu leguánů a přítomnosti a typu pohlavních chromosomů a zhodnotit stabilitu obou charakteristik. Současně využít tyto informace k výběru potenciálně zajímavých linií pro další experimenty.

Otestovat společný původ (homologii) pohlavních chromosomů s pomocí ACA X-specifických genů v linii anolisů a posléze i ostatních leguánů a zhodnotit současné hypotézy o stabilitě pohlavně determináčních systémů v rámci amniotických obratlovců (**Publikace I, II, III**).

Porovnat četnost nezávislých vzniků mnohočetných pohlavních chromosomů v rámci skupiny Amniota. Ve vztahu k typu heterogamie otestovat možnost fixace mnohočetných pohlavních chromosomů vlivem samičího meiotického tahu (**Publikace IV**).

V čeledi madagaskarských leguánů provést detailní prozkoumání diferenciacce pohlavních chromosomů a karyotypu použitím molekulárně cytogenetických a molekulárních přístupů (**Publikace V**).

Provéřit karyotypy vybraných zástupců šupinatých plazů na přítomnost intersticiálních telomerických sekvencí (ITS) a zhodnotit, zda objevený vzor a distribuce je důsledkem interchromosomálních přestaveb, případně navrhnout jiná vysvětlení vzniku ITS (**Publikace VI**).

3. Materiál a metodika

Vzhledem k šíři cílů bylo využito nejrůznějších metod základní cytogenetiky (příprava chromosomálních preparátů kultivací leukocytů, barvení a proužkování chromosomů), molekulární cytogenetiky (fluorescenční *in situ* hybridizace s různými typy sond včetně komparativní genomové hybridizace), metod molekulárních (izolace DNA, elektroforéza, PCR, kvantitativní real-time PCR), statistických (Spearmanův korelační koeficient, ANCOVA) a fylogenetických (maximální parsimonie). Pro analýzy obrazu byly použity odpovídající softwarové programy (Metafer, ISIS, IKAROS, Photoshop).

4. Výsledky a diskuse

Na základě rešerše dostupných cytogenetických dat o leguánech a následné analýzy ancestrálního stavu pohlavních chromosomů a karyotypu jsme určili ancestrální karyotyp s $2n = 36$ chromosomů jako široce rozšířený v celé skupině. Zvýšené tempo chromosomálních přestaveb bylo pozorováno v rodě *Polychrus*, u dalších rodů souvisí pravděpodobně s jejich druhovou diverzitou. Samčí heterogamii lze považovat za apomorfii leguánů. Ve více než polovině cytogeneticky prozkoumaných druhů však nebyly pohlavní chromosomy nalezeny, a to patrně z důvodu jejich homomorfie. Analýza ancestrálního stavu také ukázala, že se mnohočetné pohlavní chromosomy vyvinuly u leguánů minimálně dvanáctkrát nezávisle a část těchto vzniků je zřejmě spjata s dalšími přestavbami v karyotypu. Provedená rešerše a výsledky analýzy ancestrálních stavů nám posloužily k vytipování potenciálně zajímavých druhů a linií pro následující studie.

V první části disertační práce (Publikace I – III) jsme se zaměřili na prozkoumání homologie pohlavních chromosomů metodou porovnání relativní genové dávky ACA X-specifických genů mezi samcem a samicí za použití metody kvantitativní real-time PCR (qPCR). Použitá metodika ukázala, že kromě odvozeného stavu u bazilišků (čeleď Corytophanidae), pochází u všech zkoumaných druhů alespoň část genového obsahu jejich X chromosomů od společného předka všech leguánů, a celá skupina tedy disponuje značně stabilními pohlavními chromosomy. Zvolený outgroup (*Pogona vitticeps*) potvrdil rozdílný původ leguáních XX/XY a agamích ZZ/ZW pohlavních chromosomů. Stáří skupiny Pleurodonta se odhaduje zhruba na 120 milionů let (Townsend et al. 2011), čímž leguáni demonstrují stabilitu pohlavních chromosomů srovnatelnou se savci a ptáky. Ačkoliv jednou vzniklé diferencované pohlavní chromosomy jsou evolučně stálé a může se tak jednat o evoluční past podle hypotézy z práce Pokorná a Kratochvíl (2009), ve výjimečném případě může dojít k jejich přesmyku nebo dediferenciaci, jak k tomu patrně došlo u bazilišků.

Statistická analýza distribuce vzniků mnohočetných pohlavních chromosomů amniotických obratlovců ukázala významný vliv typu heterogamie na evoluci tohoto odvozeného typu pohlavních chromosomů. Díky charakteru samičí meiózy je umožněna nenáhodná segregace přestavěných chromosomů způsobená samičím meiotickým tahem. Při jeho účinku na Z a W pohlavní chromosomy by však došlo k vychýlení poměru pohlaví potomků. Chromosom Y se těmito procesům nevystavuje, a proto se mnohočetné pohlavní chromosomy vzniklé v systému samčí heterogamie zafixují snáze než v heterogamii samičí. Pozorovaná distribuce a počet vzniků mnohočetných pohlavních chromosomů v celé skupině Amniota tuto hypotézu podporuje.

V páté části jsme provedli detailní molekulárně cytogenetickou analýzu šesti druhů leguánů z čeledi Opluridae. Základním cytogenetickým vyšetřením jsme stanovili diploidní počet $2n = 36$ chromosomů s morfologií chromosomů odpovídající leguánímu ancestrálnímu karyotypu. Přes značnou konzervativnost v základním uspořádání genomu se druhy v určitých zkoumaných znacích lišily, což nasvědčuje kryptickým intra- a interchromosomálním

přestavbám. Pohlavní chromosom Y, nejmenší chromosom v karyotypu samců, je u opluridů značně degenerovaný a převážně euchromatický. Podrobné vyšetření chromosomu Y použitím fluorescenční *in situ* hybridizace s různými mikrosatelitovými motivy odhalilo mezidruhovou variabilitu v akumulaci repetitivních sekvencí, a tyto rozdíly byly ve shodě s mírou úspěšnosti komparativní genomové hybridizace detekovat pohlavně specifické rozdíly. Vzhledem k heteromorfii a diferenciaci pohlavních chromosomů opluridů tak dosažené výsledky naznačily, že metoda komparativní genomové hybridizace není univerzálním přístupem k odhalení sekvenčně diferencovaných pohlavních chromosomů a její citlivost k detekci pohlavních rozdílů v genomech vzrůstá s akumulací pohlavně specifických repetitivních sekvencí.

V poslední části práce jsme prověřili karyotyp 30 druhů z celkem 17 čeledí šupinatých plazů metodou fluorescenční *in situ* hybridizace se sondou nesoucí konzervativní telomerický motiv a získané výsledky porovnali s dostupnými daty pro dalších 38 druhů. Ze všech zahrnutých 68 druhů jich celkem 35 vykazovalo na chromosomech přítomné intersticiální telomerické sekvence v různém množství a pozici, což nasvědčuje skutečnosti, že se v rámci šupinatých plazů jedná spíše o běžný jev. Navzdory v této skupině plazů poměrně konzervativnímu základnímu uspořádání genomu, naznačují získané výsledky časté kryptické přestavby chromosomů nebo šíření telomerických sekvencí v genomech v důsledku působení mobilních elementů.

5. Závěr

Disertační práce přináší důležité poznatky o evoluci pohlavních chromosomů a karyotypů leguánů. Zahrnuté publikace rozvíjí studovanou problematiku experimentálními i teoretickými přístupy, a přestože je práce fylogeneticky zacílena pouze na jedinou linii šupinatých plazů, zjištěné výsledky umožňují ověřit obecné platnosti hypotéz o evoluci pohlavních chromosomů a základního uspořádání genomu. Mezi stěžejní dosažené výsledky patří zejména odhalení stabilních a sekvenčně dobře diferencovaných pohlavních chromosomů leguánů, které dokládají, že evoluční stabilita pohlavních chromosomů není podmíněna homoiotermní endotermií živočichů, jak se dříve uvažovalo.

1. Introduction

This PhD thesis is focused on the evolution of the sex chromosomes and karyotypes of the iguanas (Pleurodonta). The sex of vertebrates is decided by one of two basic types of sex determination. Under environmental sex determination (ESD), the male and female genotypes do not differ and the embryo differentiation of the gonads is triggered by epigenetics; whereas under genotypic sex determination (GSD) the sex of the embryo is determined by sex-determining genes linked to sex chromosomes (Bull 1980). Sex chromosomes demonstrate several unique features distinguishing them from autosomes and their differentiation is associated with the emergence of other mechanisms that ensure the function of sexually specific genomes. According to current hypotheses, sex chromosomes have developed many times independently, and in vertebrates, we recognize a considerable stability of sex chromosomes in birds and mammals (Veyrunes et al. 2008, Zhou et al. 2014), while fishes and amphibians demonstrate extensive variation and frequent turnovers among different types of sex chromosomes (Miura 2008, Kikuchi and Hamaguchi 2013, Sessions et al. 2016). Traditionally, reptiles have been considered as being very variable in sex determination (Sarre et al. 2004, Ezaz et al. 2009), but phylogenetic analyses have suggested that majority of lineages is stable in sex determination (Pokorná and Kratochvíl 2009, Johnson Pokorná and Kratochvíl 2016). For instance, in iguanas, only GSD with male heterogamety (XX/XY) has been reported (reviewed in Olmo and Signorino [2005]). However, both iguanas and other squamate reptiles have previously lacked molecular support demonstrating the origin of their sex chromosomes and only few of studies have been published in past years (Matsubara et al. 2006, Kawai et al. 2009, Pokorná et al. 2011).

In order to further examine the evolution of sex chromosomes and karyotype in iguanas, we researched all available iguana cytogenetic studies and used the created dataset in conjunction with the current concept of phylogenetic relationships in the group to analyse the ancestral states of both characteristics. From the results it was not clear whether sex chromosome homomorphy or heteromorphy reflects only a specific rate of differentiation in different lineages or suggests the presence of sex chromosome turnovers. Thanks to newly discovered X chromosome gene content in *Anolis carolinensis* (later in text referred as ACA; Alföldi et al., 2011), a direct test of the stability of sex determination was possible through the verification of the homology of sex chromosomes.

The first three parts of the thesis are therefore focused on examining the homology of sex chromosomes by comparing the relative gene dose of ACA X-specific genes between males and females using quantitative real-time PCR (qPCR). First, we optimized and verified the accuracy of the method on ACA and then we tested other species of anoles selected in order to cover the genus diversity (Publication I). Subsequently, we used an accurate qPCR method on representatives of seven other iguana families, which were the only ones available at that time, and the agamid *Pogona vitticeps* with ZZ/ZW sex chromosomes (Ezaz et al. 2005) as an outgroup (Publication II). Due to very surprising results in basilisks (family Corytophanidae), we were strongly motivated to get representatives from the remaining four

families and to further examine the overall stability of sex determination mechanisms in iguanas (Publication III).

In the fourth part of thesis we consider, in a theoretical way, the occurrence of multiple sex chromosomes in different types of heterogamety. Our attention was drawn to the fact that multiple sex chromosomes are very common in mammals (XX/XY) but in birds (ZZ/ZW), there is no single occurrence of this derived type of sex chromosomes (Yoshida and Kitano 2012, Pala et al. 2012). A previous study suggested the possibility of the fixation of multiple sex chromosomes by female meiotic drive preferring rearranged chromosomes (Yoshida and Kitano 2012). Therefore, due to the different involvement of XY and ZW chromosomes in female meiosis, we created a hypothesis assuming that rearranged Z or W sex chromosomes will be preferred by meiotic drive as well, but strong selection on a balanced sex ratio prevents their fixation. To test this hypothesis, we collected data on multiple sex chromosomes and types of heterogamety in the Amniota (mammals and reptiles including birds) and tested our hypothesis by statistical approaches (Publication IV).

The fifth part of the thesis is devoted to a more detailed cytogenetic analysis of the family Opluridae, which is unique due to its endemic occurrence in Madagascar. A complete geographic isolation lasting at least 50 million years (Townsend et al. 2011, Pyron et al. 2013) and the possibility of the cytogenetic examination of six out of a total of eight recently recognized family species enabled us to compare the general trends in the evolution of the karyotypes and sex chromosomes in iguanas. The specific features of the oplurid sex chromosomes also inspired us to evaluate the general possibilities of detecting sex chromosomes in the karyotype (Publication V).

The sixth part of the thesis (Publication VI) documents the occurrence of interstitial telomeric sequences (ITS) in karyotypes of squamate reptiles. We have gathered all available data regarding the presence/absence of ITS in squamate reptiles and complemented the dataset with the results of our experiments performed on representatives of families that have not yet been investigated (or very poorly). We presented the results in a phylogenetic context, evaluated the frequency of occurrence of ITS and discussed the possible mechanism of ITS formation in the karyotypes of squamate reptiles.

In the final part of the thesis, we present the results of the ancestral state analysis of the iguana chromosome diploid number and discuss possible relationships between the species richness in particular lineages and the increased variability in the basic genome organization (unpublished).

2. Aims of the study

The main aim of this work was to investigate the evolution of sex chromosomes and karyotypes of iguanas, and to discover whether any similarity can be observed between the sex chromosomes of mammals and birds, and whether the evolution of sex chromosomes is related to karyotype arrangement. Achievement of this essential goal was based on the completion of a number of intermediate goals:

Collate available data on iguana basic genome organization and the presence and type of sex chromosomes, and evaluate the stability of both characteristics. At the same time, use this information to select potentially interesting lineages for further experiments.

Test the common origin (homology) of sex chromosomes using ACA X-specific genes in the anole lineage and then in other iguanas, and evaluate the current hypotheses about the stability of sex determination systems in amniotic vertebrates (**Publications I, II, III**).

Compare the frequency of independent origins of multiple sex chromosomes in the Amniota group. In relation to the type of heterogamety, test the possibility of the fixation of multiple sex chromosomes by female meiotic drive (**Publication IV**).

In the family of Madagascan iguanas, conduct a detailed examination of sex chromosome differentiation and karyotype using molecular cytogenetic and other molecular approaches (**Publication V**).

Investigate the karyotypes of selected representatives of squamate reptiles for the presence of interstitial telomeric sequences (ITS) and evaluate whether the discovered pattern and distribution resulted from interchromosomal rearrangements, and suggest other explanations for the emergence of ITS based on gathered data (**Publication VI**).

3. Material and methods

Due to the wide and relatively detailed goals, a variety of methods was used, including basic cytogenetics (chromosomal preparations by leucocyte cultivation, staining and banding of chromosomes), molecular cytogenetics (fluorescence *in situ* hybridization with different types of probes including comparative genomic hybridization), molecular techniques (DNA isolation, PCR, quantitative real-time PCR), statistics (Spearman's correlation coefficient, ANCOVA) and phylogenetics (maximum parsimony, maximum likelihood). Image analysis was performed using the appropriate software (Metafer, ISIS, IKAROS, Photoshop).

4. Results and discussion

Based on our extensive review of the available iguana cytogenetic data and the subsequently performed ancestral state analysis of the sex chromosomes and karyotypes, we determined the ancestral karyotype to be $2n = 36$ chromosomes, spread widely across the group. An increased rate of chromosomal rearrangements was observed in the genus *Polychrus*. In other genera this increased rate may be a reflection of their species diversity. The occurrence of exclusively male heterogamety can be considered as the apomorphy of the iguanas. In more than half of the cytogenetically investigated species, however, the sex chromosomes were not found, probably due to their homomorphy. Analysis of the ancestral state also showed that multiple sex chromosomes developed independently at least twelve times in iguanas, and some of these origins are probably associated with other karyotype rearrangements. The review of cytogenetic data and the results of the ancestral state analysis enabled us to identify potentially interesting species and lineages for the following studies.

In the first part of the thesis (Publications I – III), we focused on the examination of the homology of sex chromosomes by comparison of the relative gene doses of ACA X-specific genes between males and females using quantitative real-time PCR (qPCR). With exception of the derived state in basilisks (Corytophanidae), the qPCR analyses revealed that all examined species share at least part of their X chromosome gene content with the common iguana ancestor, and thus possess highly conserved sex chromosomes. The selected outgroup (*Pogona vitticeps*) confirmed the different origins of iguana XX/XY and agamid ZZ/ZW sex chromosomes. The age of the Pleurodonta group is estimated at approximately 120 million years (Townsend et al. 2011), thus iguanas demonstrate a stability of their sex chromosomes comparable to mammals and birds. Although differentiated sex chromosomes, once formed, are evolutionarily stable and may indeed act as an evolutionary trap as hypothesized in Pokorná and Kratochvíl (2009); in an exceptional case, the turnover or dedifferentiation of sex chromosomes may occur, as probably happened in basilisks.

Statistical analysis of the distribution of multiple sex chromosomes in amniotic vertebrates showed a significant influence of heterogamety on the evolution of this derived type of sex chromosome. Due to the character of female meiosis, the non-random segregation of rearranged chromosomes via female meiotic drive is possible. However, in the case of Z and W chromosomes, the selection balancing sex ratio will act against the preferable fixation of rearranged sex chromosomes. Chromosome Y is not exposed to these processes, thus the multiple sex chromosomes generated in male heterogamety are more likely to be fixed than under female heterogamety. The observed distribution and number of multiple sex chromosome origins in amniotes fits very well with this prediction.

In the fifth part, we performed a detailed molecular cytogenetic analysis of six iguana species from the family Opluridae. By basic cytogenetic examination, we determined the diploid number of $2n = 36$ chromosomes with chromosome morphology corresponding to the iguana ancestral karyotype. Despite considerable conservancy in the level of basic genome

organization, the species differed in some of the investigated features, indicating cryptic intra- and interchromosomal rearrangements. Sex chromosome Y, the smallest chromosome of the male karyotype, is largely degenerated and mostly euchromatic in oplurids. Detailed examination of the Y chromosome using fluorescence *in situ* hybridization with different microsatellite motifs revealed interspecific variability in the accumulation of repetitive sequences and these differences were consistent with the success of the comparative genomic hybridization used to detect sex-specific differences. Based on the heteromorphy and sequence differentiation of the oplurid sex chromosome, the obtained results suggest that the method of comparative genomic hybridization is not a universal approach for the detection of sex chromosomes and its sensitivity to reveal sex-specific genomic differences increases with the accumulation of sex-specific repetitive sequences.

In the final part of the study we examined the karyotype of 30 species from 17 families of squamate reptiles by fluorescence *in situ* hybridization with a probe carrying a conservative telomeric motif, and compared our results with the data available from 38 other species. Out of the 68 included species, 35 showed the presence of ITS, varying in amount and chromosome position, indicating that ITS occurrence is rather common in squamate reptiles. Despite the generally conserved karyotypes in this reptile group, different patterns of ITS distribution suggest frequent cryptic rearrangements of chromosomes or the spreading of telomeric sequences by mobile elements.

5. Conclusions

This PhD thesis brings important insights into the evolution of sex chromosomes and karyotypes of iguanas. The publications included in this thesis develop the subjects of study by various experimental and theoretical approaches, and although the work is focused on the only lineage of squamate reptiles, the results help to verify the general validity of hypotheses about the evolution of sex chromosomes and the basic genome organization even in the broader context. One of the major take-home messages is that the evolutionary stability of sex chromosomes is not conditioned by homoiothermic endothermy as it was previously thought, as the iguanas, typical poikilotherms, possess stable and sequentially well-differentiated sex chromosomes.

6. Použitá literatura / References

- 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.
- Bull J (1980) Sex determination in reptiles. *Quarterly Review of Biology* 55: 3–21.
- 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 (2009) Sex chromosome evolution in lizards: Independent origins and rapid transitions. *Cytogenetic and Genome Research* 127: 249–260.
- Johnson Pokorná M, Kratochvíl L (2016) What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates? *Biological Reviews* 91: 1–12.
- 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.
- Kikuchi K, Hamaguchi S (2013) Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental Dynamics* 242: 339–353.
- 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.
- 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.
- Olmo E, Signorino G (2005) *Chromorep: A reptile chromosomes database*. <http://chromorep.univpm.it>.
- 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.
- 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, Giovannotti M, Kratochvíl L, Kasai F, Trifonov VA, O’Brien PCM, Caputo V, Olmo E, Ferguson-Smith MA, Rens W (2011) Strong conservation of the bird

- Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence. *Chromosoma* 120: 455–468.
- 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.
- 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.
- 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.
- Veyrunes F, Waters PD, Miethke P, Rens W, Mcmillan D, Alsop AE, Grützner F, Deakin JE, Whittington CM, Schatzkammer K, *et al.* (2008) Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Research* 18: 965–973.
- Yoshida K, Kitano J (2012) The contribution of female meiotic drive to the evolution of neo-sex chromosomes. *Evolution* 66: 3198–3208.
- 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.

Životopis / *Curriculum Vitae*

Narozena / Born 20. 10. 1987 v Plzni, Československo / *October 20th 1987 Pilsen, Czechoslovakia*

Vzdělání / *Education*

od / *since* 2013 postgraduální studium, katedra ekologie, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta / *Ph.D. study, Department of Ecology, Charles University, Faculty of Science*

2011 – 2013 magisterské studium, katedra ekologie, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta / *MSc. study, Department of Ecology, Charles University, Faculty of Science*

Zaměstnání / *Professional experience:*

od / *since* 2017 vědecký pracovník v rámci projektu GAČR (Grantová agentura České republiky) č. 17-22604S

Vědecká stáž / *Research fellowship*

2016 *Molecular Cytogenetics Laboratory, Centre for Veterinary Science, Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, UK*

Granty / *Grants*

od / *since* 2017 člen řešitelského týmu grantového projektu GAČR (Grantová agentura České republiky) č. 17-22604S / *team investigator of the project GAČR (Grant Agency of Czech Republic) No. 17-22604S*

od / *since* 2016 **hlavní řešitelka** grantového projektu GAUK (Grantová agentura Univerzity Karlovy) č. 1012216 / ***principal investigator of the project GAUK (Grant Agency of Charles University) No. 1012216***

od / *since* 2016 spoluřešitelka grantového projektu GAUK (Grantová agentura Univerzity Karlovy) č. 1073416 / *investigator of the project GAUK (Grant Agency of Charles University) No. 1073416*

od / *since* 2015 spoluřešitelka grantového projektu GAUK (Grantová agentura Univerzity Karlovy) č. 334515 / *investigator of the project GAUK (Grant Agency of Charles University) No. 334515*

2012 – 2014 **hlavní řešitelka** grantového projektu GAUK (Grantová agentura Univerzity Karlovy) č. 591712 / ***principal investigator of the project GAUK (Grant Agency of Charles University) No. 591712***

2012 – 2013 spoluřešitelka grantového projektu GAUK (Grantová agentura Univerzity Karlovy) č. 527112 / *investigator of the project GAUK (Grant Agency of Charles University) No. 527112*

Členství ve vědeckých organizacích / *Membership in scientific societies*

European Cytogeneticists Association

European Society for Evolutionary Biology

Publikace / *Publications*

Altmanová M, Rovatsos M, Johnson Pokorná M, Wagner F, Kratochvíl L. Sex chromosomes in iguanas (Squamata: Pleurodonta): All but basilisks the same. Zasláno k revizi / *submitted*.

Rovatsos M, **Altmanová M**, Johnson Pokorná M, Augstenová B, Kratochvíl L. Sex chromosome evolution and phylogenetic relationships within caenophidian snakes: Insight from cytogenetics of the Javan file snake (*Acrochordus javanicus*). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, přijato do tisku / *in press*. Doi: 10.1111/jzs.12180

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.

Rovatsos M, Johnson Pokorná M, **Altmanová M**, Kratochvíl L, Velenský P, Vodička R, Reháček I (2015) Sexing of Komodo dragons, *Varanus komodoensis*. *Gazella* (Zoo Praha) 42: 93–107.

Johnson Pokorná M, **Altmanová M**, Rovatsos M, Velenský P, Vodička R, Reháček 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.

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.

Sember A, Bohlen J, Šlechtová V, **Altmanová M**, Symonová R, Ráb P (2015) Karyotype differentiation in 19 species of river loach fishes (Nemacheilidae, Teleostei): Extensive variability associated with rDNA and heterochromatin distribution and its phylogenetic and ecological interpretation. *BMC Evolutionary Biology* 15: 251.

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, Kratochvíl L, **Altmanová M**, Johnson Pokorná M (2015) Interstitial telomeric motifs in squamate reptiles: when the exceptions outnumber the rule. *PLoS One* 10: e0134985.
- 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.
- Rovatsos M, Pokorná M, **Altmanová M**, Kratochvíl L (2014) Cretaceous park of sex determination: sex chromosomes are conserved across iguanas. *Biology Letters* 10:20131093.
- 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.
- Rovatsos M, **Altmanová M**, Pokorná M, Kratochvíl L (2014) Conserved sex chromosomes across adaptively radiated *Anolis* lizards. *Evolution* 68:2079–2085.

Vybrané konferenční příspěvky / Selected conference presentations

- Altmanová M**, Johnson Pokorná M, Rovatsos M, Kratochvíl L (2017) The importance of having iguanas: Great contribution of iguanid lizards to cytogenetics and genomics. 11th European Cytogenetics Conference, Florencie, Itálie / *Firenze, Italy*. (poster)
- Altmanová M**, Rovatsos M, Johnson Pokorná M, Kratochvíl L (2014) Cretaceous park of sex determination: Conservation and genetic content of sex chromosomes in iguanas. Genetická konference GSGM 2014, Průhonice, Česká republika / *Czech Republic*. (poster)
- Altmanová M**, Johnson Pokorná M, Rovatsos M, Kratochvíl L (2014) Focused on Old World iguanas: Karyotype evolution in the Madagascar family Opluridae (Squamata: Pleurodonta). 20th International Chromosome Conference, Canterbury, Velká Británie / *United Kingdom*. (poster)
- Altmanová M**, Pokorná M, Kratochvíl L (2012) Evolution of sex chromosomes and karyotypes in iguanids (Squamata: Iguanidae *sensu lato*). 20th International Colloquium on Animal Cytogenetics and Gene Mapping, Córdoba, Španělsko / *Spain*. (poster)

Seznam publikací s abstrakty / *Selected publications with abstracts*

Rovatsos M, Altmanová M, Pokorná M, Kratochvíl L (2014) Conserved sex chromosomes across adaptively radiated *Anolis* lizards.

Evolution 68:2079–2085. IF₂₀₁₄: 4,612

Vertebrates possess diverse sex-determining systems, which differ in evolutionary stability among particular groups. It has been suggested that poikilotherms possess more frequent turnovers of sex chromosomes than homoiotherms, whose effective thermoregulation can prevent the emergence of the sex reversals induced by environmental temperature. Squamate reptiles used to be regarded as a group with an extensive variability in sex determination; however, we document how the rather old radiation of lizards from the genus *Anolis*, known for exceptional ecomorphological variability, was connected with stability in sex chromosomes. We found that 18 tested species, representing most of the phylogenetic diversity of the genus, share the gene content of their X chromosomes. Furthermore, we discovered homologous sex chromosomes in species of two genera (*Sceloporus* and *Petrosaurus*) from the family Phrynosomatidae, serving here as an outgroup to *Anolis*. We can conclude that the origin of sex chromosomes within iguanas largely predates the *Anolis* radiation and that the sex chromosomes of iguanas remained conserved for a significant part of their evolutionary history. Next to therian mammals and birds, *Anolis* lizards therefore represent another adaptively radiated amniote clade with conserved sex chromosomes. We argue that the evolutionary stability of sex-determining systems may reflect an advanced stage of differentiation of sex chromosomes rather than thermoregulation strategy.

Rovatsos M, Pokorná M, Altmanová M, Kratochvíl L (2014) Cretaceous park of sex determination: sex chromosomes are conserved across iguanas.

Biology Letters 10:20131093. IF₂₀₁₄: 3,248

Many poikilothermic vertebrate lineages, especially among amphibians and fishes, possess a rapid turnover of sex chromosomes, while in endotherms there is a notable stability of sex chromosomes. Reptiles in general exhibit variability in sex-determining systems; as typical poikilotherms, they might be expected to have a rapid turnover of sex chromosomes.

However, molecular data which would enable the testing of the stability of sex chromosomes are lacking in most lineages. Here, we provide molecular evidence that sex chromosomes are highly conserved across iguanas, one of the most species rich clade of reptiles. We demonstrate that members of the New World families Iguanidae, Tropiduridae, Leiocephalidae, Phrynosomatidae, Dactyloidae and Crotaphytidae, as well as of the family Opluridae which is restricted to Madagascar, all share homologous sex chromosomes. As our sampling represents the majority of the phylogenetic diversity of iguanas, the origin of iguana sex chromosomes can be traced back in history to the basal splitting of this group which occurred during the Cretaceous period. Iguanas thus show a stability of sex chromosomes comparable to mammals and birds and represent the group with the oldest sex chromosomes currently known among amniotic poikilothermic vertebrates.

Altmanová M, Rovatsos M, Johnson Pokorná M, Veselý M, Wagner F, Kratochvíl L. Sex chromosomes in iguanas (Squamata: Pleurodonta): All but basilisks the same.

Zasláno k revizi / in revision.

Once believed to be restricted only to endotherms (mammals and birds), several poikilothermic amniote lineages have recently been documented to possess long-term evolutionary stability in their sex chromosomes. However, many important lineages were not included in these tests. Previously, based on molecular evidence, we documented the homology of well-differentiated sex chromosomes among seven families of iguanas (Pleurodonta), with basilisks (Corytophanidae) being the only exception, as the tested genes linked to X, but missing on the Y chromosome, in other iguanas were autosomal or pseudoautosomal in basilisks. In this study, we test the homology of sex chromosomes in the remaining, previously unstudied iguana families (Hoplocercidae, Leiosauridae, Liolaemidae, Polychrotidae) and in the basilisk genus *Corytophanes*. Our results show that 12 current families of iguanas share X-specific gene content conserved from the common ancestor living in the Cretaceous period. However, the results in the genus *Corytophanes* indicate the loss of the ancestral differentiated sex chromosomes from the ancestor of basilisks. Our new data further confirm the extensive stability of sex chromosomes in iguanas, thus enabling molecular sexing based on the comparison of the number of X-specific genes by quantitative PCR (qPCR) in all but one family of this widely diversified clade.

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. **IF**₂₀₁₄: 2,608

It is notable that the occurrence of multiple sex chromosomes differs significantly between major lineages of amniote vertebrates. In this respect, birds are especially conspicuous, as multiple sex chromosomes have not been observed in this lineage so far. On the other hand, in mammals, multiple sex chromosomes have evolved many times independently. We hypothesize that this contrast can be related to the different involvement of sex-specific sex chromosomes in female meiosis subjected to the female meiotic drive under male versus female heterogamety. Essentially, the male-specific Y chromosome is not involved in female meiosis and is therefore sheltered against the effects of the female meiotic drive affecting the X chromosome and autosomes. Conversely, the Z and W sex chromosomes are both present in female meiosis. Non-random segregation of these sex chromosomes as a consequence of their rearrangements connected with the emergence of multiple sex chromosomes would result in a biased sex ratio, which should be penalized by selection. Therefore, the emergence of multiple sex chromosomes should be less constrained in the lineages with male rather than female heterogamety. Our broader phylogenetic comparison across amniotes supports this prediction. We suggest that our results are consistent with the widespread occurrence of female meiotic drive in amniotes.

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. **IF**₂₀₁₆: 2,288

Iguanas (Pleurodonta) are predominantly distributed in the New World, but one previously cytogenetically understudied family, Opluridae, is endemic to Madagascar and the adjacent Grand Comoro archipelago. The aim of our contribution is to fill a gap in the cytogenetic understanding of this biogeographically puzzling lineage. Based on examination of six species, we found that oplurids are rather conservative in karyotype, which is composed of 36 chromosomes as in most iguanas. However, the species differ in the position of the nucleolar

organizer region and heterochromatic blocks and in the accumulation and distribution of interstitial telomeric sequences (ITSs), which suggests cryptic intra- and interchromosomal rearrangements. All tested species share the XY sex-determining system homologous to most other iguana families. The oplurid Y chromosome is degenerated, very small in size but mostly euchromatic. Fluorescence *in situ* hybridization with probes composed of microsatellite motifs revealed variability among species in the accumulation of particular repeats on the Y chromosome. This variability accounts for the differences in the detection of sex chromosomes across the species of the family using comparative genome hybridization (CGH) technique. Our study demonstrates the limits of the commonly used CGH technique to uncover sex chromosomes even in organisms with heteromorphic and sequentially largely differentiated sex chromosomes.

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. **IF**₂₀₁₅: 3,057

Telomeres are nucleoprotein complexes protecting the physical ends of linear eukaryotic chromosomes and therefore helping to ensure their stability and integrity. Additionally, telomeric sequences can be localized in non-terminal regions of chromosomes, forming so-called interstitial telomeric sequences (ITSs). ITSs are traditionally considered to be relics of chromosomal rearrangements and thus very informative in the reconstruction of the evolutionary history of karyotype formation. We examined the distribution of the telomeric motifs (TTAGGG)_n using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in 30 species, representing 17 families of squamate reptiles, and compared them with the collected data from another 38 species from literature. Out of the 68 squamate species analyzed, 35 possess ITSs in pericentromeric regions, centromeric regions and/or within chromosome arms. We conclude that the occurrence of ITSs is rather common in squamates, despite their generally conserved karyotypes, suggesting frequent and independent cryptic chromosomal rearrangements in this vertebrate group.