



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

EVOLUCIÓN DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES EN REPTILES

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ARMANDO SIMEÓN ACOSTA URIBE

DIRECTOR DE TESIS

DR. DIEGO CLAUDIO CORTEZ QUEZADA

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

COMITÉ TUTOR

DR. SANTIAGO CASTILLO RAMÍREZ

CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CUERNAVACA, MORELOS, SEPTIEMBRE DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Doctorado en Ciencias Biomédicas por permitirme realizar mis estudios de Doctorado en el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme los recursos económicos que permitieron mi manutención durante el periodo en que se llevó a cabo el presente proyecto (becario No. 894678). Gracias a UNAM-PAPIIT (No. IN201920), CONACyT Ciencias de Frontera (No. FC-2016/1682), CONACyT-SEP Ciencia Básica (No. 254240) y a la Royal Society Newton Advanced Fellowship (No. NA160564) que sin su apoyo económico no hubiese sido posible la realización del presente trabajo. Le agradezco al Dr. Diego por permitirme realizar mis estudios de posgrado bajo su tutela, por brindarme apoyo académico, pero sobre todo el enorme apoyo personal recibido. Agradezco al Dr. Santiago Castillo y el Dr. Horacio Merchant quienes formaron parte de mi comité tutorial y cuyos sus consejos fueron importantes durante mi estancia en el posgrado. Le agradezco a Mariela Tenorio por formar parte de mi vida, permitirme formar parte de la suya y con quien he compartido grandiosos momentos. A mis padres, hermanas y familia, incluso a los que ya no están, por estar apoyarme y estar a mi lado. Agradezco a mi comité el Dr. Enrique Fruns, Dr. Enrique Merino, Dra. Araxi Urrutia y al Dr. Santiago Ramírez por sus valiosos comentarios durante la redacción de esta tesis.

RESUMEN

La determinación del sexo en vertebrados puede ser de dos tipos: determinación sexual por temperatura (TSD) o determinación sexual por la presencia de cromosomas sexuales (GSD). Se considera que este último tipo podría representar una ventaja adaptativa, ya que promueve poblaciones naturales con la misma proporción de machos y hembras al nacimiento. Sin embargo, el mantenimiento de los loci asociados con la determinación del sexo conlleva a que los cromosomas sexuales no recombinantes (Y/W) tengan una mayor acumulación de mutaciones ligeramente deletéreas, a que se propaguen secuencias repetidas y a que pierdan de manera masiva su material genético. Una alternativa para superar los problemas que se originan por tener cromosomas sexuales degenerados es la transición a otro sistema de determinación sexual. Esta transición sucede por la evolución de un nuevo sistema de determinación sexual que se fija en las poblaciones y que reemplaza el sistema ancestral degenerado. El presente proyecto está dividido en tres capítulos y tiene como finalidad el estudio de las transiciones de determinación sexual en reptiles. En el Capítulo 1 se analiza la evidencia de transiciones de determinación sexual en el infraorden Iguania, lo cual representa un caso ideal para el estudio evolutivo de los cromosomas sexuales. Por medio de análisis de transcriptómica y genómica identificamos y caracterizamos el nuevo sistema de determinación sexual en la familia *Corytophanidae* que presenta cromosomas del tipo XY. Este nuevo sistema tuvo un origen independiente al sistema XY ancestral. En el Capítulo 2 se explora la hipótesis de que los reptiles que viven en climas fríos tienden a presentar transiciones de TSD a GSD para evitar sesgos en la proporción de los sexos debido a condiciones climáticas extremas. Además, nuestros resultados muestran que todos los reptiles vivíparos poseen cromosomas sexuales. En el Capítulo 3 proponemos un modelo que estima el momento en que ocurrieron las transiciones de cromosomas sexuales a través del uso del sesgo de mutación masculina (MMB) y las tasas de sustitución sinónimas de los cromosomas sexuales, este método promisorio puede ser aplicado a numerosos modelos donde se sugiere han existido transiciones de sistemas de determinación sexual.

ABSTRACT

The determination of sex in vertebrates can be of two types: temperature-dependent sex determination (TSD) or sex determination by the presence of sex chromosomes (GSD). It is considered that the latter type could represent an adaptive advantage since it promotes natural populations with the same proportion of males and females at birth. However, the maintenance of loci associated with sex determination leads to non-recombinant sex chromosomes (Y / W) having a greater accumulation of slightly deleterious mutations, the propagation of repeated sequences, and the massive loss of their genetic material. An alternative to overcome the problems that originate from having degenerated sex chromosomes is to transition to a different sex determination system. These turnovers occur when a new sex determination system becomes fixed in a population and replaces the degenerated ancestral system. This project is divided into three chapters and its general purpose was to study the transitions between sex determination systems in reptiles. In Chapter 1, we analyzed evidence supporting turnovers of sex determination systems in the infraorder Iguania, which represents an ideal case to study the evolution of sex chromosomes. Using transcriptomic and genomic analysis, we identified and characterized the new sex determination system in the Corytophanidae family that is composed of XY chromosomes. This new system had an independent origin to the ancestral XY system. Chapter 2 explores the hypothesis that reptiles living in cold climates tend to transition from TSD to GSD to avoid sex ratio biases due to extreme weather conditions. Furthermore, our results show that all viviparous reptiles possess sex chromosomes. In Chapter 3, we propose a model that estimates the timing of sex chromosome turnovers through the analysis of male mutation bias (MMB) and synonymous substitution rates. This promising method can be applied to numerous species where we suspect transitions between sex determination systems had occurred.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Estructura de los capítulos del proyecto	8
1.2 Importancia de los reptiles como modelo para el estudio de las transiciones de determinación sexual	12
2. Marco Teórico	15
2.1 Evolución del sexo y sexos separados	15
2.2 Sistemas de Determinación Sexual	19
2.2.1 Determinación sexual ambiental (ESD)	19
2.2.2 Determinación sexual genotípica (GSD).....	20
2.2.2.1 Microcromosomas y evolución.....	23
2.2.2.1 Sistemas de determinación sexual poligénicos	24
2.2.3 Otros sistemas de determinación sexual	25
2.3 Origen de los cromosomas sexuales, mantenimiento y evolución.	29
2.3.1 Origen de los cromosomas sexuales	29
2.3.1.1 Tasas de mutación en cromosomas sexuales	33
2.3.2 Degeneración de los cromosomas sexuales	33
2.3.2.1 Modelos evolutivos de su degeneración.....	36
2.3.3 Compensación de dosis en cromosomas sexuales	37
2.3.4 Desaparición de los cromosomas sexuales	39
2.3.6 Rejuvenecimiento de los cromosomas sexuales	41
2.3.7 Transiciones de determinación sexual.....	43
2.3.7.1 Deriva génica y transición de cromosomas sexuales.....	44
2.3.7.2 Carga de mutaciones deletéreas en cromosomas sexuales. ...	45
2.3.7.3 Selección en la proporción de sexos.....	46
2.3.7.4 Transiciones provocadas por selección sexual antagonista....	49

2.4 Teoría neutral, casi neutral y deriva génica	49
2.5. Breve resumen del conocimiento actual de la evolución de los genomas en vertebrados.	51
2.5.1 Peces (Cyclostomata, Chondrichthyes y Osteichthyes).....	51
2.5.2 Anfibios	53
2.5.3 Reptiles (Lepidosauria, Squamata y Testudines)	54
2.5.4 Arcosaurios (crocodilia y aves)	57
2.5.4.1 Aves y sintenia con los reptiles.....	58
2.5.5 Mamíferos (Monotremas, metatheria y eutheria)	60
3. HIPÓTESIS	63
4. OBJETIVO GENERAL	64
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
5. CAPÍTULO 1: ENSAMBLE DEL TRANSCRIPTOMA Y GENOMA DE <i>B. VITTATUS</i>, CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE DETERMINACIÓN SEXUAL	65
5.1 Abstract.....	66
5.2 Introduction	67
5.3 Materials and Methods.....	69
5.4 Results	78
5.5 Discussion.....	88
5.6 Supplementary Material	90
5.7 Acknowledgments.....	90
5.8 Authors' Contributions.....	90
5.9 Literature Cited.....	90
6. CAPÍTULO 2: SISTEMAS DE DETERMINACIÓN SEXUAL POR CROMOSOMAS SEXUALES EN REPTILES QUE HABITAN EN CLIMAS FRÍOS	93

6.1 Abstract.....	94
6.2 Introduction	95
6.3 Conclusions	100
6.4 Materials and Methods.....	101
6.5 Supplementary Material	104
6.6 Acknowledgments.....	104
6.7 Author Contributions	105
6.8 Literature Cited.....	105
7. CAPÍTULO 3: CÁLCULO DE LA EDAD DE APARICIÓN DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES EN PLEURODONTES BASADO EN ANÁLISIS DEL SESGO DE MUTACIÓN MASCULINA.....	107
7.1 Abstract.....	109
7.2 Introduction	110
7.3 Materials and Methods.....	114
7.4 Results	123
7.5 Discussion.....	132
7.6 Supplementary Material	134
7.7 Acknowledgments.....	134
7.8 Authors' Contributions.....	134
7.9 Literature Cited.....	134
8. DISCUSIÓN	138
9. CONCLUSIONES	156
10. PERSPECTIVAS	158
11. REFERENCIAS	159

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estructura de los capítulos del proyecto

Este proyecto de investigación está enfocado al estudio de las transiciones de determinación sexual, cómo identificarlas (capítulo 1 y 2) y cómo estimar el momento en que ocurrieron, calculando la edad de los cromosomas sexuales basado en las tasas de sustitución sinónimas (capítulo 3). He estructurado el presente trabajo en tres secciones que corresponden a tres diferentes publicaciones científicas en revistas internacionales revisadas por pares. A continuación, se dará una breve explicación de cada uno de los temas que se abordarán en cada capítulo.

El capítulo 1 describe la caracterización e identificación del sistema de determinación sexual presente en la familia *Corytophanidae*. Esta familia de reptiles se encuentra en los trópicos de América, Centroamérica y el noroeste de Sudamérica. Existen tres géneros (*Basiliscus*, *Corytophanes* y *Laemanctus*) con nueve especies en total. En México, se han reportado los tres géneros y seis de las nueve especies descritas hasta la fecha (Márquez, 2010). Entre ellas encontramos a *Basiliscus vittatus* (basilisco marrón o toloque rayado) y *Corytophanes hernandesii* (turipache de montaña), los cuales se utilizaron como modelo de estudio para el presente trabajo.

Los miembros de la familia *Corytophanidae* generalmente son de hábitos arborícolas, tienen el cuerpo esbelto, son muy ágiles, y las extremidades y cola son largas. Poseen crestas en la cabeza, y en el caso del género *Basiliscus*, sólo los machos las tienen desarrolladas (Figura 1).



Figura 1. A la izquierda vista dorsolateral de la cabeza de un macho adulto de *Basiliscus vittatus*, a la derecha vista dorsolateral de una hembra adulta de *B. vittatus*.

Los estudios previos para detectar el sistema de determinación sexual en los *Corytophanidae* están basados principalmente en la detección de los cromosomas sexuales mediante la observación de cariotipos (Schwenk et al., 1982; Gorman et al., 1967; Viets et al., 1994) o por medio de qPCRs (por sus siglas en inglés, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) usando DNA genómico (Rovatsos et al., 2014a). Los trabajos con cariotipos no han logrado demostrar la presencia de cromosomas sexuales heteromórficos, pero la falta de reportes concretos (Viets et al., 1994; Altmanová et al., 2017) y la presencia de cromosomas sexuales en familias filogenéticamente cercanas (Leaché y Sites, 2009; Pokorná y Kratochvíl, 2009; Gamble et al., 2013; Rovatsos et al., 2014a), apoyaban la hipótesis de que los *Corytophanidae* tienen determinación sexual por cromosomas sexuales. Adicionalmente, los resultados de los estudios de Rovatsos et al. (2014a), sugieren que los *Corytophanidae* no poseen el mismo sistema ancestral de cromosomas sexuales que el presente en las familias hermanas y remarcan la posibilidad de que los *Corytophanidae* han pasado por una transición de determinación sexual.

Mediante la secuenciación del genoma y transcriptoma de muestras obtenidas de machos y hembras en diferentes poblaciones de *B. vittatus* y posterior a un ensamblaje *de novo* seguido de diversos análisis bioinformáticos, se llevó a cabo la caracterización del sistema de determinación sexual. Las muestras obtenidas de *C. hernandesii* se usaron para confirmar que el sistema de *B. vittatus* es común a la familia y no sólo particular al género.

En este capítulo se presenta evidencia de que las transiciones de determinación sexual en sistemas viejos y con cromosomas sexuales Y/W altamente degenerados (Marin y Cortez et al., 2017), representa una estrategia evolutiva a la que pueden recurrir algunas especies ante la inevitable pérdida de los genes determinantes del sexo (el cromosoma Y en este caso particular).

El capítulo 2 está dedicado al trabajo con dos especies del género *Eulamprus* (eslizones), lagartijas vivíparas que viven en Australia en zonas de montañas altas con climas fríos (12 - 15°C). Estudios previos han demostrado la presencia de determinación sexual por temperatura (TSD: *Temperature-dependent Sex Determination*) en condiciones mayores a 32°C, donde sólo se producen machos (Robert y Thompson, 2001). Con anterioridad al presente trabajo, se ha mantenido la idea de que éste era el único tipo de determinación sexual en ambas especies (Shine, 2004). Cabe destacar que, aun cuando la determinación sexual por temperatura es algo común en especies de reptiles como tortugas, cocodrilos y tuátaras, todas estas especies presentan reproducción ovípara (Robert, 2003). En las especies vivíparas, al presentar temperaturas relativamente estables durante la gestación, no se espera que presenten TSD ya que pueden generar sesgos en la proporción de machos y hembras. Sin embargo, se mantiene la hipótesis de que estas especies vivíparas con TSD, una vez preñadas, tomaban largos periodos de baños de sol y anidaban en lugares donde las temperaturas fluctúan ampliamente para evitar el sesgo en la proporción de sexos (Robert, 2003).

Pese a que el género *Eulamprus* no pertenece al infraorden Iguania, se trabajó con dos especies, de este género ya que permiten tener otra perspectiva sobre la importancia de la transición de sistemas de determinación sexual TSD a GSD; la evolución hacia cromosomas sexuales permite a las especies adaptarse a vivir en climas fríos y evitar sesgos en la proporción de sexos en sus poblaciones. En este trabajo se concluye que todos los reptiles vivíparos poseen cromosomas sexuales.

Para llevar a cabo esta segunda parte de la tesis, se trabajó con el genoma y transcriptoma de *E. tympanum* y *E. heatwolei*. Al igual que en el capítulo 1, uno de los objetivos principales fue la caracterización e identificación del sistema de determinación sexual en ambas especies y corroborar que éstas

poseen un par de cromosomas sexuales. Como se ha documentado en *Pogona vitticeps* (dragón barbudo) (Quinn, et al., 2007), las especies del género *Eulamprus* poseen una determinación sexual por cromosomas sexuales compartida con una determinación sexual por temperatura. Esta última domina sobre la primera en condiciones extremas (temperaturas altas).

El capítulo 3 corresponde a la propuesta de un modelo para estimar el momento en el cual ciertos cromosomas sexuales se han perdido como producto de transiciones entre sistemas de determinación sexual. La ausencia de la recombinación homóloga tiene múltiples consecuencias para la evolución de los cromosomas sexuales (Beukeboom y Perrin, 2014). Una de éstas es el tiempo que pasan los cromosomas sexuales en ambos sexos cada autosoma pasa la mitad del tiempo en machos y la mitad en hembras, pero con los cromosomas sexuales no sucede esto. En los sistemas XY, el cromosoma X está presente 2/3 partes en hembras y 1/3 parte en machos. Lo mismo sucede con los cromosomas ZW, sólo que en este caso son los cromosomas Z quienes pasan 2/3 partes en machos y 1/3 parte en hembras (Johnson y Lachance, 2013). Finalmente, los cromosomas Y/W pasan todo el tiempo en un solo sexo (machos y hembras, respectivamente). Debido a que los cromosomas sexuales no pasan el mismo tiempo en ambos sexos, éstos experimentan diferentes efectos de los procesos evolutivos como mutaciones, deriva génica, selección y conflicto genómico (Vicoso y Charlesworth, 2006).

Uno de los procesos evolutivos relacionados con las diferencias en el tiempo que pasa cada cromosoma en machos y hembras, es el denominado sesgo de mutación masculina (*Male Mutation Bias* o MMB, en inglés). Este se caracteriza por tener tasas de mutación en la línea germinal masculina mucho más altas que en la línea germinal de las hembras (asociado al número elevado de divisiones de los gametos masculinos contra el número reducido de divisiones de gametos femeninos), provocando que las tasas de mutación de los cromosomas Y (que pasan 100% del tiempo en machos) sean mucho más elevadas en comparación con las tasas de los autosomas y que las tasas de mutación de los cromosomas X (que pasan 33% del tiempo en machos) sean más bajas que la de los autosomas (Hurst y Ellegren, 1998; Makova y Li, 2002). Estas diferencias en las tasas de mutación entre los cromosomas sexuales y los

autosomales se aprovechan para realizar el cálculo de la edad de los sistemas de determinación sexual por cromosomas sexuales y el momento en que sucedieron las diferentes transiciones. En este trabajo se usó como modelo de estudio diferentes especies de mamíferos y reptiles.

1.2 Importancia de los reptiles como modelo para el estudio de las transiciones de determinación sexual

En los reptiles, se pueden encontrar especies que poseen determinación sexual genética (GSD: *Genotypic Sex Determination*) con cromosomas sexuales XY o ZW (incluyendo múltiples cromosomas sexuales) y también pueden presentar determinación sexual dependiente de la temperatura (Ezaz et al., 2009), incluyendo especies con ambos sistemas (Quinn, et al., 2007). En comparación en los mamíferos terios (mamíferos placentarios y marsupiales) y en las aves se encuentra un solo tipo de determinación sexual, la GSD. Los primeros, poseen cromosomas sexuales XY (a excepción de los topos del género *Ellobius* y los ratones del género *Tokudaia* quienes perdieron el cromosoma Y ancestral) y los segundos poseen cromosomas sexuales ZW (Graves et al., 2000).

Además, los reptiles presentan una mayor diversidad de estrategias y mecanismos reproductivos que los mamíferos y en aves (Tabla1). Los reptiles presentan especies gonocóricas (sexos separados) y partenogenéticas, con especies ovíparas, vivíparas u ovovivíparas. Mientras que los mamíferos sólo presentan especies gonocóricas vivíparas u ovíparas (en el caso de los monotremas), y las aves sólo presentan especies gonocóricas o partenogenéticas, siendo todas éstas ovíparas (Blackburn y Evans, 1986; Olsen, 1975; Ramachandran y McDaniel, 2018).

Tabla1. Estrategias y mecanismos reproductivos en reptiles, aves y mamíferos.

			Reptiles	Mamíferos	Aves
Tipo de determinación sexual	Determinación sexual genotípica	XY	SI	SI	NO
		ZW	SI	NO	SI
	Determinación sexual medio ambiental		SI	NO	NO
Tipo de reproducción	Gonocorismo		SI	SI	SI
	Hermafroditismo		NO	NO	NO
	Partenogénesis		SI	NO	SI
Mecanismo reproductivo	Oviparidad		SI	SI	SI
	Viviparidad		SI	SI	NO
	Ovoviviparidad		SI	NO	NO

Por ejemplo, las lagartijas del orden Squamata parecen haber tenido múltiples transiciones de sistema de determinación sexual entre ESD (en inglés, *Environmental Sex Determination*) y GSD, y entre sistemas XY y ZW. De las casi mil especies analizadas mediante cariotipos, sólo cerca de 200 parecen tener cromosomas sexuales visibles al microscopio, e incluso la segregación filogenética de los mecanismos de determinación sexual no está clara (Ezaz et al., 2009). Los reptiles son un modelo de estudio más atractivo para estudiar las transiciones de determinación sexual que los modelos tradicionalmente usados para el entendimiento y las dinámicas de los cromosomas sexuales (aves y mamíferos).

En particular, Rovatsos et al. (2014a) mostraron que las diferentes familias de reptiles del infraorden Iguania tienen el mismo sistema de determinación sexual. Esto a través de análisis de citogenética molecular y métodos de qPCR para cuantificar la cantidad de copias de genes presentes en el genoma de hembras y machos, tomando como marcadores seis genes conocidos del cromosoma X y seis genes del cromosoma autosomal 6 (Figura 2). En las familias *Iguanidae*, *Tropiduridae*, *Leiocephalidae*, *Phrynosomatidae*,

Dactyloidae, *Opluridae* y *Crotaphytidae*, los resultados de Rovatsos et al. (2014a) muestran la presencia del mismo sistema YX previamente caracterizado de *Anolis carolinensis* (anolis verde) (Alfoldi et al., 2011). En el caso de las familias *Agamidae* y *Corytophanidae*, Rovatsos et al. (2014a) observaron que las copias de genes del cromosoma X están presentes en doble copia tanto en los machos como en las hembras. Esto se puede deber a una duplicación interna de los genes dentro del genoma de dichas familias, a que el cromosoma X nunca fue un cromosoma sexual o, alternativamente, a que hubo una transición de sistema sexual y los cromosomas X ancestrales han vuelto una vez más a ser autosomas. Actualmente, se sabe que *P. vitticeps* (especie usada por Rovatsos et al., 2014a como representante de *Agamidae*) presenta cromosomas sexuales del tipo ZW que coexisten con un sistema de determinación medioambiental por temperatura (Quinn et al., 2007). Hasta antes de la realización del presente trabajo, se desconocía el escenario que correspondía a la familia *Corytophanidae* dentro del infraorden Iguania.

Los datos recopilados por Rovatsos et al. (2014a) sugieren que los cromosomas sexuales en las iguanas y lagartijas se originaron después de la divergencia de la familia *Agamidae*. Sin embargo, cabe señalar que los análisis de qPCR que utilizan únicamente un reducido número de genes, permiten conocer el estado actual de los sistemas sexuales, mas no permiten determinar si hubo alguna transición de un sistema ancestral a uno más reciente.

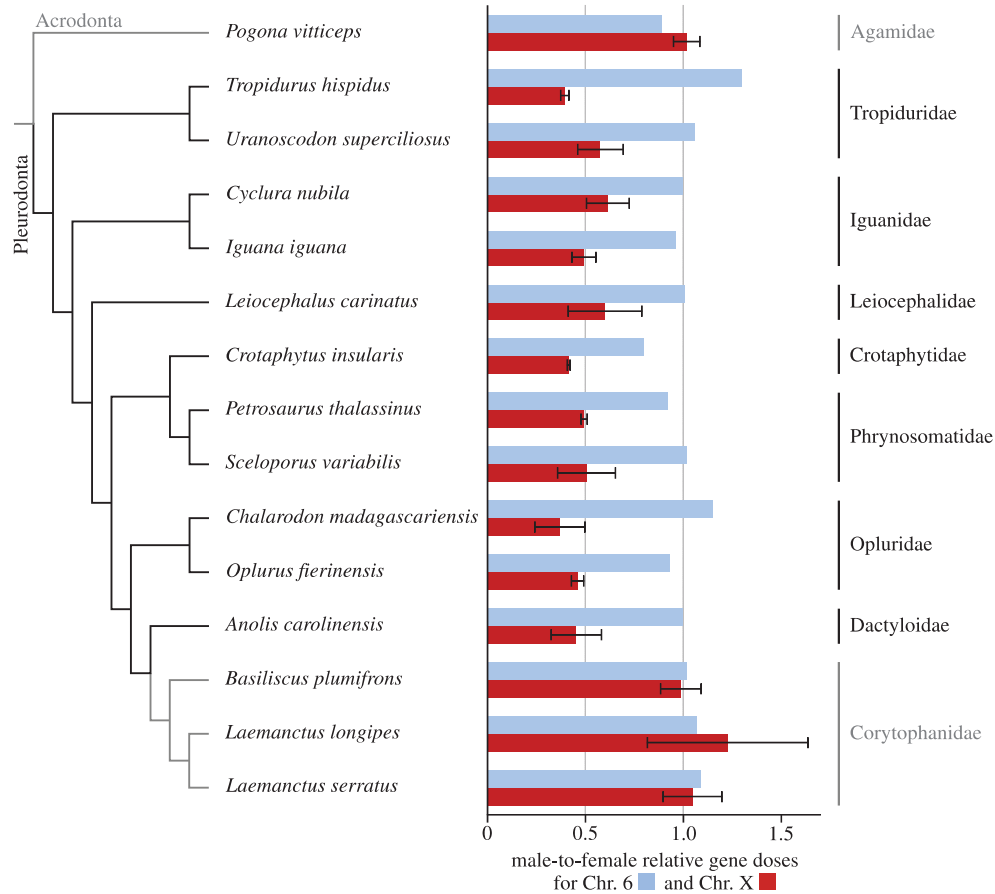


Figura 2. Proporción relativa del número de genes del cromosoma 6 y del cromosoma X de *Anolis carolinensis* en machos de 14 especies del infraorden Iguania. Los genes ligados al cromosoma X se muestran en rojo, mientras que los autosómicos (cromosoma 6) están en color azul. Se espera un valor de 1.0 para genes autosómicos y un valor de 0.5 para genes ligados al cromosoma X. Figura tomada de Rovatsos et al. (2014a).

2. Marco Teórico

2.1 Evolución del sexo y sexos separados

La reproducción sexual es una característica común entre los eucariontes (Victoria et al., 2002). Esta habilidad de reproducción mediante el sexo (fusión de gametos haploides) evolucionó en el ancestro común de los eucariontes, pero ésta no surgió al mismo tiempo que la separación de sexos; esta capacidad de las especies de reproducirse permitió el intercambio del material genético con otras de su misma especie (Lahr et al., 2011).

Se estima que el sexo meiótico (reproducción por medio de la presencia de células germinales haploides que terminan en la formación de un cigoto diploide) surgió en los eucariontes hace 1.5 mil millones de años (Javaux et al., 2001) en linajes como *Trichomonas* y *Ostreococcus* (Ramesh et al., 2005; Malik et al., 2008; Schurko et al., 2009; Halary et al., 2011). El sexo meiótico se comprende de varios pasos complejos, que se resumen a continuación: 1) la fusión de dos células haploides para formar un cigoto (singamia), 2) la fusión de los dos núcleos haploides para formar un cigoto diploide (cariogamia), 3) la duplicación de dos juegos de cromosomas en cromátidas hermanas unidas por un centrómero, 4) la recombinación entre cromosomas homólogos maternos y paternos, 5) la primera división celular, donde se segregan los centrómeros paternos y maternos, 6) la segunda división celular con la segregación de cromátidas hermanas formando cuatro células haploides. La meiosis tiene muchas similitudes con la mitosis (reproducción asexual) y comparten los mismos mecanismos durante algunos pasos. Sin embargo, la mitosis genera dos células diploides idénticas, ya que no hay un proceso de entrecruzamiento e intercambio genético con otro individuo de la misma especie. Pese a esto, el proceso mitótico es menos costoso que la meiosis. Se estima que durante el tiempo que le lleva a la meiosis conjugar y reorganizar el núcleo, una célula que está realizando la mitosis ya se dividió y dio origen a 256 células (Burt, 2000).

La evolución en sexos separados (especies dioicas) a partir del hermafroditismo (cosexualidad) requiere al menos dos pasos. Primero, el surgimiento de polimorfismos (ginodioecia; presencia de organismos de la misma especie con hermafroditismo y sexos separados) que permiten el surgimiento de organismos hembras sin la capacidad de producir gametos masculinos (vía esterilización masculina) y al mismo tiempo otros que permiten el desarrollo de organismos masculinos sin la capacidad de producir gametos femeninos (vía esterilización femenina). Posteriormente, estos organismos unisexuales tienen que ser seleccionados, mientras que los organismos hermafroditas tienden a desaparecer con el tiempo (Charlesworth, 1991; Charlesworth y Charlesworth, 2000).

Uno de los costos de la reproducción sexual puede ser la pérdida frecuente de mutaciones benéficas favorecidas por la selección, en donde los

gametos que se fusionan no llevan consigo los genes benéficos, perdiéndose en la siguiente generación por el azar en la división de material genético producto de la meiosis. Incluso, el mismo proceso de apareamiento es costoso, pues la creación de órganos masculinos y femeninos, así como caracteres secundarios, requiere una inversión energética. Adicionalmente, otro de los costos de evolucionar hacia la reproducción sexual es el enorme desgaste energético que realizan las especies al buscar una pareja (Beukeboom y Perrim, 2014).

Entonces, ¿por qué se ha favorecido el establecimiento de la reproducción sexual y la separación de sexos?

El sexo meiótico (reproducción sexual) pudo haber surgido inicialmente como un mecanismo de reparación, a causa del estrés medioambiental producido por las especies reactivas de oxígeno y el daño que éstas generan sobre el DNA. La evolución hacia el sexo meiótico y la recombinación homóloga posiblemente representa la solución para reparar daños en el DNA en formas primitivas de organismos unicelulares (Bernstein et al., 2011). La recombinación homóloga también protege contra los elementos transponibles, pues permite la eliminación de secuencias repetidas y mutaciones en el genoma (Galan y Selker, 2004).

La reproducción sexual que es casi universal en todas las formas de vida eucariota y permite la fusión de gametos y la mezcla de genomas vía meiosis (Bell, 1982). Una de las principales funciones de la reproducción sexual es el intercambio genético entre dos organismos de la misma especie, lo cual genera combinaciones genéticas beneficiosas en las poblaciones, logrando que las especies logren adaptarse a los diversos cambios y dinámicas en el ambiente (Crow, 1994; Otto, 2009).

Por su parte la evolución de sexos separados pudo haber surgido como una medida para evitar la autofecundación (Charlesworth, 1991; Charlesworth y Charlesworth, 2000), la cual produce una baja adecuación en la descendencia ya que favorece la acumulación de alelos recesivos deletéreos producto de depresión por endogamia (Charlesworth y Willis, 2009).

Los mecanismos de determinación del sexo son sorprendentemente diversos (Figura 3) y los biólogos evolutivos siguen trabajando en comprender

las causas de esta variación (Beukeboom y Perrin, 2014). Esta variación se da incluso entre especies cercanas o entre poblaciones de la misma especie (Palmer et al., 2019). Mientras que los organismos unicelulares poseen gametos del mismo tamaño (isogamia), la reproducción sexual en la mayoría de las especies eucariontes ha evolucionado para tener gametos masculinos y femeninos que difieren en tamaño (anisogamia), y con frecuencia éstos han evolucionado a sexos separados.

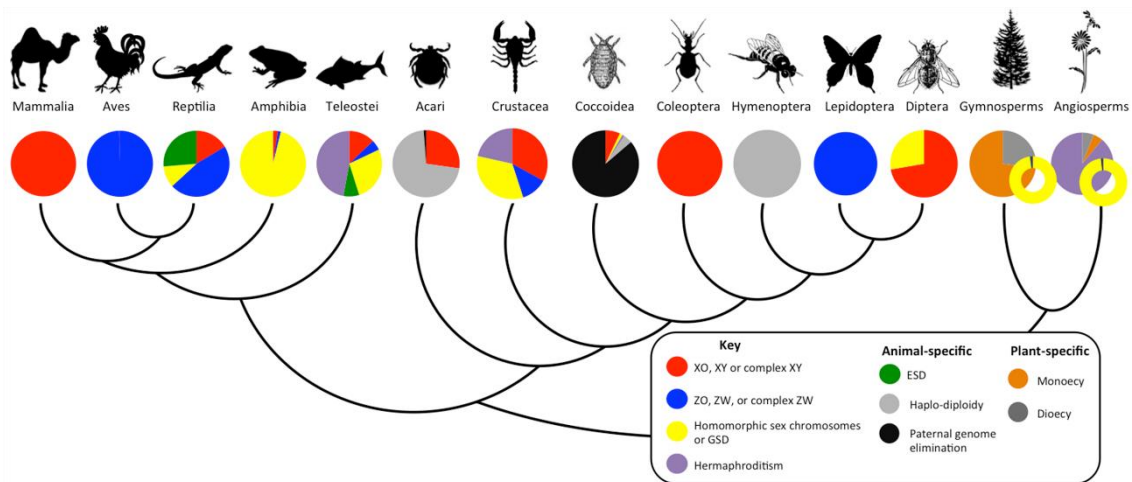


Figura 3. Diversidad de los tipos de los sistemas de determinación sexual en clados representativos de animales y plantas. La burbuja adicional en plantas representa la proporción relativa de especies con cromosomas sexuales documentados para especies con sexos separados. Mammalia (mamíferos placentarios, marsupiales y monotremas), Aves, Reptilia (tortugas, serpientes, cocodrilos y lagartos), Amphibia (ranas, sapos y salamandras), y Teleostei (peces óseos). Invertebrados: Acari (ácaros y garrapatas), Crustacea (camarones, percebes, cangrejos), e insectos, que incluyen Coccoidea (insectos escamosos), Coleoptera (escarabajos), Hymenoptera (hormigas, abejas, y avispas), Lepidoptera (mariposas y polillas), y Diptera (moscas). Acrogymnospermae (plantas sin flores) y Angiosperma (plantas con flores). Figura tomada de Bachtrog et al. (2014).

Por ejemplo, la mayoría de las plantas con flores (94%) tienen órganos sexuales masculinos y femeninos dentro de un solo individuo y con frecuencia dentro de la misma flor (Renner y Ricklefs, 1995). En contraste con las plantas, el hermafroditismo es raro entre animales, solo apenas el 5% de todas las especies, incluso los insectos (que son las especies más abundantes) carecen

de hermafroditismo, pero esta condición es común en otros animales como los peces y algunos invertebrados (caracoles, corales, tremátodos, percebes y equinodermos) (Jarne y Auld, 2006).

2.2 Sistemas de Determinación Sexual

Los procesos biológicos que desencadenan y controlan la diferenciación de las gónadas masculinas y femeninas, se dividen en dos grandes grupos de determinación sexual: la gobernada por factores ambientales (ESD) y aquella con mecanismos genéticos complejos (GSD) que han evolucionado repetida e independientemente en varios grupos de organismos (Stöck et al., 2021).

2.2.1 Determinación sexual ambiental (ESD)

En la denominada determinación sexual ambiental (ESD), tanto machos como hembras tienen genomas idénticos y su sexo es determinado por factores ambientales. Esta determinación es común en organismos unicelulares eucariontes, mientras que en organismos multicelulares se encuentra principalmente en crustáceos (Kato et al., 2011), anélidos (Berec et al., 2005), helechos (Goodnoe et al., 2016), musgos (Cameron y Wyatt, 1990), algunas angiospermas (Zimmerman, 1991), en reptiles (Merchant-Larios y Diaz-Hernandez, 2013), anfibios (Nakamura, 2009) y algunos peces (Baroiller et al., 2009). La determinación sexual por temperatura (*Temperature Sex Determination* o TSD) parece ser el mecanismo más común de ESD. Como su nombre lo indica, en este mecanismo es la temperatura la que activa los genes que inician la cascada de señalización que define el destino genético de las gónadas (Merchant-Larios y Diaz-Hernandez, 2013; Beukeboom y Perrin, 2014). Otro factor ambiental conocido en vertebrados es la determinación sexual social, la cual está presente en peces hermafroditas y *Bonellia viridis* (gusano cuchara verde) (Picard et al., 2021). Estos organismos viven en grupos sociales con una sola hembra dominante, cuando ésta muere el macho más grande en el grupo cambia de sexo y se convierte en la hembra dominante (junto con la

determinación sexual por temperatura son las únicas ESD presentes en vertebrados conocidas a la fecha) (Figura 4) (Fricke y Fricke, 1977; Mugurran, 2005).

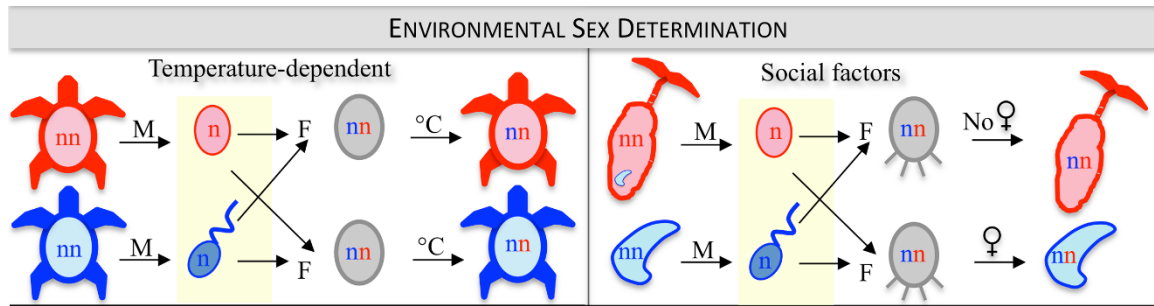


Figura 4. M se refiere a meiosis, F a la fertilización. Los estadios haploides (n) se indican como áreas sombreadas y los estadios diploides (nn) no están sombreados. Las hembras están sombreadas de color rojo y los machos están sombreados de color azul Determinación sexual ambiental: en las tortugas y algunos otros reptiles, el sexo está determinado por la temperatura de incubación de los huevos (determinación sexual por temperatura). Los factores sociales pueden actuar como señales primarias que determinan el sexo: las larvas sexualmente indiferenciadas del gusano marino espátula verde que aterrizan en el fondo del mar inhabitado se convierten en hembras (y crecen hasta 15 cm de largo), mientras que las larvas que entran en contacto con las hembras se convierten en machos diminutos (1-3mm de largo) que viven dentro de la hembra. Figura tomada de Bachtrog et al., (2014).

2.2.2 Determinación sexual genotípica (GSD)

La determinación sexual genotípica (en inglés *Genotypic Sex Determination* o GSD) es la más conocida y documentada (Ross y Blackmon, 2016). Este mecanismo necesita de la actividad de un gen regulador maestro que controla el desarrollo de las gónadas. Por ejemplo, en mamíferos la actividad del gen *Sry* permite el desarrollo del testículo e inhibe el desarrollo de los ovarios (Sinclair et al., 1990). Estos genes reguladores maestros se encuentran en cromosomas que difieren entre machos y hembras y que se denominan cromosomas sexuales (Bachtrog et al., 2014). Se estima que, al menos el 50% de las especies de reptiles (11 mil aproximadamente) y el 80% de todos los amniotas (27,500 especies) poseen cromosomas sexuales (Rovatsos et al., 2017).

Los cromosomas sexuales están asociados a la determinación del sexo de machos y hembras en diversas especies de vertebrados e invertebrados (Ross y Blackmon, 2016). En términos generales, los sistemas de cromosomas sexuales pueden ser de tres tipos: cromosomas sexuales XY, ZW o UV (Figura 5). En algunas especies, incluidos los humanos, los machos son heterogaméticos y tienen un cromosoma X y un cromosoma Y como par de cromosomas sexuales, mientras que las hembras son homogaméticas y tienen dos copias del cromosoma X. Este tipo de cromosomas sexuales son los llamados XY y los podemos encontrar en mamíferos (Cortez et al., 2014), reptiles (Gamble et al., 2017), peces (Tanaka et al., 2007), anfibios (Yoshimoto et al., 2008), plantas (Bergero et al., 2018), arácnidos (García et al., 2002) y algunos insectos (Fraisse et al., 2017). En otros grupos encontramos el caso opuesto, los llamados cromosomas ZW, donde las hembras son el sexo heterogamético y tienen un cromosoma Z y un cromosoma W como par de cromosomas sexuales, mientras que los machos tienen dos cromosomas Z. Este tipo de cromosomas sexuales se pueden encontrar en aves (Zhou et al., 2014), peces (Takehana et al., 2018), reptiles (Ezaz et al., 2009), anfibios (Miura, 2007), insectos (Traut et al., 2007) y plantas (Tennessee et al., 2016). En ambos casos, el elemento que determina el sexo (Y o W) tiende a ser pequeño y/o heterocromático. Sin embargo, hay especies de animales donde no hay cromosomas sexuales obvios. En muchos reptiles, ranas y peces, la determinación del sexo es genotípica, pero los cromosomas sexuales no pueden ser distinguidos porque son muy pequeños (microcromosomas; Graves, 2008).

La tercera forma de cromosomas sexuales son los cromosomas UV los cuales podemos encontrar en las briofitas (plantas terrestres no vasculares), algas y algunos hongos (Immler y Otto, 2015; Carey et al., 2021). En especies con fases de vida libre haploide, con frecuencia es esta fase haploide (gametófito) donde hay órganos sexuales que definen entre machos y hembras, las hembras portan el cromosoma U y los machos el cromosoma V. En contraste con la fase diploide que carece de diferenciación sexual y produce vía meiosis esporas (Bull, 1983; Coelho et al., 2008; Immler y Otto, 2015). La evolución y propiedades genéticas de estos cromosomas no corresponde a lo que se ve en sistemas de determinación sexual por cromosomas sexuales XY o ZW, por este

motivo y dado que el presente trabajo está enfocado a vertebrados no se profundizará en este tipo de cromosomas sexuales.

Los cromosomas sexuales dan una falsa impresión de ser mecanismos de determinación sexual estables al ser comunes entre las especies, pero éstos con el tiempo pasan a ser cargas evolutivas que se vuelven evidentes si observamos a través de los diversos linajes que los poseen (Bachtrog et al., 2014). Más del 96% de los estudios enfocados a los GSD de anfibios muestran una ausencia de cromosomas sexuales heteromórficos, lo cual indica que éstos han pasado por transiciones de sistemas de determinación sexual con frecuencia (Schartl, 2004; Stöck et al., 2011; Miura, 2017). Al igual que en anfibios, en reptiles y peces se han descrito frecuentes recambios de los sistemas de determinación sexual (Ezaz et al., 2009; Charlesworth y Mank, 2010; Graves y Piechel, 2010; Bewick et al., 2011; Kondo et al., 2004; Takehana et al., 2007, 2008; Tanaka et al., 2007).

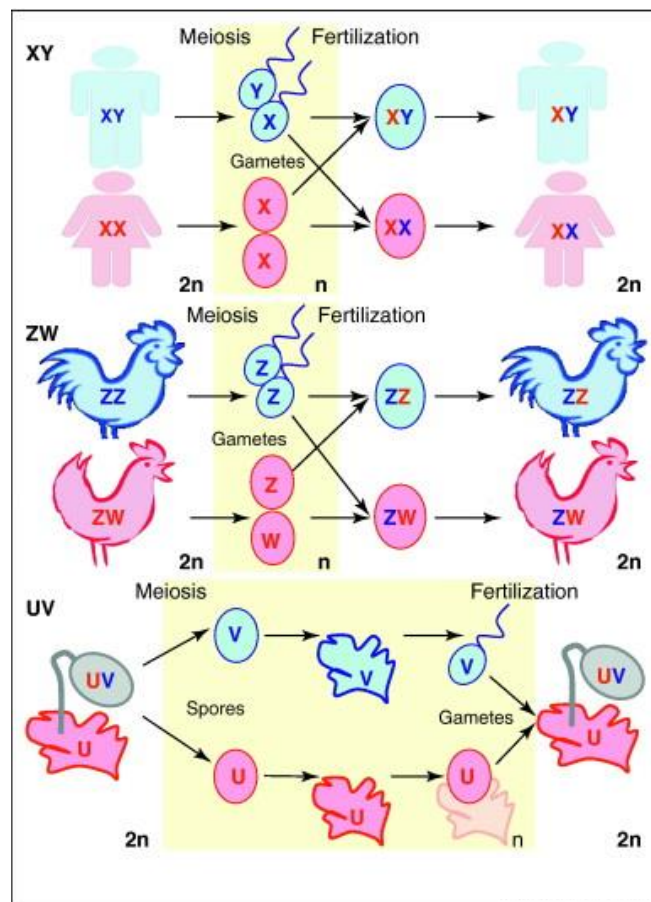


Figura 5. Diferencias en la herencia y especificación sexual entre los sistemas de cromosomas sexuales XY, ZW y UV. Las hembras están sombreadas de rojo, los machos en azul. En los sistemas XY, el cromosoma Y es único de machos y estos heredan su

cromosoma X de su madre. Para las hembras, cada padre aporta un cromosoma X. En los sistemas ZW, el cromosoma W es específico de las hembras y estas siempre heredan su cromosoma Z de su padre. Los machos heredan un cromosoma Z de cada padre. En los sistemas UV, el sexo se expresa en la fase haploide, con los cromosomas U confinados a las hembras y los cromosomas V propios de los machos. Los machos y las hembras producen espermatozoides y óvulos, respectivamente, por mitosis, y la fertilización da como resultado la fase diploide UV. Debido a que el UV diploide no está sexado, se ilustra de color gris. La segregación meiótica en el diploide UV da como resultado la producción de esporas femeninas (U) y masculinas (V), que finalmente se convierten en individuos haploides sexualmente maduros. Figura tomada de Bachtrog et al., (2011).

2.2.2.1 Microcromosomas y evolución

Algunas especies suelen presentar microcromosomas autosómicos y sexuales, estos son cromosomas de 12 Mb o menos, mientras que se suele llamar macrocromosomas a aquellos cromosomas que tienen entre 30 Mb y 250 Mb o más de longitud. La longitud de los cromosomas más pequeños que se conocen está cerca de las 3 Mb (Pichugin et al., 2001).

Los microcromosomas se comportan como cualquier otro cromosoma (Smith et al., 2000), se mantienen estables durante la mitosis y meiosis (Krishan, 1964), además de tener centrómeros y telómeros funcionales (Solovei et al., 1994). En general los microcromosomas tienden a estar hiper-acetilados y la mayoría tiene a replicarse durante el estadio de la fase S, ambas características de dominios cromosómicos ricos en genes (McQueen et al., 1998).

Los microcromosomas son comunes en aves y reptiles, a excepción de los cocodrilos en los cuales no se han observado, aunque también se han observado en menor frecuencia en especies de anfibios y peces (Ohno et al., 1969; Morescalchi et al., 1977a, 1977b, 1979; Schmid et al., 2010). Esto sugiere que los microcromosomas evolucionaron a partir de algún ancestro entre los vertebrados (Burt, 2002). Aunque Burt et al. (2002) sugiere que los microcromosomas en aves surgieron a partir de un evento de fisión cromosomal, en donde la reducción del contenido del DNA, un número alto de secuencias repetidas y las altas tasas de recombinación de los microcromosomas,

acompañados de fuerzas evolutivas como pueden ser la selección, deriva génica o procesos de endogamia, favorecieron su fijación en aves y los vertebrados que los presentan.

En las aves los microcromosomas son ricos en genes, con una densidad de 2-3 veces más genes que los macrocromosomas y contienen hasta el 50% de los genes totales del genoma, además de una mayor tasa de recombinación que los macrocromosomas (Smith et al., 2000).

2.2.2.1 Sistemas de determinación sexual poligénicos

Mientras que en los sistemas de determinación sexual anteriormente descritos un solo factor genético (GSD o ESD) actúa como el encargado de la determinación del sexo, en los sistemas de determinación sexual poligénicos (*Polygenic Sex Determination* o PSD), múltiples factores pueden determinar el sexo (Figura 6) (Picard et al., 2021). Hasta la fecha, este sistema se ha reportado en un número muy reducido de especies de vertebrados como peces (Moore 2013; Bachtrog et al., 2014), mamíferos (Veyrunes et al., 2010), anfibios (Bateman et al., 2017), moluscos (Yusa 2007) y copépodos (Alexander et al., 2015). Hay dos tipos de PSD descritos a la fecha. El primer tipo, donde dos locus determinan el sexo en los cromosomas sexuales y están presentes en especies como *Xiphophorus maculatus* (pez ornitorrinco) (Kallman, 1973) y *Mus minutoides* (el ratón pigmeo africano) (Veyrunes et al., 2010), y el segundo tipo, en donde existen múltiples loci, segregados independientemente en diferentes cromosomas, que determinan el sexo y están presentes en especies como *Danio rerio* (pez cebra) (Anderson et al., 2012), el molusco *Pomacea canaliculata* (caracol manzana) (Yusa, 2007) y el copépodo *Tigriopus californicus* (Alexander et al., 2015). En este segundo tipo hay un efecto cuantitativo y el sexo es un rasgo que depende de un umbral, por lo tanto, en estos sistemas la proporción de sexos no está equilibrada, como si sucede en los GSD clásicos. No es del todo claro si los sistemas poligénicos son evolutivamente estables o si representan un estado transitorio en la evolución hacia otros sistemas (Picard et al., 2021).

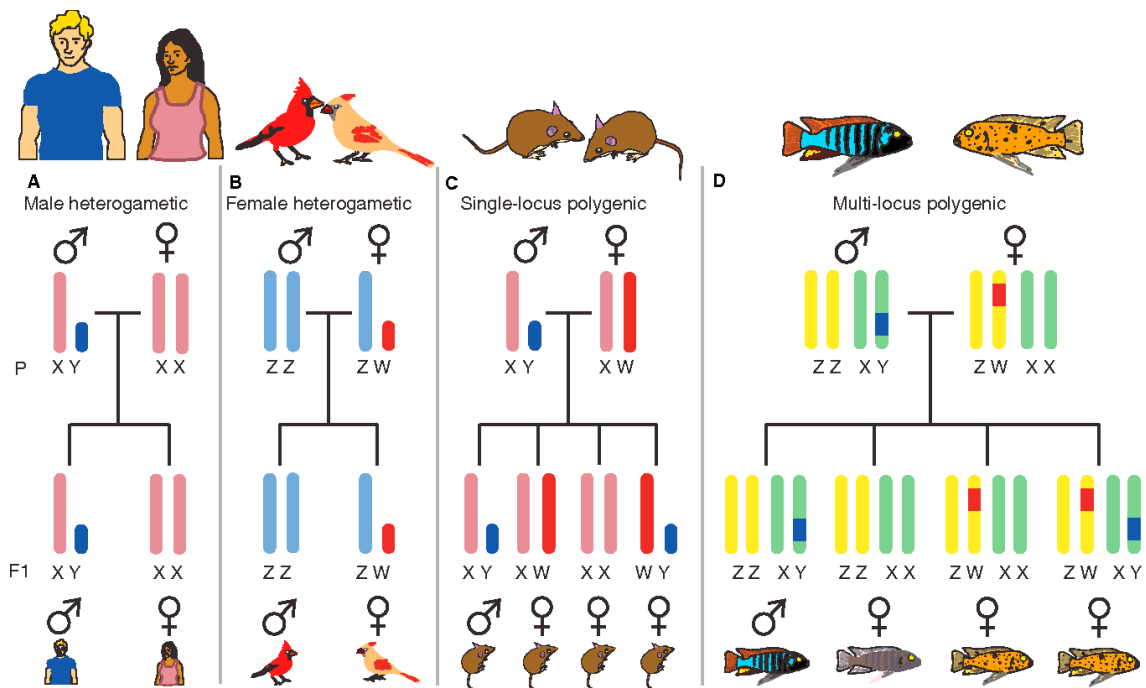


Figura 6. Patrones de herencia en sistemas de determinación XY, ZW y poligénicos. A) Sistema de determinación sexual XY representado por *Homo sapiens*, donde un cromosoma Y degenerado heredado del padre determina el sexo masculino en la descendencia. B) Sistema ZW representado por *Cardinalis cardinalis* (cardenal norteamericano), donde un cromosoma W degenerado determinante del sexo es heredado de la madre. C) Los ratones pigmeos africanos (*M. minotoides*) representan un sistema XYW de un solo locus, donde la herencia de una Y por sí misma determina el desarrollo masculino, pero este sistema es anulado por la presencia de un nuevo determinante del sexo femenino W (también conocido como X* en este sistema). Este sistema poligénico, produce un genotipo masculino y tres genotipos femeninos. D) Los peces cíclidos africanos (*Metriaclima pyrrhonotus*) representan un sistema de múltiples locus, donde los alelos en un locus XY en el cromosoma 7 (verde) y un locus ZW en el cromosoma 5 (amarillo) se segregan independientemente. El alelo W anula el determinante masculino Y de manera que los individuos ZW XY son machos y los otros tres genotipos son hembras. Adicionalmente, un alelo de pigmentación estrechamente ligado al cromosoma W produce un polimorfismo de color en la descendencia femenina. Hay que tener en cuenta que en ambos sistemas poligénicos son posibles otros tipos de cruces con resultados diferentes, ya que existen múltiples tipos génicos de hembras. Figura tomada de Moore y Roberts (2013).

2.2.3 Otros sistemas de determinación sexual

A continuación, se describirán algunos sistemas de determinación sexual exclusivos de invertebrados. Puesto que el presente trabajo está enfocado en el entendimiento de los mecanismos que definen el sexo en vertebrados, no se profundizará mucho en ellos.

Los insectos presentan al menos tres tipos de determinación sexual conocidos: GSD con cromosomas XY o ZW, haplodiploidía y eliminación paterna del genoma (Figura 7) (Blackmon et al., 2017). La alternativa más común a los cromosomas sexuales para definir el sexo en insectos es la haplodiploidía (Bull, 1983; Normark, 2003). En este tipo de determinación sexual, los machos se definen a partir de huevos no fertilizados y tienen una única copia de cada gen (haploidía), mientras que las hembras se desarrollan a partir de huevos fertilizados y tienen dos copias para cada gen (diploidía). La determinación del sexo está regida por el control de las madres en la fertilización de los huevos (Beukeboom y Perrin, 2014). La haplodiploidía ha evolucionado repetidas veces en insectos, ácaros, nematodos y rotíferos, y se estima que el 12% de los animales presentan este tipo de determinación sexual (Jarne y Auld, 2006; The Tree of Sex Consortium, 2014).

Otra alternativa que muestra similitudes con la haplodiploidía es la eliminación paterna del genoma (*Paternal Genome Elimination* o PGE) (Bull, 1983; Austin et al., 2009). Aquí, ambos sexos se desarrollan en huevos fertilizados y durante etapas tempranas del desarrollo en los machos se pierden todos los genes que provienen del padre, generando un organismo haploide. Al igual que ocurre con la haplodiploidía los organismos diploides dan lugar a hembras mientras que los haploides a machos. Este tipo de determinación sexual se ha documentado en varios insectos, ácaros y algunos artrópodos (Normark, 2003; Gardner y Ross, 2014).

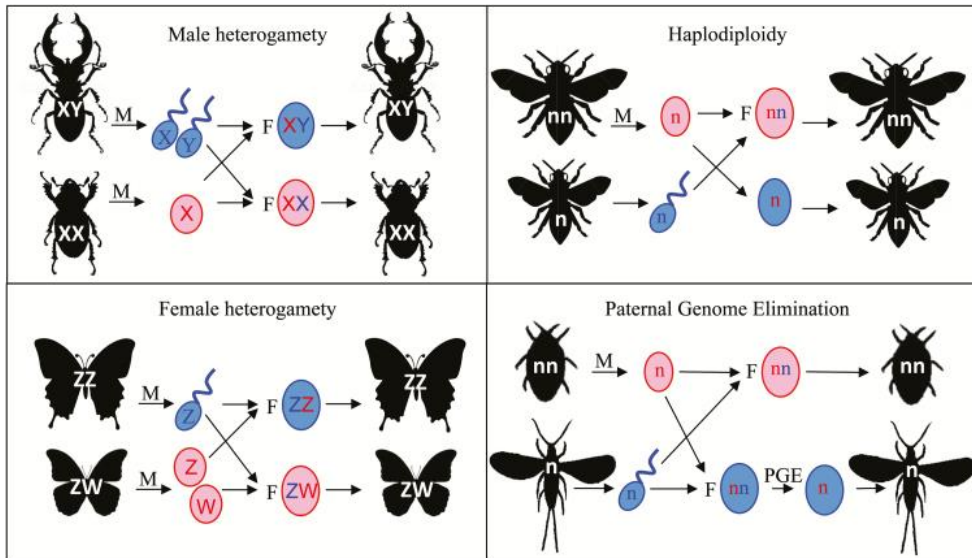


Figura 7. Sistemas de determinación sexual comunes en insectos. En los sistemas XY los machos son el sexo heterogamético con cromosomas XY, las hembras homomórficas tienen cromosomas XX. En los sistemas ZW las hembras son el sexo heterogamético con cromosomas ZW, los machos son el sexo homogamético con cromosomas ZZ. Bajo la determinación del sexo haploide, las hembras se desarrollan a partir de huevos fertilizados diploides (nn) y los machos se desarrollan a partir de huevos haploides no fertilizados (n). En la presencia de PGE, los machos se desarrollan a partir de huevos fertilizados diploides (nn), pero se elimina el genoma paterno durante el desarrollo temprano y se vuelven organismos haploides (n). Los espermatozoides se muestran en color azul e indican el genotipo masculino, los óvulos en color rojo e indican el genotipo femenino. M indica meiosis, F indica fertilización y PGE la eliminación del genoma paterno. Figura tomada de Blackmon et al. (2017).

Por último, está la determinación sexual citoplasmática donde una bacteria intracelular parásita (por ejemplo, *Wolbachia*) o el genotipo de la mitocondria, determina el sexo de las crías (Beukeboom y Perrin, 2014). Los elementos citoplasmáticos son transmitidos a la siguiente generación sólo por hembras, quienes manipulan la determinación sexual. Este tipo de determinación está presente en insectos (Yamada et al., 2007), artrópodos (Badawi et al., 2018; Chebbi et al., 2019), plantas (Landerogott et al., 2009) y nemátodos (Foster et al., 2005). La determinación sexual citoplasmática por la presencia de *Wolbachia* tiene diversos efectos sobre aquellas especies que la presentan (Figura 8) 1) los machos genéticos se convierten en hembras fenotípicas (Badawi et al., 2018; Chebbi et al., 2019), 2) los machos infectados mueren o presentan

incompatibilidad citoplasmática, es decir, los machos infectados sólo pueden reproducirse con hembras infectadas, de no ser así los embriones morirán o la fecundación no podrá ser llevada a cabo (Yamada et al., 2007; Landmann et al., 2009), y 3) las hembras infectadas son capaces de reproducirse por medio de partenogénesis (Huigens; Kremer et al., 2009).

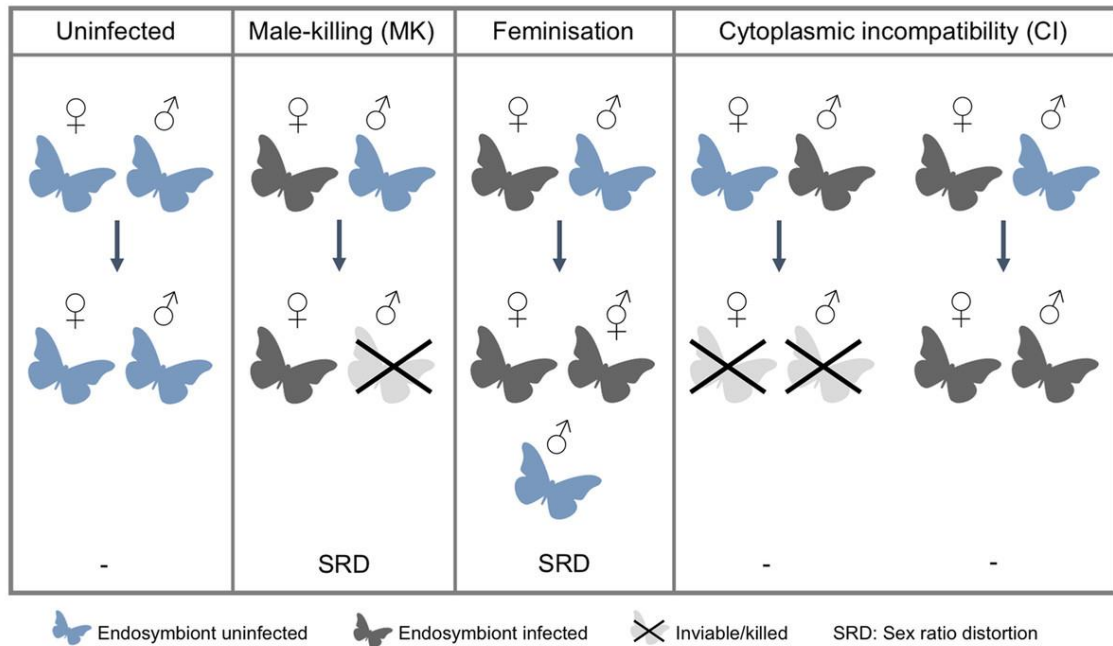


Figura 8. Determinación sexual citoplásmica inducida por *Wolbachia* en Lepidóptera. En los lepidópteros, se sabe que los endosimbiontes como *Wolbachia* manipulan la reproducción del huésped de tres formas para aumentar su transmisión a la siguiente generación. Muerte de los machos: las hembras hospederas infectadas con endosimbiontes que matan a los machos dan lugar a una descendencia de solo hembras infectadas, y los machos mueren en el desarrollo temprano. Feminización: las hembras hospederas infectadas con el endosimbionte feminizante solo da lugar a hembras infectadas, habiendo feminizado los machos genéticamente masculinos (ZZ) en hembras fenotípicas. Los machos no infectados pueden surgir en las transmisiones ineficaces de la infección. Incompatibilidad citoplasmática: los cruces entre hembras no infectadas y machos infectados da como resultado poca o ninguna descendencia viable, como resultado de una incompatibilidad inducida por el endosimbionte en el macho. Las hembras infectadas pueden rescatar esta incompatibilidad y, por lo tanto, pueden producir descendencia viable (infectada) cuando se aparean con machos infectados. Durante la feminización y muerte de los machos, el endosimbionte distorsiona la proporción de sexos, creando un sesgo femenino en la descendencia y, potencialmente en la población si la infección está muy esparcida. Figura tomada de Duplouy y Hornett (2018).

2.3 Origen de los cromosomas sexuales, mantenimiento y evolución.

2.3.1 Origen de los cromosomas sexuales

La teoría más aceptada de la evolución de los cromosomas sexuales indica que éstos surgen a partir de un par homólogo de cromosomas autosómicos, que se convierten en proto-cromosomas sexuales cuando ganan un gen regulador maestro (a través de mutaciones, traslocaciones o duplicación de genes; Beukeboom y Perrin, 2014) capaz de controlar la cascada de determinación sexual (Westergaard, 1958; Müller, 1964; Ohno, 1967). Se conocen algunos genes reguladores maestros encargados de la determinación sexual (Tabla 2) (Bachtrog et al., 2014). En mamíferos placentarios y marsupiales (metaterios) es el gen *Sry* (Sinclair et al., 1990), en monotremas es el gen *AMHY* (Cortez et al., 2014), en aves es el gen *Dmrt1* (Sinclair et al., 1990). Estos genes reguladores maestros se originan por mutaciones puntuales que dan origen a un nuevo alelo o a una nueva región reguladora cuya función es independiente del medio ambiente para su activación.

Tabla 2. Tabla de genes reguladores maestros en vertebrados, especies a las que pertenecen, sistema de determinación sexual en el que se encuentran, genes ancestrales de cual se originaron (ortólogos), teoría de cómo se originaron y función ancestral. DS hace referencia a determinación sexual (*sex determination*). Tabla tomada de Herpin y Schartl (2015).

Gen regulador maestro	Organismo	Sistema de DS	Gen ancestral de la DS	Gen determinante sexual generado del ancestro a partir de	Función del gen ancestral
SRY	Mamíferos terios	XY	Sox3	Diversificación de alelos	Factor transcripcional, requerido en la formación del eje hipotálamo-pituitaria, funciona en la diferenciación neuronal, expresado en el desarrollo de las gónadas.

Gen regulador maestro	Organismo	Sistema de DS	Gen ancestral de la DS	Gen determinante sexual generado del ancestro a partir de	Función del gen ancestral
Dmrt1	Aves	WZ	Dmrt1	Diversificación de alelos	Factor transcripcional, pieza clave en la determinación y diferenciación del sexo masculino.
DM-Y	<i>Xenopus laevis</i>	WZ	Dmrt1	Duplicación génica	Factor transcripcional, pieza clave en la determinación y diferenciación del sexo masculino.
Dmrt1 bY	Medaka (<i>Oryzias latipes</i> , <i>O. curvinotus</i>)	XY	Dmrt1	Duplicación génica	Factor transcripcional, pieza clave en la determinación y diferenciación del sexo masculino.
SdY	Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	XY	Irf9	Duplicación génica	Factor de respuesta al interferón, no se conoce la función en las gónadas.
GsdfY	<i>Oryzias luzonensis</i>	XY	Gsdf	Diversificación de alelos	Factor TGF- β , importante en el desarrollo de gónadas en peces.
Sox3 Y	<i>Oryzias dancena</i>	XY	Sox3	Diversificación de alelos	Factor transcripcional, requerido en la formación del eje hipotálamo-pituitaria, funciona en la diferenciación neuronal, expresado en el desarrollo de las gónadas.
amhY	Perjerrey (<i>Odontesthes hatcheri</i>)	XY	Amh	Duplicación génica	Hormona anti-muleriana, factor de crecimiento
amhr 2Y	Fugu (<i>Takifugu rubripes</i>)	XY	Amh receptor 2	Diversificación de alelos	Receptor tipo 2 para Amh, función importante en el

Gen regulador maestro	Organismo	Sistema de DS	Gen ancestral de la DS	Gen determinante sexual generado del ancestro a partir de	Función del gen ancestral
					desarrollo de las gónadas, mutantes en el pez medaka produce reversión del sexo.
Dmrt1	Lenguado chino (<i>Cynoglossus semilaevis</i>)	WZ	Dmrt1	Diversificación de alelos	Factor transcripcional, pieza clave en la determinación y diferenciación del sexo masculino.
GsdfY	Pez sable (<i>Anoplopoma fimbria</i>)	XY	Gsdf	Diversificación de alelos	Factor TGF- β , importante en el desarrollo de gónadas en peces.

En apoyo a esta teoría de la evolución de los cromosomas sexuales, se ha observado que algunos cromosomas sexuales son homólogos a cromosomas autosómicos en otros grupos. Por ejemplo, el cromosoma Z de *Gallus gallus* (gallina común) es homólogo a los cromosomas 9 y 5 del humano, mientras que el cromosoma X de mamíferos placentarios es homólogo al cromosoma 4 de *G. gallus* y parte del cromosoma 1. El cromosoma Z en serpientes es homólogo al cromosoma 2 de *G. gallus*, pero el cromosoma Z de las aves es homólogo al cromosoma 2 de las serpientes (Graves, 2008).

Una vez que un gen regulador maestro surge dentro del autosoma que dará origen a un cromosoma sexual, el primer paso evolutivo debe ser la supresión de la recombinación homóloga. La supresión de la recombinación homóloga durante las primeras etapas evolutivas del nuevo par de cromosomas sexuales es importante, ya que evita la modificación, “reparación” y posterior pérdida de las mutaciones que originaron la función de determinación sexual en los nuevos genes reguladores maestros (Sun y Heitman, 2012; Charlesworth et al., 2005; Beukeboom y Perrin, 2014). Esto se puede asegurar a través de rearrreglos cromosómicos (en su mayoría inversiones) que promueven la supresión de la recombinación entre los cromosomas sexuales, lo cual ha sido

apoyado ampliamente por estudios empíricos y teóricos (Bergero y Charlesworth, 2009; Kirkpatrick, 2010). En un inicio esta supresión sólo afecta a un pequeño segmento, que es donde se encuentra la región que determina el sexo, pero posteriormente la región no-recombinante tiende a expandirse a lo largo de todo el cromosoma. Este patrón se ha observado en diferentes grupos de especies (Cortez et al., 2014), en donde la evolución de cromosomas sexuales genera regiones no recombinantes, lo cual lleva consigo la supresión de la recombinación y la posterior reducción de tamaño en el cromosoma Y o W, según sea el caso (Figura 9).

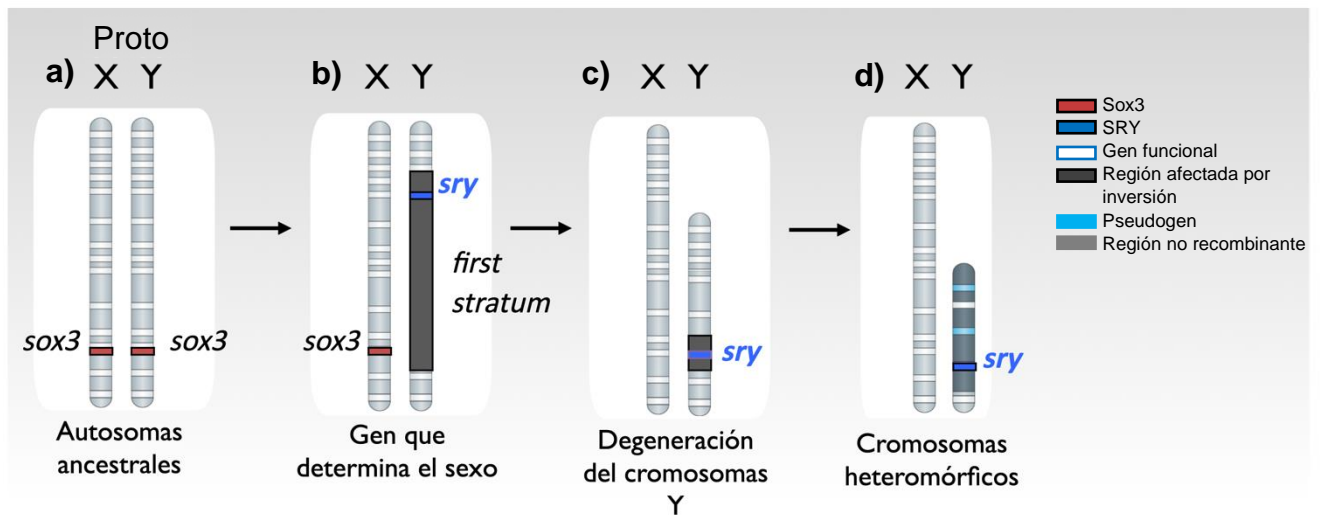


Figura 9. Surgimiento y degeneración en sistemas GSD (representado por el sistema de mamíferos) que comienza con la aparición de un gen regulador maestro, el gen *Sry*, a partir de una mutación en una de las copias del gen *Sox3*. a) cromosomas autosómicos previos a convertirse en cromosomas sexuales, b) mutación de uno de los genes *Sox3* que da paso al surgimiento de un gen regulador maestro (*Sry*) encargado de la determinación sexual acompañado de una inversión en el cromosoma donde dicho gen, c) pérdida de genes en el cromosoma Y a causa de la falta de recombinación homóloga con el cromosoma X, d) continuación de la pérdida de genes en el cromosoma Y, y acumulación de mutaciones repetidas que en su conjunto crean un par de cromosomas sexuales heteromórficos bien diferenciados. Figura modificada de Bachtrog et al. (2014).

2.3.1.1 Tasas de mutación en cromosomas sexuales

Las tasas de mutación suelen ser mucho más altas en los machos que en las hembras porque los gametos masculinos se dividen más que los gametos femeninos (Wilson Sayres y Makova, 2011). Por lo tanto, durante la espermatogénesis hay más estrés oxidativo y menos reparación del DNA comparado con la ovogénesis (Aitken y Graves, 2002). Por esta misma razón, los genes que están en los cromosomas Y/W tienden a tener una tasa de mutación más elevada que los cromosomas X/Z. A este efecto se le conoce como *sesgo de mutación masculina*. Por el contrario, los genes que se encuentran en los cromosomas X/Z tienen tasas de mutación más bajas (Kirkpatrick y Hall, 2004). Malcom et al. (2003) demostraron que las tasas de sustitución sinónimas en los cromosomas X de mamíferos es 19% menor que en los autosomas, y a su vez los cromosomas Y tienen una tasa de sustitución sinónima de tres a cinco veces más elevada que en los autosomas.

Aun cuando el sesgo de mutación masculina es el factor mayormente aceptado para explicar las tasas de mutación diferenciales entre los cromosomas sexuales y autosómicos, hay otros factores que influyen en las tasas de mutación entre cromosomas. Incluso los cromosomas autosómicos muestran diferentes tasas de mutación entre sí, particularmente en especies con microcromosomas en donde las tasas de sustitución sinónimas son más altas que en los macrocromosomas (Axelsson et al., 2005; Ellegren, 2007).

2.3.2 Degeneración de los cromosomas sexuales

La falta de recombinación homóloga entre cromosomas sexuales en el sexo heterogaméticos, no sólo representa el primer paso para mantener los genes determinantes del sexo, también es el primer paso para la eventual pérdida masiva de genes (Beukeboom y Perrin, 2014). Aun cuando se evita que se pierda la nueva mutación mediante la reparación homóloga, también se favorece a la acumulación de mutaciones de los genes contenidos en el cromosoma Y/W, ocasionando su fijación y provocando la pérdida de función o completa

eliminación dentro del genoma (Kim y Stephan, 2000). Adicionalmente, la falta de recombinación favorece la acumulación de secuencias repetidas y la consecuente reducción de tamaño en el cromosoma Y/W (Blackmon y Demuth, 2015), lo que se conoce como degeneración del cromosoma Y/W. Un claro ejemplo son los cromosomas Y ancestrales en humanos y la gran mayoría de mamíferos placentarios (Hughes et al., 2012; Raudsepp et al., 2012; Cortez et al., 2014), reptiles como *A. carolinensis*, *Brachylophus fasciatus*, *Chalarodon madagascariensis* y varias especies del género *Oplurus* (Marin y Cortez et al., 2017; Altmanová et al., 2016), aves como *G. gallus* (Moghadam et al., 2012), insectos en el suborden de escarabajos *Polyphaga* (Blackmon y Demuth, 2014), moscas del género *Drosophila* (Koerich, et al., 2008). A manera de ejemplo, los cromosomas jóvenes de *Drosophila miranda* (Bachtrog et al., 2008; Nguyen y Bachtrog, 2021) están casi completamente degenerados y son completamente heteromórficos, son ricos en secuencias repetidas y contienen sólo unos pocos genes funcionales. Aitken y Graves (2002) estiman que desde la aparición del sistema de determinación sexual XY en mamíferos, se han perdido en promedio cinco genes por cada millón de años, y se predice que en 10 millones de años éstos podrían desaparecer.

Actualmente, los cromosomas Y en humanos han perdido el 97% de su contenido genético original (Skaletsky et al., 2008; Livernois et al., 2012; Cortez et al., 2014). La degeneración del cromosoma Y puede permitir el establecimiento de mutaciones no benéficas en los cromosomas Y/W, afectando la adecuación del sexo que lo porta y convirtiéndolo en una carga. En humanos, se ha documentado que las traslocaciones de genes que tienen como destino el cromosoma Y pueden provocar oligozoospermia (baja producción de espermatozoides) e incluso infertilidad (Alves et al., 2002; Wang et al., 2017).

La aceleración en la acumulación de secuencias repetidas y mutaciones deletéreas (comparando con la velocidad en la que las mismas se acumulan en sus homólogos X/Z) se ha documentado en los cromosomas heteromórficos (Y/W) de linajes como mamíferos (Agulnik et al., 1997; Wyckoff et al., 2002; Tucker et al., 2003; Cortez et al., 2014), aves (Fridolfsson y Ellengren, 2000; Berlin y Ellengren, 2006), reptiles (Marin y Cortez, et al., 2017), insectos

(Bachtrog y Charlesworth, 2002; Kaiser, 2010; Kaiser y Charlesworth, 2010; Nguyen y Bachtrog, 2021) e incluso plantas (Filatov y Charlesworth, 2002).

Por ejemplo, se ha reportado que en los marsupiales los cromosomas sexuales están completamente diferenciados y ya no comparten regiones homólogas (Graves, 1995). En el caso de los mamíferos placentarios, se sabe que los cromosomas sexuales han tenido una serie de translocaciones a lo largo del tiempo que han provocado una alta diferenciación; sin embargo, siguen conservando pequeñas regiones homólogas (PAR) (Graves et al., 1998; Cortez et al., 2014). Este proceso de diferenciación entre los cromosomas sexuales ha provocado una reducción drástica de tamaño del cromosoma Y con respecto a su homólogo, el cromosoma X. Aun cuando lo anterior es un rasgo general para todos los placentarios, hay especies que no comparten dichas características, como el ratón *Mus minutoides* (Britton-Davidian et al., 2012), especie en el género de roedores *Microtus* (Borodin et al., 2012) o los jerbos *Meriones unguiculatus*, los cuales poseen cromosomas completamente diferenciados (de la Fuente et al., 2007). Al menos dos especies de topos del género *Ellobius* (Bakloushinskaya et al., 2018) y dos especies de ratones del género *Tokudaia* (Arakawa et al., 2002; Korojima et al., 2010; Washio, 2019) han perdido por completo sus respectivos cromosomas Y, y varios de los genes más importantes que estaban en el Y ancestral se translocaron a un nuevo cromosoma Y.

Incluso especies con cromosomas sexuales jóvenes, como el caso de *D. miranda*, la cual tiene neo-cromosomas sexuales (cromosomas sexuales que se fusionaron con un par autosomal) que surgieron hace 1.75 millones de años aproximadamente, ya han acumulado cambios suficientes como para que al menos la mitad del contenido genético en el neo-cromosoma Y sean secuencias repetidas y elementos transponibles. Estos últimos forman parte del 20% de la secuencia del cromosoma (los cromosomas X poseen solo el 1% de elementos transponibles) (Bachtrog et al., 2008).

2.3.2.1 Modelos evolutivos de su degeneración

Uno de los modelos que explica la evolución de la degeneración del cromosoma Y/W fue propuesto inicialmente por Müller (1964). Este modelo propone que la deriva génica jugaba un papel importante en la degeneración de los cromosomas en regiones no recombinantes. A este proceso estocástico se le conoce actualmente como "Muller's ratchet". En ausencia de entrecruzamiento de una región entre dos cromosomas, éstos pueden acumular mutaciones deletéreas en las regiones no recombinantes. Si los individuos con los cromosomas con menor carga de mutación se pierden mediante deriva génica, y los individuos con mayor carga de mutaciones se mantienen dentro de las poblaciones la degeneración del cromosoma será irreversible. Habrá una pérdida progresiva de genes, reduciendo la adecuación de los individuos dentro de las poblaciones.

El efecto Hill-Robertson podría ser uno de los principales factores que intervienen en la degeneración del cromosoma Y/W que han evolucionado a unidades heterocigóticas permanentes no recombinantes (Charlesworth y Charlesworth, 2000; Presgraves, 2005). El efecto Hill-Robertson predice que las regiones genómicas con poca recombinación exhiben niveles reducidos de adaptación y variabilidad, causada por acción de la selección de sitios estrechamente ligados (Hill y Robertson, 1966; Gordo y Charlesworth, 2001). Este efecto surge del hecho de que cualquier locus ligado a otro que está bajo selección direccional, experimenta una reducción en el tamaño efectivo de la población (N_e).

En el caso de los cromosomas sexuales, los cromosomas Y/W han reducido su tamaño efectivo en una proporción de sexos 1:1 a 1/4 (solo presentes en machos), mientras que los cromosomas X/Z se mantiene en relación 3/4 (2/4 partes en hembras y 1/4 parte en machos), comparados con los cromosomas autosómicos que se mantienen en relación 4/4 (2/4 machos y 2/4 hembras). Dado que la eficacia de la selección sobre una mutación es función del producto de N_e y del efecto de la mutación sobre la adecuación (Kimura, 1983), tal ligamiento afecta la probabilidad de fijación de las nuevas mutaciones, siendo menos probable que las mutaciones favorables alcancen la fijación y lo contrario para las mutaciones deletéreas (Berlin et al., 2007).

El efecto Hill-Robertson puede ser causado por la fijación de mutaciones ventajosas (Gillespie, 2000), la eliminación de mutaciones deletéreas recurrentes (Charlesworth, 1993), la acumulación estocástica de mutaciones deletéreas (*Muller's ratchet*, Muller, 1964; Kim y Stephan, 2000) y la interferencia mutua entre mutaciones débilmente seleccionadas que pasan largos periodos en frecuencias intermedias (selección débil de interferencia de Hill-Robertson: McVean y Charlesworth, 2000; Comeron y Kreitman, 2002).

Cuando hay recombinación, se espera que la selección actúe con eficacia, puesto que el N_e es alto. Por el contrario, cuando el N_e es bajo, se esperan tasas más bajas de evolución adaptativa, tasas más altas de fijación de mutaciones deletéreas, además de una reducción en la variabilidad en los sitios neutros o casi neutros, ya que su variabilidad es proporcional al N_e y la tasa de mutaciones (Kimura, 1983; Berlin et al., 2007).

Por otra parte, el reclutamiento genético (*genetic draft* o *hitchhiking* en inglés), el cual está fuertemente vinculado con el efecto de Hill-Robertson, propone que cuando una mutación benéfica aparece en un cromosoma no recombinante, ésta puede favorecer la fijación de todos los genes ligados, e incluso mutaciones deletéreas que se encuentran en esta misma región. La selección de la mutación favorable también aumentará la frecuencia de todos los genes asociados con ella (Maynard y Haigh, 1974). Los barridos selectivos (*selective sweeps*) posteriores, causaran la fijación de alelos deletéreos en los loci relacionados a los cromosomas Y/W, haciendo que la selección incremente la actividad de los loci no mutantes relacionados a los loci que tienen los alelos mutantes (Charlesworth, 1996).

2.3.3 Compensación de dosis en cromosomas sexuales

La pérdida masiva de material genético en el cromosoma Y por la acumulación de mutaciones deletéreas, y la ausencia de recombinación homóloga (Beukeboom et al., 2014), acarrea consigo un desbalance en la dosificación de los genes (cantidad de transcritos y proteínas) entre los dos sexos. El sexo heterogamético tendrá un solo cromosoma X/Z (mitad de la dosis original),

mientras que el sexo homogamético mantendrá dos copias XX/ZZ (Mank, 2013; Graves 2016). La solución evolutiva a este problema varía entre especies, pero todas han encontrado mecanismos para mantener un equilibrio en la expresión de los cromosomas X/Z de machos y hembras. A este mecanismo se le conoce como “compensación de dosis” y fue descrito a grandes rasgos por primera vez bajo la teoría de compensación de dosis de Ohno (1967). La finalidad de este mecanismo es mantener la expresión ancestral de los genes, cuando aún eran cromosomas autosómicos, en los cromosomas sexuales (Charlesworth, 1996). La teoría original de Ohno fue apoyada por trabajos empíricos con mamíferos (Gupta et al., 2006; Nguyen y Disteché, 2006), *Caenorhabditis elegans* (Ercan et al., 2007; Reinke et al., 2004), *Drosophila* (Baker et al., 1994; Franke y Baker, 1999) y *A. carolinensis* (Marin y Cortez et al., 2017), organismos que exhiben una compensación de dosis completa según las predicciones de Ohno (1967).

Uno de los sistemas de compensación de dosis más conocidos es el de los mamíferos terios, cuyos cromosomas sexuales surgieron hace aproximadamente 180 millones de años (Cortez et al., 2014), desde entonces, el cromosoma Y ha tenido una pérdida masiva de genes y cromosoma X adquirió un mecanismo que puede restaurar el balance en la expresión entre machos y hembras. Un RNA largo no codificante llamado *Xist* se encarga de inactivar uno de los dos cromosomas X en las hembras, para que ambos sexos tengan el mismo nivel de expresión (Plath et al., 2002). *Xist* es capaz de recubrir el cromosoma X que se va a inactivar y se asocia con proteínas que metilan las histonas y silencian la cromatina (Sado, 2017).

En invertebrados, como en la mosca de la fruta (*D. melanogaster*), se ha identificado un mecanismo distinto a lo documentado en mamíferos. Aquí, los machos sobre-expresan el cromosoma X para igualar el nivel de expresión transcripcional de las hembras (con dos X activos) (Conrad et al., 2012). Este proceso es llevado a cabo por el gen *Rox2*, un RNA largo no codificante, que se expresa en estadios tempranos del desarrollo en machos y recluta al complejo MSL que es capaz de acetilar las histonas y promover la transcripción.

En reptiles como en *A. carolinensis*, una lagartija perteneciente al infraorden Iguania, existe una expresión igual del cromosoma X en machos y en hembras, aun cuando los machos poseen sólo una copia del cromosoma X. En

A. carolinensis, al igual que en *D. melanogaster*, una sobre-expresión del cromosoma X en machos resuelve el conflicto entre machos y hembras. Este es un muy buen ejemplo de convergencia evolutiva entre dos especies lejanas; en ambos casos, tanto en *A. carolinensis* como en *D. melanogaster*, la sobreexpresión del cromosoma X en machos es producida a través de la sobreacetilación de la lisina 16 de la histona 4 (H4K16ac) (Marin y Cortez et al., 2017).

2.3.4 Desaparición de los cromosomas sexuales

La degeneración del cromosoma Y/W puede llegar a ser tan extrema que incluso puede llevar a su desaparición (Steinemann y Steinemann, 2005; Blackmon y Demuth, 2015; Wilson et al., 2020). Ejemplos claros de como cromosomas degenerados (Y/W) pueden llegar a desaparecer de las poblaciones han sido documentados en insectos como *Drosophila* (Aitken y Graves, 2002; Szabad et al., 2012), mamíferos como *Ellobius* (Just et al., 1995; Bakloushinskaya et al., 2018) o *Tokudaia* (Koroiwa et al., 2010; Washio, 2019) y en algunos artrópodos (Arunkumar et al., 2008; Blackmon y Demuth, 2014; Tandonnet et al., 2019) que carecen de cromosomas Y/W caracterizados como sistemas XX/XO o ZO/ZW.

La hipótesis de “la fragilidad del cromosoma Y” propuesta por Blackmon y Demuth (2015) sostiene que la degeneración excesiva de un cromosoma sexual Y o W puede convertirse en una carga evolutiva debido a que la gran pérdida de genes o la acumulación desmedida de secuencias repetidas, resultando de la falta de recombinación homóloga, que pueden afectar la homeostasis de las células. Por ejemplo, en humanos, la pérdida periférica del cromosoma Y al envejecer es la única mutación que está correlacionada con la muerte temprana de los hombres y con una mayor predisposición al cáncer (Forsberg et al., 2014). Esta teoría está íntimamente relacionada a casos en donde los cromosomas sexuales divergieron hace mucho tiempo y donde los cromosomas XY o ZW sólo recombinan en unas pequeñas regiones extremas, denominadas regiones pseudo-autosómicas (en inglés *pseudo-autosomal region* o PAR) (Beukeboom y Perrin, 2014). Durante la anafase, con la formación de los quiasmas (estructuras especializadas que mantienen unidos a los cromosomas y permiten su correcta

segregación) y cuando la recombinación ocurre, el apareamiento físico entre los cromosomas es necesario para su correcta segregación (Petronczki et al., 2003). Es aquí cuando las regiones PAR juegan un papel muy importante. Las regiones PAR dentro de los cromosomas sexuales son las únicas regiones que aún mantienen homología entre el cromosoma X/Z y el cromosoma Y/W, y permiten la correcta segregación de los cromosomas sexuales en la meiosis masculina. Cuando las PAR tienden a ser muy pequeñas, hay más probabilidades de que se pierda un cromosoma durante los procesos de división meiótica (Blackmon y Demuth, 2015). En mamíferos, las regiones PAR de los cromosomas sexuales van de las 0.7 a las 6 Mb. En el ser humano, las regiones PAR son de aproximadamente 2.67 Mb (Raudsepp et al., 2012), en donde el cromosoma X tiene una longitud de 156 Mb y el cromosoma Y de 57 Mb (Howe et al., 2021).

Durante las divisiones meióticas, las anomalías cromosomales más comunes en caballos, humanos y ratones es la presencia de cariotipos XO, ya que estos organismos son quienes presentan las regiones PAR más pequeñas (0.7 Mb a menos de 3 Mb), por otro lado, en vacas, gatos, perros, cerdos y alpacas, rara vez se presentan cariotipos XO durante la meiosis, pues estos organismos tienen regiones PAR mayores a 6 Mb (Raudsepp et al., 2012). Los cromosomas autosómicos completamente recombinantes, aunque no iguales en su totalidad, son quienes presentan menores tasas de aneuploidías comparados con los cromosomas sexuales (Gersen et al., 2013).

La pérdida del cromosoma Y parece ser el final evolutivo de los cromosomas sexuales (Blackmon y Demuth, 2015). Este evento es más común de lo que se piensa, donde hasta un 25% del total de los animales con cromosomas sexuales conocidos (1925 de 7561 animales con cromosomas sexuales registrados) pueden presentar organismos viables con cariotipos XO (The Tree of Sex Consortium, 2014). Al menos dos factores pueden alentar la pérdida del cromosoma Y: la haplosuficiencia de los gametólogos y de los genes en la región pseudoautosomal, o la falta de nuevos genes que regulen la determinación del sexo y la espermatogénesis (Cortez et al., 2014).

Una idea novedosa de la teoría de la fragilidad del cromosoma Y (Blackmon y Demuth, 2015) es que la evolución de los cromosomas sexuales puede promover la evolución de mecanismos alternativos de segregación. La

evolución de mecanismos como la meiosis aquíasmática permite la segregación del cromosoma X/W en ausencia de quiasmas, lo que podría ser una estrategia a la cual pueden recurrir las especies para retener el cromosoma Y/W a largo plazo (Figura 10).

Algunas especies de Coleoptera y Adephaga han evolucionado de forma independiente hacia meiosis aquíasmática (López-López et al., 2013). Los marsupiales por su parte, al perder por completo sus regiones PAR, han adoptado un mecanismo de segregación asináptica de los cromosomas sexuales. A la fecha no hay registro de la pérdida del cromosoma Y en marsupiales, mientras que en los mamíferos placentarios que requieren de quiasmas para la correcta segregación de los cromosomas sexuales, se han reportado pérdidas del cromosoma Y al menos tres veces (Ashman et al., 2014).

2.3.6 Rejuvenecimiento de los cromosomas sexuales

Una de las estrategias para retener al degenerado cromosoma Y/W y evitar que este desaparezca es el rejuvenecimiento de cromosomas sexuales a través de fusiones o translocaciones con cromosomas autosómicos, lo que permite el incremento en regiones PAR o en contenido genético (Blackmon y Demuth, 2015; Anderson et al., 2020) (Figura 10). Por ejemplo, en mamíferos, dos especies de ratones del género *Tokudaia* han perdido por completo sus cromosomas Y (Arakawa et al., 2002; Korojima et al., 2010; Washio, 2019), mientras que en una tercera especie ha ocurrido el rejuvenecimiento de sus cromosomas sexuales por medio su fusión con autosomas (Murata et al., 2012).

Las fusiones como en su nombre lo indica, constan de la fusión de uno o los dos cromosomas sexuales con una región o con un par de cromosomas autosómicos, reiniciando el proceso de degeneración del cromosoma Y. Esta forma de rejuvenecimiento se ha documentado en mamíferos placentarios, en donde la mayor parte del contenido de las regiones PAR es de origen autosómico en marsupiales (Graves et al., 1998). Se ha sugerido que este rejuvenecimiento de los cromosomas sexuales en placentarios ocurrió hace 80 a 130 millones de años. Las fusiones entre cromosomas autosómicos y sexuales han ocurrido

múltiples veces en la evolución de los cromosomas sexuales de los mamíferos (Veyrunes et al., 2008).

Recientemente se ha comprobado de forma empírica la existencia de fusiones de cromosomas sexuales con autosomas en diversos grupos de invertebrados. En estos trabajos se encontró que la tasa de establecimiento de fusiones Y-autosoma, es más alta que las fusiones X-autosoma, Z-autosoma o W-autosoma. Sin embargo, en peces, reptiles y mamíferos, las fusiones Y-autosoma y X-autosoma son igual de comunes (Yoshida y Kitano, 2012; Pennell et al., 2015; The Tree of Sex Consortium, 2014).

Alternativamente, el rejuvenecimiento del cromosoma Y se puede dar a través de traslocaciones con otros cromosomas. No todas las traslocaciones rejuvenecen la región PAR, por lo que éstas no contribuyen a que se presenten menor cantidad de aneuploidías. Se ha documentado en *Drosophila* que las traslocaciones pueden beneficiar al sexo masculino en organismos con genotipo XO que han adquirido genes masculinizantes, por medio de traslocaciones a cromosomas autosómicos (llamado cromosoma B). Estos individuos se convierten en machos fértiles, pues los cromosomas autosómicos suplen la función del cromosoma Y que desapareció (Carvalho, 2002).

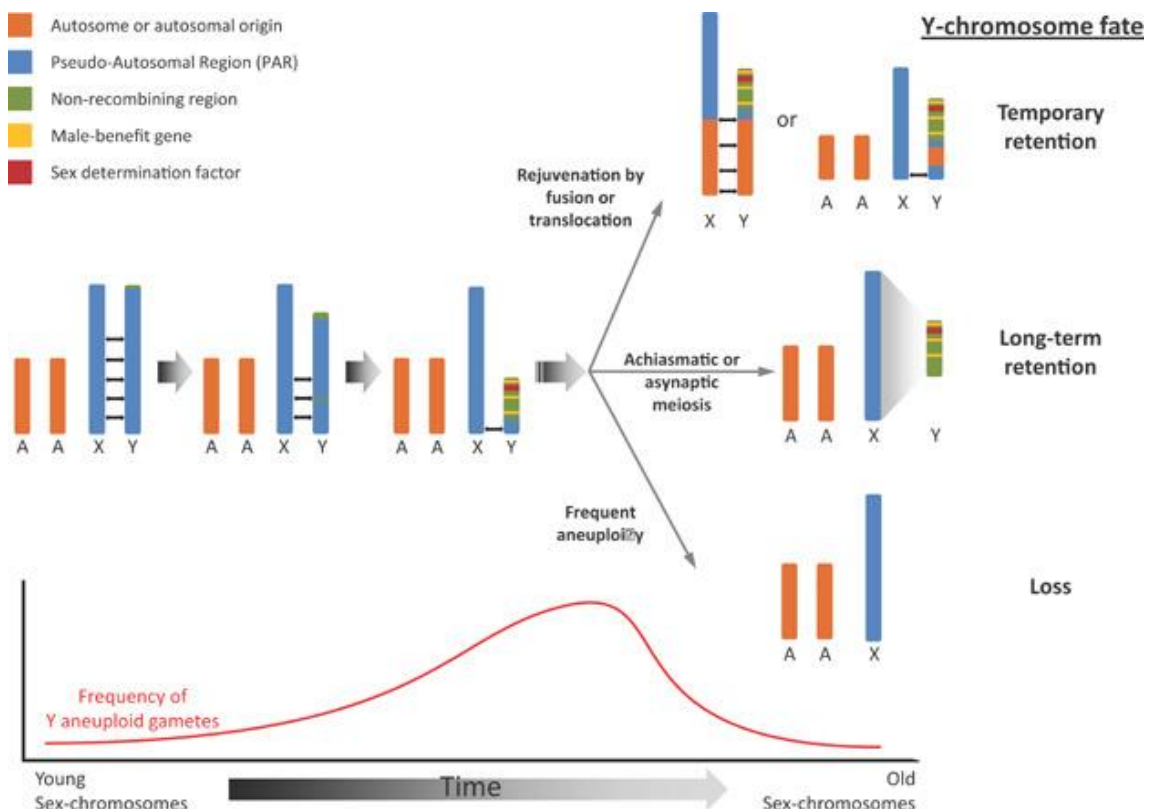


Figura 10. Destinos del cromosoma Y a través del tiempo. Se espera que las fuerzas genéticas de las poblaciones conduzcan a una región PAR cada vez más pequeña. El gráfico en la parte inferior representa el hipotético incremento de la frecuencia de la aneuploidía (pérdida) de los genes del cromosoma Y, que acompaña su degeneración. El costo del aumento de la aneuploidía puede aliviarse mediante uno de los tres destinos del cromosoma Y: arriba, la retención temporal a través del rejuvenecimiento de la región PAR; en medio, la retención a largo plazo del cromosoma Y, consecuencia de la pérdida masiva de genes que genera un cromosoma Y completamente diferenciado y la completa ausencia de las regiones PAR; abajo, la desaparición del cromosoma Y, y la transición hacia un sistema de cromosomas sexuales XO. Aunque la imagen representa un sistema XY, esta misma dinámica es visible los cromosomas ZW. Figura tomada de Blackmon y Demuth (2015).

2.3.7 Transiciones de determinación sexual

Aunque ciertos grupos de organismos aparentemente poseen cromosomas sexuales conservados, otros exhiben una rápida evolución de sus cromosomas sexuales, como peces (Conover y Heins, 1987; Mank et al., 2006; Ross et al., 2009), anfibios (Hillis et al., 1990; Furman y Evans, 2016; Miura, 2017), reptiles (Ezaz et al., 2009; Pokorná y Kratochvíl, 2009; Gamble et al., 2015, 2017; Acosta, 2019), insectos (Kaiser et al., 2010; Beukeboom y Perrin, 2014; Vicoso y Bachtrog, 2015) y plantas (Slancarova et al., 2013; Pucholt et al., 2015, 2017). Así, se han documentado transiciones de sistemas de determinación sexual en diversas especies en donde los cromosomas sexuales con los que éstas contaban en un inicio regresaron a ser cromosomas autosómicos y el surgimiento de un nuevo par de cromosomas sexuales reemplazó la función de los cromosomas sexuales ancestrales (White, 1973; Palmer et al., 2019). Este proceso puede ser una alternativa de las especies para poder escapar de la aparente “trampa evolutiva” en la que los cromosomas sexuales heteromórficos se convierten con el paso del tiempo (Pennell et al., 2018).

Un nuevo par de cromosomas sexuales puede surgir cuando el nuevo sistema de determinación sexual “secuestra” al sistema preexistente de cromosomas sexuales. Estos eventos de transiciones de determinación sexual tienen consecuencias importantes en múltiples facetas evolutivas, ya que los

cromosomas sexuales juegan un papel muy importante en la adaptación, el dimorfismo sexual y la especiación (Palmer et al., 2019). Las transiciones de cromosomas sexuales pueden conservar el patrón de heterogametos, es decir, el recambio de cromosomas sexuales es de un XY a otro XY o de un ZW a otro ZW, y son llamadas transiciones cis-heterogaméticas. Por otro lado, las transiciones pueden no conservar los patrones de heterogametos, es decir, puede haber un recambio de cromosomas XY a ZW o viceversa, y son llamadas transiciones trans-heterogaméticas (Saunders, 2019). Durante el inicio de transición y mientras se fija un nuevo sistema de determinación sexual, las especies pasarán por una fase poligénica, es decir, hay dos sistemas de determinación sexual dentro de una misma población y la transición se alcanzará cuando el locus ancestral determinante del sexo se pierda (Saunders et al., 2018). Las transiciones de cromosomas ZW a XY en peces y anfibios parecen ser más comunes que las transiciones de XY a ZW (Pennell et al., 2018; Evans et al., 2012), mientras que en reptiles parece no haber un tipo de transición que surja con mayor frecuencia (Pennell et al., 2018).

Una gran cantidad de trabajos han descrito teóricamente las predicciones sobre cuándo y por qué ocurren transiciones de los cromosomas sexuales, evaluando aspectos como la deriva génica (Bull y Charnov, 1977; Saunders et al., 2018), la carga de mutaciones deletéreas (Blaser et al., 2013, 2014), la selección en proporción de sexos (Jaenike, 2001; Werren y Beukeboom, 1998) y la selección sexual antagonista (van Doorn y Kirkpatrick, 2007, 2010). Sin embargo, los intentos de explorarlos empíricamente se han limitado a unos pocos clados de: insectos (Blackmon y Demuth, 2014), ranas (Jeffries et al., 2018) y peces (Kitano y Piechel, 2012; Wrigh et al., 2017).

2.3.7.1 Deriva génica y transición de cromosomas sexuales

La deriva génica puede ser un factor importante en las transiciones de sistemas de determinación sexual, específicamente cuando surge un nuevo gen determinante sexual, aunque con la misma adecuación que el sistema ancestral (Bull y Charnov, 1977). Es aquí, cuando la deriva génica puede cambiar la

frecuencia de los alelos, por lo que por puro azar puede fijarse un nuevo sistema de determinación sexual en las poblaciones (Veller et al., 2017).

Las transiciones de sistemas de determinación sexual mediadas por deriva génica deben ser más comunes en especies con tamaños efectivos de población pequeños, en donde la frecuencia de los alelos en las poblaciones y el tamaño efectivo de la población juega un papel crucial (Elena y Lenski, 2003; Hegreness et al., 2006).

En sistemas poligenéticos como propone Saunders et al. (2018) en donde los tamaños efectivos de población frecuentemente son grandes, si surge un nuevo genotipo capaz de determinar el sexo que mantuviese el mismo nivel de adecuación que el ancestral, o incluso si en el mismo sistema poligénico ancestral ninguno de los alelos es dominante sobre el otro, el establecimiento de uno de los dos sistemas puede llegar a ser muy lento. Es aquí cuando la deriva génica puede jugar un papel importante para establecer cuál de los dos sistemas de determinación sexual se fijará en las poblaciones. Lamentablemente muy pocos sistemas de determinación sexual de este tipo han descritos y estudiados lo suficiente para apoyar esta predicción (Saunders et al., 2018).

2.3.7.2 Carga de mutaciones deletéreas en cromosomas sexuales.

Algunas predicciones de la transición de cromosomas sexuales surgen de la hipótesis de la acumulación de mutaciones (Blaser et al., 2014; van Doorn y Kirkpatrick, 2010; Jeffries et al., 2018; Scott et al., 2018). El primer paso es tener presente un sistema fijo de determinación sexual ancestral degenerado, el segundo paso es la acumulación de factores asociados a una gran cantidad de mutaciones deletéreas causantes de la alta degeneración del cromosomas Y/W. Estas mutaciones pueden estar vinculadas a heteroquiasma o aquiasma, donde la recombinación es reducida o simplemente inexistente en un sexo (el sexo portador de los cromosomas heteromórficos XY/ZW), lo cual podría evitar que sean eliminadas mediante recombinación homóloga y acelerando su acumulación en el cromosoma Y/W.

El proceso anterior lleva a la pérdida progresiva de la función de los genes que se encuentran en la región no recombinante de estos cromosomas con recombinación reducida. En mamíferos placentarios se ha observado que los genes que están en el cromosoma Y tienen niveles de expresión reducidos debido, probablemente, a mutaciones ligeramente deletéreas acumuladas en los promotores y *enhancers* (Martínez-Pacheco et al., 2020). Estos cambios paulatinos en la expresión de los genes en el Y podrían favorecer una transición de sistemas de determinación sexual (Blaster et al., 2013).

Los patrones en la rápida transición en los cromosomas sexuales de las ranas (Jeffries et al., 2018), las cuales tienen regiones no recombinantes que abarcan casi en su totalidad el cromosoma Y/W incluso en cromosomas jóvenes (el más joven de 3.6 millones de años en las 28 especies que usaron como modelos de estudio), podría deberse a un caso de carga de mutaciones deletéreas.

2.3.7.3 Selección en la proporción de sexos

En la mayoría de las especies, los individuos del sexo heterogamético producen el mismo número de gametos X/Z y Y/W. Por lo tanto, las proporciones de la descendencia tienden a ser 50% machos y 50% hembras. Sin embargo, en algunas especies esto no ocurre. Una fracción de los individuos produce de manera excesiva sólo uno de los sexos (Jaenike, 2001), sin tomar en cuenta los mecanismos como partenogénesis, muerte de la descendencia masculina o feminización de machos posterior a la determinación del sexo.

Estos sesgos se han reportado en moscas del género *Drosophila* y *Cyrtodiopsis* (Magni, 1953; Novitsky et al., 1965; Cavalcanti et al., 1958; Carson, 1956; Williamson y Poulson, 1979; Policansky y Ellison, 1970, Cobbs et al., 1991; Vaz et al., 1998; Montchamp-Moreau y Joly, 1997; Cazemajor et al., 2000; Montenegro et al., 2000; Wilkinson y Sanchez, 2001), en las cuales elementos “egoístas” asociados a cromosomas autosómicos generan letalidad en machos y por lo tanto, las poblaciones naturales tienden a tener un desbalance en las proporciones del sexo que favorece la sobre producción de hembras. Por

ejemplo, en *D. willistoni* se ha reportado que una especie de *Spiroplasma* es la responsable directa de esta sobre producción de hembras (Hackett et al., 1986).

En ratones, la presencia de un elemento egoísta (*selfish element*) denominado complejo-t, contenido en el cromosoma 17 con frecuencias entre 6-25% en poblaciones naturales (Ardlie y Silver, 1998; Dod et al., 2003), distorsiona la proporción de machos y hembras. Este elemento es letal o en algunos casos donde no lo es, genera esterilidad en machos cuando está en homocigosis, mientras que los heterocigotos pueden presentar problemas en el desarrollo de los flagelos en línea germinal. Además, los espermatozoides sanos tienen la posibilidad de pasar el alelo al 50% de su descendencia (Lyon, 1991, 2003; Carroll et al., 2004). Diversos reportes en aves han demostrado un desbalance en las proporciones de sexos (Krackow, 1995; Badyaev et al., 2005; Alonzo-Alvares, 2006; Rutkowska y Badyaev, 2007), y han tratado de explicar cómo factores como los estrógenos en las hembras afectan a la línea germinal o como efectos epigenéticos (Rutkowska y Badyaev, 2007) modifican las proporciones en los sexos de aves.

Wolbachia, que es una bacteria endosimbiótica que se encuentra en isópodos e insectos y que es capaz de manipular el citoplasma del huésped (trasmitida de forma vertical de la madre a las crías), convirtiendo a los machos genéticos en hembras fenotípicas (Cordaux et al., 2011; Badawi et al., 2018; Becking et al., 2016; Chebbi et al., 2019; miura, 2007; Leclercq et al., 2016).

La selección en proporción de sexos promueve la invasión de un nuevo locus capaz de determinar el sexo en las poblaciones con la finalidad de restaurar el balance entre machos y hembras, este desbalance en la proporción de los sexos es llevado a cabo por medio de distorsionadores como son impulsores meióticos (*meiotic drivers*), los cuales están compuestos por elementos egoístas o elementos de conflicto genético con interacciones núcleo-citoplasma, ambos tipos de elementos se pueden encontrar en cromosomas autosomales o sexuales (Beukeboom y Perrin, 2014; Mank et al., 2014; Helleu et al., 2015).

Se ha sugerido a partir de análisis usando modelos que los distorsionadores de la proporción en las poblaciones, pueden crear presión de

selección. Cuando los distorsionadores llevan al aumento en la proporción de hembras. De esta manera, un nuevo gen masculinizante puede surgir e invadir las poblaciones para llevar al establecimiento de un nuevo sistema de cromosomas sexuales XY. Si los distorsionadores llevan hacia el aumento en la proporción de hembras, un gen nuevo con características feminizantes llevará al establecimiento de un nuevo sistema ZW (Kozielska, 2010). En muchos casos, el distorsionador inducirá a una transición de sistema de determinación sexual que llevará a la pérdida de los distorsionadores de las poblaciones naturales (Kozielska, 2010).

Se ha demostrado incluso que en casos de transición de determinación sexual impulsados por deriva génica, en donde hay una aparente ausencia en la diferencia de adecuación entre un nuevo sistema de determinación sexual y el ancestral, no son completamente neutrales, ya que son ligeramente favorecidos (mutaciones dominantes) o desfavorecidos (mutaciones recesivas) por la selección en proporción de sexos (principalmente en transiciones transheterogaméticas, es decir, pasan de un tipo de determinación sexual XY a ZW o viceversa) (Kozielska et al., 2010; Veller et al., 2017).

Es probable que la selección de la proporción de sexos sea un motor común en los eventos de transición de cromosomas sexuales (Scott et al., 2018). Sin embargo, es difícil detectar este proceso debido a su naturaleza transitoria. Cada vez que se fija una nueva región que determina el sexo, se restauran las proporciones de sexos equilibradas y el locus original que determinaba el sexo se pierde al ser reemplazado por uno nuevo (Kozielska et al., 2010). Algunos modelos han sido propuestos para determinar escenarios en los que se podrían esperar que la selección en la proporción de sexos podría impulsar la transición de sistemas de determinación sexual (ver Kozielska et al., 2010; Úbeda et al., 2015).

2.3.7.4 Transiciones provocadas por selección sexual antagonista

El término “selección sexual antagonista”, hace referencia a aquellos alelos que son ventajosos para un sexo, pero son deletéreos para el sexo opuesto y son conocidos como alelos antagonistas (van Doorn et al., 2010).

Un caso sería una mutación que cambie un cromosoma X (recesivo a Y) a un cromosoma W (dominante y feminizante sobre el Y). Este nuevo alelo se podría correlacionar con alelos antagonistas que mejoraran las características feminizantes y bajo algunas condiciones, este nuevo tipo de cromosomas sexuales pueden establecerse por medio de selección, dando lugar a un recambio entre un sistema XY a un nuevo ZW.

Otro caso podría ser la transposición de un gen regulador maestro a un autosoma. Si la asociación de este nuevo gen con el autosoma produce una mayor adecuación en los machos que portan este nuevo neo-cromosoma Y comparado con el cromosoma Y original, este puede extenderse y fijarse dentro de las poblaciones secuestrando la determinación del sexo de los cromosomas sexuales originales (van Doorn y Kirkpatrick, 2007).

Se ha estimado que especies como *D. melanogaster* presentan hasta un 8% de genes bajo selección sexual antagonista en condiciones de laboratorio (Innocenti y Morrow, 2010). Hay algunos estudios empíricos que apoyan a esta teoría, como es el caso de los cíclidos donde las hembras poseen una coloración que las hace mimetizarse con su entorno y pasar desapercibidas a los depredadores, mientras que los machos tienen colores llamativos y son depredados con mayor facilidad (Roberts et al., 2009).

2.4 Teoría neutral, casi neutral y deriva génica

La teoría neutral propuesta por Kimura (1968) menciona que sólo una minoría de las mutaciones son beneficiosas o no beneficiosas y la mayoría son neutras. Las primeras son fijadas dentro de las poblaciones, mientras que las segundas

son eliminadas ambas por efecto de la selección natural. Las mutaciones neutras se pierden o pueden ser fijadas aleatoriamente por deriva génica.

Kimura (1991) realizó algunas observaciones importantes que apoyan su teoría de la evolución neutral y que actualmente siguen siendo apoyadas por diversos trabajos genómicos (Makalowski et al., 1998; Zheng et al., 2007):

- En las secuencias de proteínas, los cambios conservadores (sustituciones de aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares y por lo tanto pueden afectar en menor medida al funcionamiento de la proteína) ocurren con mayor frecuencia que los cambios radicales.
- Las sustituciones de bases sinónimas (aquellas que cambian la secuencia del DNA, pero no causan cambios en la transcripción de aminoácidos) ocurren con mayor frecuencia que las sustituciones no sinónimas.
- Las secuencias no codificantes, como los intrones, evolucionan a una velocidad similar al de los sitios sinónimos.
- Los pseudogenes evolucionan a un ritmo elevado similar la de las posiciones de los tres codones.

El trabajo de Kimura (1968) proporciona el marco teórico para el desarrollo de métodos que detectan la acción de la selección dentro de los genomas (Durent, 2008). Para poder demostrar que una secuencia está sujeta a presión selectiva se debe rechazar la hipótesis nula de que esta secuencia evoluciona de forma neutra. Por ejemplo, una predicción fuerte de la teoría neutral es que en sitios selectivamente neutros, la tasa de sustitución debe ser igual a la tasa de mutación (Kimura, 1968). En cambio, la teoría casi neutral, como veremos abajo, predice que las poblaciones pequeñas deberían acumular una mayor carga genética por mutaciones deletéreas que las poblaciones grandes (Ohta, 1987; Lynch, 2007; Akashi et al., 2012).

El conocimiento de la evolución de las secuencias neutrales es importante, porque proporciona información sobre los procesos moleculares que están implicados en el funcionamiento del genoma (Duret, 2018).

La evolución neutral puede contribuir en última instancia a la evolución fenotípica y a la adaptación de las especies. Kimura (1991) señaló que muchas duplicaciones genéticas se pueden fijar por deriva genética aleatoria, siempre y

cuando haya una relajación en la presión de selección (sin este efecto serían contra-seleccionadas). En un inicio, estas duplicaciones son redundantes, pero con la aparición de mutaciones en una o ambas copias, es posible que alguna resulte útil para la adaptación de los organismos a su medio ambiente. Pero, si uno de estos duplicados pierde la función que contribuye a la adecuación de los organismos, esta será liberada de la selección purificadora que las mantiene posterior a su fijación. Una reducción del tamaño efectivo de la población que aumenta el efecto de la deriva génica puede permitir la fijación de mutaciones débilmente deletéreas para pasar a través del genotipo menos óptimo y, por lo tanto, puede abrir nuevas trayectorias evolutivas hacia genotipos con mayores ventajas adaptativas (Duret, 2008).

Como mencionamos arriba, la teoría casi neutral de Ohta (1973) predice que las poblaciones pequeñas deberían acumular mutaciones deletéreas a un ritmo más rápido que las poblaciones grandes por efecto de la deriva génica. Así, aunque las sustituciones no sinónimas tienen a ser menos frecuentes que las mutaciones sinónimas, estas últimas no siempre tienen efectos completamente neutrales, ya que puede ser ligeramente deletéreas o casi neutrales. Se espera que el N_e no solo influya en los aspectos neutrales de la diversidad genética, sino también en los procesos menos neutrales (Gillespie, 1993).

2.5. Breve resumen del conocimiento actual de la evolución de los genomas en vertebrados.

2.5.1 Peces (Cyclostomata, Chondrichthyes y Osteichthyes)

Cyclostomata (Peces sin mandíbula)

Surgieron hace aproximadamente 540 millones de años. Cuatro genomas de lampreas (Smith et al., 2013, 2018) y uno de peces bruja (Myxiniidae) (Yamaguchi et al., 2020), han sido secuenciados y ensamblados. La longitud total del genoma de los peces bruja tiene un estimado de 2.4 a 4.5 Gb, mientras que las lampreas

tienen una longitud de 1.4 a 2.4 Gb. En ambas especies el ensamble ha sido a nivel *scaffold* por lo que no se cuenta con el tamaño y número cromosomal de éstas.

Ambas familias son ovíparas, pero su sistema de determinación sexual se desconoce a la fecha, aunque se sabe que algunas especies presentan hermafroditismo. Algunos autores proponen la posibilidad de la presencia de cromosomas sexuales como determinantes del sexo (Docker et al., 2019). Se sabe que algunas lampreas y peces bruja eliminan cientos de genes durante el desarrollo temprano en células somáticas, pero se desconoce si esta eliminación del genoma juega un papel en la determinación del sexo (Smith et al., 2021).

Chondrichthyes (peces cartilagosos)

Aparecieron hace aproximadamente 450 millones de años. Algunos de sus genomas han sido secuenciados y caracterizados: seis de tiburones (Hara et al., 2018), dos rayas (King et al., 2011) y dos quimeras (Venkatesh et al., 2014). La longitud de sus genomas va de los 2.6 a los 16.6 Gb.

El sistema de determinación sexual en los condricios parece ser XY en tiburones y rayas (Maddock y Schwartz, 1996; Donahue, 1974), aunque parece ser que en la raya *Hypanus americana* hay presencia de cromosomas ZW (Maddock y Schwartz, 1996).

Osteichthyes (peces óseos)

Son más de 31 mil especies, y tiene longitudes de genomas que van de 0.4 a los 7.7 Gb. Los sistemas de determinación sexual en peces óseos son muy variados. Podemos encontrar especies con GSD: con cromosomas sexuales homomórficos o heteromórficos ZZ (Takehana et al., 2018) o XY (Tanaka et al., 2007), e incluso especies que presentan múltiples cromosomas sexuales (Sember et al., 2021), o sistema de determinación ambiental (ESD) con sistema de determinación por temperatura o por un sistema social (Fricke y Fricke, 1977; Mugurran, 2005). También, podemos encontrar especies con GSD coexistiendo

con TSD (Craig et al., 1996; Baroiller et al., 1995; Patiño et al., 1996; Schultz et al., 1993; Uchida et al., 2004; Hattori et al., 2007; Yamamoto et al., 2014).

Los genes reguladores maestros del sexo en peces óseos son variados y se derivaron de factores de transcripción como *Dmrt1* y *Sox3*, miembros de vías de señalización *Tgf-beta* como *Amh*, *Amhr2*, *Gsdf* y *Gdf6* o del gen *Irf9* relacionado al sistema inmune y cuya cascada de determinación sexual se desconoce (caso exclusivo de los salmónidos) (Yano et al., 2012). Se han reportado especies con cromosomas sexuales jóvenes altamente degenerados, con regiones PAR de tan solo 300kb de longitud (Rafati et al., 2020) y transiciones de determinación sexual (Ross et al., 2009).

2.5.2 Anfibios

Los anfibios se componen de tres grandes clados: Gymnophiona, Anura y Urodela. Hace aproximadamente 335 millones de años el linaje Gymnophiona (cecilias) divergió del ancestro en común entre el clado Anura (ranas y sapos) y el clado Urodela (Caudata: tritones y salamandras) (Betancur et al., 2013), los cuales a su vez divergieron uno del otro (Anura y Urodela) 35 millones de años más tarde (Pyron, 2011). La mayoría (88%) de los anuros (*Hyloidea*, *Microhylidae* y *Natutanura*) se diversificaron entre 66 a 44 millones de años (Feng et al., 2017).

Se conoce un total de 8, 260 especies de anfibios, mismos que superan a los mamíferos (con un total de 6,485 especies). Hasta la fecha solo hay un total de 19 genomas de anfibios ensamblados de diferentes calidades, éstos incluyen 15 de las 7291 especies de Anura, uno de las 760 de Urodela y tres de las 213 de Gymnophiona (Stöck, 2021). Algunos de éstos se han ensamblado a nivel cromosoma, pero la mayoría se mantiene solo con un ensamblado a nivel *scaffold*. El lento progreso genómico en los anfibios se debe principalmente a el enorme tamaño de sus genomas, el cual va de 3.9 a 9.8 Gb en los Gymnophiona, de 1.9 a 13.1 Gb en los Anura y los inmensos 16.6 a 78.2 Gb en los Urodela; todo incluyen largas proporciones de secuencias repetidas (Liedtke et al., 2018).

Todos los anfibios tienen GSD, ya sea un sistema por cromosomas sexuales XY o ZW o alguna variante (Hillis y Green, 1990; Nakamura, 2010; Ito,

2018), aunque el 96% presentan cromosomas sexuales indiferenciados, lo cual sugiere una alta transición de sistemas de determinación sexual (Schartl, 2004; Stöck et al., 2011; Miura, 2017). Adicionalmente, se han reportado casos con especies con hembras W0 y machos 00 como sistema de determinación sexual (Green, 1988) y algunos casos tienen cromosomas múltiples (Roco et al., 2015).

2.5.3 Reptiles (Lepidosauria, Squamata y Testudines)

Lepidosauria

Los dos únicos representantes no extintos de los lepidosaurios son los tuátaras que divergieron hace aproximadamente 250 millones de años de su taxon hermano, los Squamata (Zheng y Wiens, 2016). Los tuátaras son especies endémicas de Nueva Zelanda. Recientes estudios de trabajos genómicos reportaron la lista de genes que participan en la diferenciación sexual, así como el ensamblado de su genoma (5 Gb de longitud, solo ensamblado a nivel de *scaffolds*) (Gemmell et al., 2020). Los tuátaras presentan TSD como única forma de determinación del sexo: los machos se producen arriba de los 22 °C y las hembras por debajo de esta temperatura (Cree et al., 1995).

Squamata (serpientes y lagartos)

Hay más de 11 mil especies dentro de Squamata (Uetz,2020), que divergieron hace aproximadamente 250 millones de años de Lepidosauria (Zheng y Wiens, 2016), y hace 227 millones de años de los arcosaurios y tortugas (Gemmell et al., 2020). Se han ensamblado más de 35 genomas de diferentes especies de Squamata, sus tamaños varían entre los 1.3 y 3.7 Gb (Organ et al., 2008). La mayoría de estos genomas están ensamblados solo a nivel de *scaffolds*, pero tres especies están a nivel cromosoma: *Podarcis muralis* (lagartija común de las paredes), *A. carolinensis* (anolis verde) y *Naja naja* (cobra rey).

El genoma de *A. carolinensis* es de 1.79 Gb, con un total de 18 pares de cromosomas, de los cuales 12 pares son microcromosomas (Alföldi et al., 2011). El cromosoma X tiene una longitud de 3 Mb, y 63 genes, de los cuales 61 son

codificantes. Aun cuando los análisis de transcriptoma han permitido la identificación de los genes relacionados al cromosoma Y (7 totales), este no ha sido identificado y ensamblado a la fecha (Alföldi et al., 2011; Marin y Cortez et al., 2017; Howe et al., 2021).

El genoma de *P. muralis* es de 1.5 Gb con un total de 19 pares de cromosomas. El par de cromosomas sexuales parece ser homomórfico y el cromosoma Z tiene un tamaño de 50 Mb con 667 genes codificantes, mientras que el cromosoma W no ha podido ser reconstruido, aunque estudios sugieren que tienen casi el mismo tamaño de su contraparte el cromosoma Z y está altamente diferenciado (Andrade et al., 2019; Howe et al., 2021).

El genoma de *N. naja* tiene una longitud de 1.7 Gb, con un total de 19 pares cromosomales, de los cuales 8 son macrocromosomas y 11 microcromosomas. El cromosoma Z pertenece a un macrocromosomas con un tamaño de 150 Mb, 1643 genes codificantes, 59 genes no codificantes y 16 pseudogenes anotados a la fecha. Análisis de transcriptoma identificaron un total de 284 genes en el cromosoma W; sin embargo, este cromosoma no ha sido reconstruido en su totalidad. Análisis de cariotipos indican que sus cromosomas sexuales son heteromórficos (Suryamohan et al., 2020; Howe et al., 2021).

La mayor parte de las especies estudiadas dentro de cinco de los clados de Squamata (iguana, lacértidos, varanidos, escíncidos y serpientes xenofidias), los cuales abarcan un aproximado del 60% de las especies en los Squamata, presentan cromosomas sexuales conservados (Kostmann et al., 2021, Rovatsos et al., 2014a, 2014b, 2014c, Augstenová et al., 2018), mientras que otros linajes como los acrodontes (agamidos y camaleones), boas, pitones y geckos exhiben mayor variabilidad en los sistemas de determinación sexual (Pokorná y Kratochvíl, 2019, Gamble et al., 2015, 2017; Nielsen et al., 2018).

Entre las diferentes especies de reptiles secuenciadas, se ha observado mediante análisis genómicos y FISH una alta sintenia entre ellos que se ha conservado a través del tiempo con los arcosaurios (cocodrilos y aves) (Schield et al., 2019). Estudios comparativos realizados en *N. naja* y *Crotalus viridis* (la cascabel de la pradera), también revelaron una alta sintenia en bloques entre macrocromosomas, microcromosomas y el cromosoma Z. Pese que

filogenéticamente las serpientes (*N. naja* y *C. viridis*) y los anolis verdes (*A. carolinensis*) están distanciados, también se observó sintenia entre los cromosomas autosomales 4, 5 y 6 de la cobra con el cromosoma 2 de anolis. Adicionalmente, el cromosoma 6 de anolis es homólogo al cromosoma Z de la cobra. Mientras que, por parte de la víbora de cascabel, de los 18 pares de cromosomas, 16 pares mostraron sintenia con anolis, la excepción fue el cromosomas 3 cuyo contenido genético corresponde al cromosomas 4 y 5 de las cascabel, el cromosoma 6 de anolis es homólogo al cromosomas Z en las cascabel (Schild et al., 2019).

Comparando con especies cuyo tiempo de divergencia es aún más lejano como el caso de las gallinas (*G. gallus*), se observó sintenia ente varios micro y macrocromosomas; el cromosoma 1 y 2 de *G. gallus* mostró alta sintenia en bloques correspondientes al cromosoma Z y algunos micro y macrocromosomas (Suryamohan et al., 2020).

Testudines (tortugas)

Con un total de 361 especies (Uetz, 2020), la divergencia entre las tortugas y los arcosaurios (con quienes están cercanamente emparentados) fue hace aproximadamente 320-250 millones de años. Los tamaños de genoma varían entre 2 y 2.9 Gb. Todas son ovíparas y hay especies con cromosomas sexuales (XY o ZW), así como TSD. Veintidós especies pertenecientes al clado Cryptodira han sido secuenciadas y cuatro de Pleurodira. Los genomas de dolo dos de las especies pertenecientes a los Cryptodira han sido ensamblados a nivel cromosoma. En *Gopherus evgoodei*, con una longitud de 2.2 Gb, el genoma cuenta con 24 pares cromosomales, algunos de estos microcromosomas y tiene TSD (Lee et al., 2020; Howe et al., 2021). *Chrysemys picta bellii* quien también tiene un TSD (Lee et al., 2020) con un total de 25 pares de cromosomas, de los cuales más de la mitad son microcromosomas. La longitud total de este genoma es de 2.3 Gb (Howe et al., 2021).

2.5.4 Arcosaurios (crocodilia y aves)

Crocodilia

Los cocodrilos, con un total de 24 especies (Uetz, 2020), divergieron de las aves hace 240 millones de años (Green et al., 2014). En total cuatro especies han sido secuenciadas (*Alligator mississippiensis*, *Alligator sinensis*, *Crocodylus porosus* y *Gavialis gangeticus*), con genomas que varían entre las 2.3 a 2.9 Gb de longitud (Green et al., 2014; Wan, 2013), ninguno de estos ha sido ensamblado a nivel cromosoma. Todos son ovíparos y tienen un TSD.

Aves

Las aves contienen más de 10 mil especies (AVIBASE, 2020). El último ancestro en común que compartieron con los cocodrilos fue hace 240 millones de años (Green et al., 2014), con el cual conservan alta sintenia (Zhang et al., 2018; O'Connor et al., 2018). Tienen genomas compactos que varían entre 0.9 Gb y 2.1 Gb. Se han publicado cerca de 502 ensambles de genomas de aves (Feng, 2020) y al menos 14 han sido ensambladas a nivel cromosómico, mientras que el resto se encuentran en *contigs* y *scaffolds*. Todas poseen cromosomas sexuales ZW muy preservados, con una longitud de entre 70 a 80 Mb (Stiglec et al., 2017).

Pese a que no se ha encontrado un candidato específico feminizante del cromosoma W, el cual es exclusivo de hembras, se sabe que en el cromosoma Z el gen maestro *Dmrt1* es importante para el desarrollo de testículos (Smith et al., 2009; Zhang, 2018). La mayoría de las aves tiene un aproximado de 40 pares de cromosomas: 10 pares de macrocromosomas (entre ellos los cromosomas sexuales ZW) y cerca de 30 pares de microcromosomas (Takagi y Sasaki, 1974; Burt, 2002). Algunas excepciones muy notables son el género *Numenius*, con un total de 20 pares de cromosomas, y el martín pescador con un total de 66 pares de cromosomas (Christidis, 1990).

El genoma de las aves es bajo en secuencias repetidas, que representan entre el 15 al 20% del genoma total, comparado con humanos y reptiles que

presentan hasta el 50% de secuencias repetidas o con el de los anfibios cuyo 50 al 90% del genoma total corresponde a secuencias repetidas (Holmquist, 1989; Burt, 2002).

2.5.4.1 Aves y sintenia con los reptiles

Se ha observado un alto grado de sintenia entre aves y reptiles debido a un grado relativamente bajo de reordenamientos cromosomales en estos últimos (Ezaz et al., 2009,2017; Matsubara et al., 2006, Kawai et al., 2009; Alföldi et al., 2011; Srikulnath et al., 2009, 2013, 2014; O'Connor et al., 2018; Ibney et al., 2020). Adicionalmente, se ha documentado que los cromosomas sexuales de vertebrados mantienen sintenia con cromosomas autosomales de *G. gallus* (Straková et al., 2020) (Figura 11). Un estudio de hibridación entre especies (zoo-FISH) de dos tortugas (*Apalone spinifera* y *Trachemys scripta*) y el anolis verde (*A. carolinensis*), demostró que varios cromosomas están bien conservados entre aves y reptiles, por ejemplo, 8 microcromosomas de *G. gallus* (microcromosomas 10,11,15,17,19,21,23 y 24) están conservados en 1 solo microcromosoma de los tres reptiles (O'connor et al., 2018).

Pese que *A. carolinensis* y *G. gallus* divergieron hace 280 millones de años, se ha observado un alto grado de sintenia. Los 6 macrocromosomas, así como 6 de los 12 microcromosomas de *A. carolinensis* mantienen sintenia con los cromosomas 7, 8, 9, X y LGh de *G. gallus*. Adicionalmente, 19 microcromosomas de *G. gallus* tiene sintenia con un cromosoma de *A. carolinensis*. Los microcromosomas de *A. carolinensis* no tienen un alto contenido de CG y secuencias repetidas en comparación con *G. gallus*, con quien tiene un alto grado de sintenia (Hillier et al., 2004).

También, se ha podido observar por estudios realizados en 2015, que los cromosomas Z del dragón barbudo (*P. vitticeps*) es homólogo a los cromosomas 17 y 23 de *G. gallus* (Georges et al., 2015).

Estudios realizados en 2011 por Pokorná y colaboradores demostraron una alta conservación de la región correspondiente al cromosoma Z de *G. gallus* contra 17 familias de Squamata, cocodrilos y tortugas. Los cromosomas 3, 5 y 7, también mostraron una alta homología entre al menos 10 familias de Squamata (Pokorná et al., 2011).

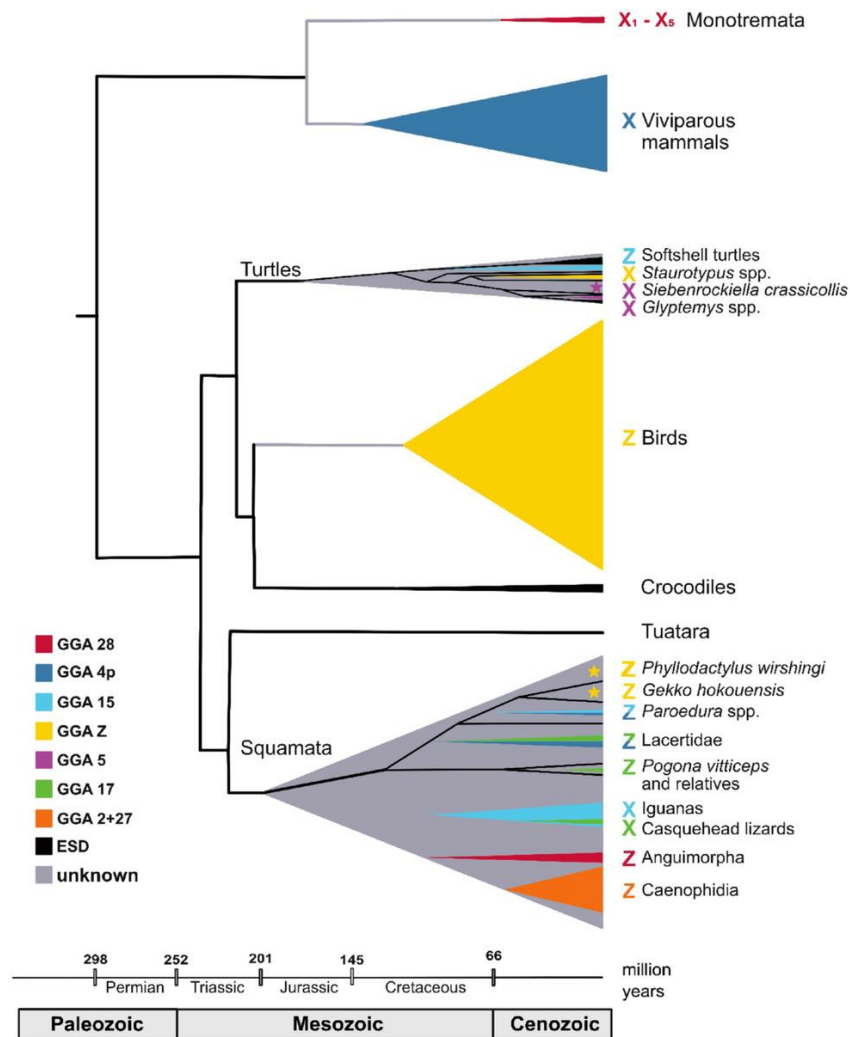


Figura 11. Descripción del conocimiento actual sobre la homología de los cromosomas sexuales de amniotas y la historia evolutiva sugerida de sus cromosomas sexuales. Cada color representa la sintenia con los cromosomas los diferentes cromosomas autosomales de *G. gallus* (GGA) tal cual indica el índice de colores a la izquierda, los colores compartidos indican la sintenia en bloques de los sistemas de determinación sexual en más de un cromosoma de *G. gallus*, posiblemente debido a rearrreglos cromosomales propios de cada especie. La longitud de los triángulos muestra la edad mínima estimada de los cromosomas sexuales. Las letras indican el tipo de determinación sexual para cada especie/familia, en donde X corresponde a sistemas XY, Z a sistemas ZW. Los asteriscos indican origen independiente de cromosomas sexuales. El color negro representa sistemas ESD, mientras

el color gris indica sistemas GSD no caracterizados y por ende se desconoce si los machos o las hembras son las determinantes del sexo. Figura tomada de Straková et al. (2020).

2.5.5 Mamíferos (Monotremas, metatheria y eutheria)

Monotremas

Son cinco especies, que divergieron hace 200 millones de años de los mamíferos terios (marsupiales y mamíferos placentarios) (Cortez et al., 2014). Las dos familias representantes *Ornithorhynchidae* (ornitorrincos: con una sola especie) y *Tachyglossidae* (equidnas: con con especies) divergieron entre si hace 50 millones de años. Los genomas de ambas familias rondan entre 2.7 a 2.8 Gb (Gregory, 2015). Los monotremas poseen cromosomas sexuales XY, sin embargo, no son iguales que en el resto de los mamíferos. Los *Ornithorhynchidae* tienen un total de 10 pares de cromosomas sexuales (en machos X5 Y5), mientras que los *Tachyglossidae* tienen un total de 9 pares (en machos X5 Y4) (Rens et al., 2007; Grützner et al., 2004). El gen *Sry* no se encuentra dentro de su genoma, pero el gen *Dmrt1* de aves se encuentra en dos copias en hembras en los cromosomas X, mientras que en machos está una copia, lo cual es opuesto a las aves (El-Morharbel et al., 2007).

Metatheria (Marsupiales)

Los marsupiales divergieron hace aproximadamente 180 millones de años de los mamíferos placentarios (*Eutheria*) (Cortez et al., 2004) y contienen un total de 385 especies existentes (Burgin et al., 20018). La longitud de sus genomas es de un aproximado de 3.9 Gb (Redia y Capanna, 2012). Tiene un par de cromosomas sexuales heteromórficos XY y comparten el gen regulador maestro *Sry* con los mamíferos placentarios.

***Eutheria* (mamíferos placentarios)**

Con un total de 6,992 especies (Burgin et al., 2018), sus tamaños de genoma varían entre 2.7 a 7.7 Gb (Evans et al., 2017; Redia y Capanna, 2012). Se ha ensamblado el genoma de 411 especies (NCBI, 2020). Todos tienen el mismo sistema XY con cromosomas altamente diferenciados (Bachtrog, 2013). Este sistema apareció hace aproximadamente 180 millones de años en el ancestro en común de los placentarios y marsupiales (Cortez et al., 2014).

La diferenciación de los cromosomas sexuales en mamíferos placentarios ha provocado una alta degeneración del cromosoma Y, el cual tiene un bajo contenido génico. En humanos el cromosoma X tiene una longitud de 156 Mb con 857 genes funcionales, 663 genes no codificantes y 888 pseudogenes (Howe et al., 2021). El pequeño cromosoma Y tiene una longitud casi tres veces menor, con 57 Mb, de los cuales casi dos terceras partes (41 Mb) corresponden a regiones altamente repetidas, con un total de 566 genes (lo cual lo hace el cromosoma con el menor número de genes en el ser humano), de éstos 64 son genes codificantes, 107 son no codificantes, 395 son pseudogenes (Howe et al., 2021). Varias de los genes codificantes pertenecen a las mismas familias lo cual nos deja sólo con un total de 27 genes codificantes distintos (Skaletsky, 2013; Marin et al., 2014; Hawley, 2003). Es decir, el cromosoma Y ha perdido un 97% de su material genético original.

En el caso de los mamíferos, el gen *Sry* dejó de recombinar con su gametólogo, el gen *SOX3* (Figura 9), presente en el cromosoma X y que representa la versión ancestral de *Sry* (Marshall Graves, 2008). *SOX3* está asociado a la diferenciación sexual en anfibios y reptiles; comienza a expresarse en etapas tempranas del desarrollo participando en la formación del ovario en *Xenopus*, en aves participa en el proceso de gonadogénesis tanto en machos como hembras (Koyano et al., 1997), y en peces es primordial para la diferenciación de la línea germinal (Yao, et al., 2007). En mamíferos, sólo está reportada la expresión de *SOX3* en el cerebro y en la embriogénesis, así como su expresión en el mantenimiento del sistema nervioso central (Collignon et al., 1996). La ausencia de este gen provoca retraso mental, déficit en la hormona del crecimiento y fallo en la espermatogénesis, pero esto último no está asociado a una reversión del sexo (Raverot et al., 2005). *SOX3* se expresa en las gónadas

indiferenciadas, al menos en humanos y ratones (Raverot et al., 2005; Jiang et al., 2012). Por lo tanto, es posible que tanto *SOX3* y *SOX9*, que también se expresa en la gónada indiferenciada, tengan que ver con la determinación del sexo en mamíferos (Bachtrog et al., 2008).

Por su parte, la expresión de *Sry* de forma temprana en el desarrollo embrionario, inicia la diferenciación de los testículos al activarse la cascada de diferenciación específica de machos, activándose *Sox9*, *Amh* y *Dmrt1*, principalmente. Cuando *Sry* está ausente, se continúa con el desarrollo de ovarios (sexo por default; Bachtrog et al., 2014).

3. HIPÓTESIS

I. Las transiciones entre los sistemas GSD en reptiles están asociadas con la fragilidad del cromosoma Y en aquellos sistemas que presentan una alta degeneración en sus cromosomas sexuales.

II. Se espera que las todas las especies ectotérmicas vivíparas tengan un sistema GSD o pasen por transiciones hacia éste cuando hay una invasión a climas fríos para evitar sesgos en la proporción de sexos.

III. Los cromosomas autosómicos que antes eran cromosomas sexuales y presentaron el sesgo de mutación masculina tienen tasas de mutación sinónimas diferentes a los cromosomas autosómicos que nunca fueron cromosomas sexuales, estas diferencias entre ambas tasas podrían ser utilizadas en modelos evolutivos que permitan estimar el momento en que surgieron y se perdieron cromosomas sexuales.

4. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que las transiciones en cromosomas sexuales heteromórficos altamente degenerados son una estrategia evolutiva recurrente en reptiles.????

4.1 Objetivos específicos

- Caracterización e identificación del sistema de determinación sexual en *Corytophanidae* mediante secuenciación de transcriptoma y genoma de *B. vitattus* y PCRs genómicas de muestras de tejido de *C. hernandesii*.
- Validar experimentalmente los genes ligados a los cromosomas sexuales Y.
- Analizar las características de los cromosomas sexuales en *B. vitattus*, para entender su evolución.
- Determinar si las especies del género *Eulamprus*, únicas lagartijas vivíparas con posible TSD, presentan cromosomas sexuales crípticos.
- Establecer un modelo que permita el uso de las tasas de sustitución sinónimas entre cromosomas ortólogos y el sesgo de mutación masculina para identificar transiciones de determinación sexual.

5. CAPÍTULO 1: ENSAMBLE DEL TRANSCRIPTOMA Y GENOMA DE *B. VITTATUS*, CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE DETERMINACIÓN SEXUAL

Artículo de investigación: Corytophanids Replaced the Pleurodont XY System with a New Pair of XY Chromosomes. Armando Acosta, Gabriel Suarez-Varon, Luis A. Rodriguez-Miranda, Andres Lira-Noriega, Diana Aguilar-Gomez, Mariana Gutierrez-Mariscal, Oswaldo Hernandez-Gallegos, Fausto Mendez-de-la-Cruz, and Diego Cortez. ***Genome Biology and Evolution***, Volume 11, Issue 9, September 2019, Pages 2666–2677, <https://doi.org/10.1093/gbe/evz196>.

Resumen:

El trabajo realizado por Marin y Cortez et al. (2017) encontró que dos especies, *A. carolinensis* y la iguana de Fiji (*Braquilophus vitensis*), pertenecientes al infraorden Iguania tenían un cromosoma Y altamente degenerado, con escasos 7 genes. Asimismo, estudios realizados por Rovatsos et al. (2014a) propusieron la posible pérdida del sistema XY ancestral en la familia *Corytophanidae*, ya que se observó que 6 genes ligados al cromosoma X estaban en doble copia en machos y hembras, a diferencia de las otras especies donde aparecían en una sola copia en machos y dos copias en hembras. Con estas dos premisas, decidimos trabajar con el genoma y el transcriptoma de *B. vittatus* (un representante mexicano de los coritofanes). Nuestra hipótesis de trabajo fue que los coritofanes perdieron los cromosomas sexuales ancestrales tipo XY (del infraorden Iguania), ya que el Y está altamente degenerado (fragilizado) y ganaron un nuevo sistema de determinación sexual que podría ser por cromosomas sexuales o por temperatura. Mediante la reconstrucción del transcriptoma, se observó la presencia de un sistema de determinación XY presente en *B. vittatus*, pero cuyos genes no pertenecían al sistema ancestral compartido por el resto de las especies del infraorden Iguania. A través de la reconstrucción del genoma pudimos observar que dicho sistema pertenece a un par de cromosomas sexuales heteromórficos que son ortólogos al cromosoma 17 de la gallina. Este nuevo sistema parece tener un sistema de compensación de dosis incompleto, además de que las funciones de los 12 gametólogos encontrados parecieran tener funciones relacionadas con la membrana y el transporte intermembranas, algo inusual en los cromosomas sexuales.

Corytophanids Replaced the Pleurodont XY System with a New Pair of XY Chromosomes

Armando Acosta¹, Gabriel Suarez-Varon ², Luis A. Rodriguez Miranda³, Andres Lira-Noriega⁴, Diana Aguilar-Gomez ¹, Mariana Gutierrez-Mariscal⁵, Oswaldo Hernandez-Gallegos², Fausto Mendez-de-la-Cruz³, and Diego Cortez^{1,*}

¹ Center for Genome Sciences, UNAM, Cuernavaca, Mexico

²Laboratorio de Herpetologia, Facultad de Ciencias, Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Toluca, Mexico

³ Biology Institute, UNAM, Mexico City, Mexico

⁴CONACYT Research Fellow, Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecologia, Xalapa, Mexico

⁵ Biotechnology Institute, UNAM, Cuernavaca, Mexico

*Corresponding author: E-mail: dcortez@ccg.unam.mx.

Accepted: September 5, 2019

Data deposition: This project has been deposited at the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) under the accession BioProject PRJNA525415. Y-linked sequences from *B. vittatus* have been deposited at the figshare platform: <https://figshare.com/s/9387c059b18c14cf42e4>. The reconstructed transcriptome of *B. vittatus* has been deposited at the figshare platform: <https://figshare.com/s/c45f79ac89e17d648619>. The reconstructed genomes of *B. vittatus* have been deposited at the figshare platform: <https://figshare.com/s/b04db76fb38021ee27ed>. Expression data used in the study is listed in the Supplementary table 2, Supplementary Material online.

5.1 Abstract

Almost all lizard families in the pleurodont clade share the same XY system. This system was meticulously studied in *Anolis carolinensis*, where it shows a highly degenerated Y chromosome and a male-specific X chromosome dosage compensation mechanism. Corytophanids (casque-headed lizards) have been proposed as the only family in the pleurodont clade to lack the XY system. In this study, we worked with extensive genomic and transcriptomic data from *Basiliscus vittatus*, a member of the *Corytophanidae* family that inhabits the tropical rainforests of Mexico. We confirmed that *B. vittatus* underwent a sex chromosome system turnover, which consisted in the loss of the pleurodont XY system and the gain of a new pair of XY chromosomes that are orthologous to

chicken chromosome 17. We estimated the origin of the sex chromosome system to have occurred 63Ma in the ancestor of corytophanids. Moreover, we identified 12 XY gametologues with particular attributes, such as functions related to the membrane and intracellular trafficking, very low expression levels, blood specificity, and incomplete dosage compensation in males.

Key words: casque-headed lizards, *Basiliscus vittatus*, XY chromosomes, sex chromosome system turnovers, sex chromosome evolution.

5.2 Introduction

Reptile species have undergone numerous sex determination systems turnovers, with lineages shifting more frequently from environmental-dependent sex determination (ESD) to genotypic sex determination (GSD) (Pennell et al. 2018). The second most-common transition in reptiles is transitions from GSD to ESD (Pennell et al. 2018). In general, very few cases of species shifting from one sex determination system to the same sex determination system, for instance, an XY system to a new XY system, have been documented (Bachtrog et al. 2014). Reptiles are an ideal taxon to test predictions on the mechanisms of sex determination because ESD and various types of GSD are present in closely related species of the same lineage and sex determination systems can be both of recent origin (<10-Myr old) or very old (>100Myr old) (Bachtrog et al. 2014).

For example, in the infraorder Iguania, the acrodont clade exhibits a great variety of ESD and GSD systems (Bachtrog et al. 2014), whereas all but one family of lizards in the pleurodont clade share the same sex chromosome system, which comprises a pair of heteromorphic XY chromosomes (Rovatsos, Pokorna, et al. 2014; Altmanova et al. 2018) (fig. 1). These XY chromosomes originated in the ancestor of the infraorder Iguania, 160–170Ma (Marin et al. 2017) (fig. 1). This sex chromosome system has been studied with great detail in the green anole, *Anolis carolinensis* (Dactyloidae family) (Alfoldi et al. 2011; Gamble et al. 2014; Rovatsos, Altmanova, et al. 2014a, 2014b; Kichigin et al. 2016; Marin et al. 2017; Rupp et al. 2017). A previous work identified a highly degenerated Y chromosome in *A. carolinensis* that has conserved only a handful of genes (seven genes) (Marin et al. 2017). Additionally, it was also found that in order to maintain

balanced gene expression levels in both sexes and counterweight the massive loss of genetic material of the Y chromosome, the X chromosome in *A. carolinensis* evolved a male-specific mechanism that triggers the hyperacetylation of the lysine 16 on the histone 3, which in turn mediates the global upregulation of gene expression on the X chromosome (Marin et al. 2017).

In the pleurodont clade, only the species in the *Corytophanidae* family (casque-headed lizards) seem to lack the canonical XY system (Altmanova et al. 2018) (fig. 1). Two previous studies (Rovatsos, Pokorna, et al. 2014; Altmanova et al. 2018) examined four species of corytophanids (*Laemanctus longipes*, *Laemanctus serratus*, *Corytophanes hernandesii*, and *Basiliscus plumifrons*) and quantified the copy number of six genes that are X-linked in *A. carolinensis*. The researchers found that both males and females of corytophanids presented two copies of these genes. These results could indicate that the orthologous chromosome to the X chromosome in the closely related species *A. carolinensis* is an autosome in the corytophanids. However, the copy number of so few genes could also be influenced by X/Y gene conversion or translocations of genetic material between the X and Y chromosomes.

In this study, we used extensive genomic and transcriptomic data from the brown basilisk, *Basiliscus vittatus*, from a population that inhabits the tropical rainforests of Mexico, to confirm the loss of the pleurodont XY system. In addition, we identified and characterized a new XY system in corytophanids, which is based on chromosomes that are orthologous to the chicken chromosome 17. The corytophanid sex chromosomes originated in the ancestor of the family ca. 63 Ma. We also explored the functions, sex determination candidates, expression levels, and evolution of the novel sex chromosome system.

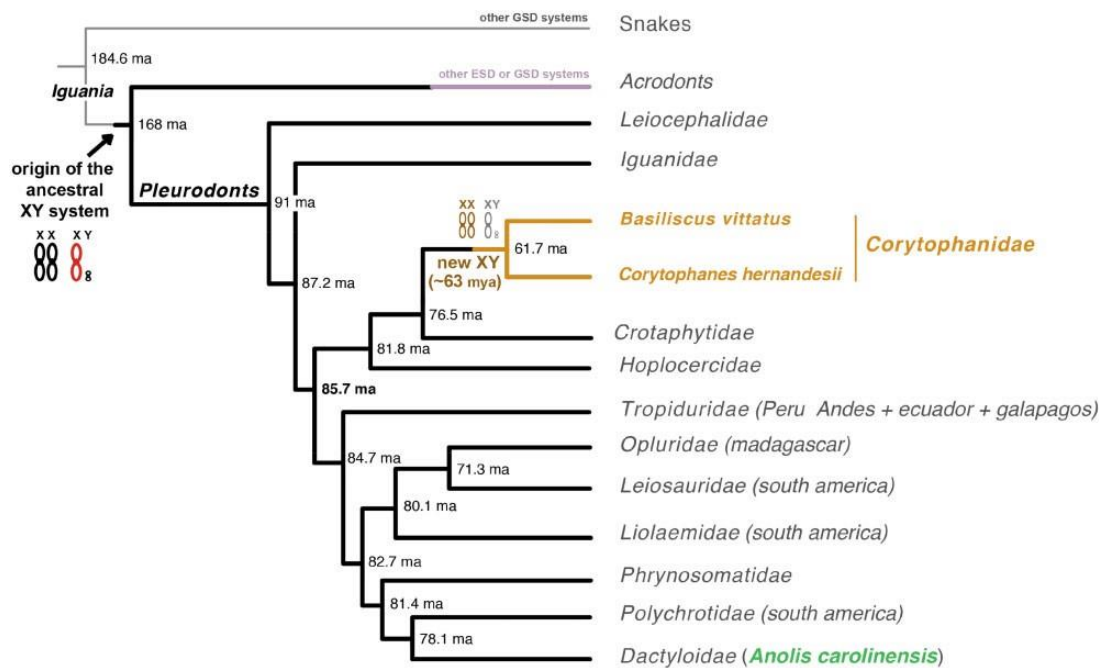


FIG. 1. Sex determination systems in the pleurodont clade. A tree representing the phylogenetic relationships between the families comprised in the pleurodont clade. The phylogenetic tree was based on Zheng and Wiens (2016). The estimate of *Basiliscus vittatus* and *Corytophanes hernandesii* divergence was taken from Taylor et al. (2017). Millions of years ago are denoted by “Ma.” Black and red XY chromosomes represent the pleurodont sex chromosome system, which originated in the ancestor of the infraorder Iguania. Most families in the pleurodont clade have conserved the same XY chromosomes; data based on Altmanova et al. (2018). This sex chromosome system has been well characterized in the green anole, *Anolis carolinensis* (highlighted in green), where it shows a highly degenerated Y chromosome and a male-specific X chromosome expression level upregulation; data based on Marin et al. (2017). The XY system in the *Corytophanidae* family originated 62.68 Ma (orange and gray XY chromosomes; results from this study). This corytophanid sex chromosome system is composed of heteromorphic sex chromosomes with a degenerated Y chromosome and an incomplete dosage compensation mechanism of the X chromosome in males.

5.3 Materials and Methods

Genome Data Generation, Assemblies, and Coverage Analyses

One adult male and one adult female individual of *B. vittatus* species were captured from a population that inhabits an open riverbed juxtapositioned to tropical rainforest habitat at the community of “La Selva del Marinero” in Veracruz, Mexico (170 m.a.s.l.; SEMARNAT Scientific Collector Permit 08-043). Sex was determined based on the size of the crests (larger in males), body size (males are bigger), and body coloration (wider yellow stripes in males). Later, sex was confirmed by the presence of ovaries or testis during the dissections. Both individuals were sacrificed using a lethal dose of pentobarbital; this study met legal regulations and institutional procedures for the investigation of the University of Mexico. Additionally, blood samples for *B. vittatus* (n= 6; three males and three females) and *C. hernandesii* (n= 6; three males and three females) individuals were obtained. We generated DNA-seq libraries for the male and female of *B. vittatus* from liver tissue using the Illumina TruSeq DNA protocol for short insert size (400–450nt). The pairedend DNA-seq libraries were sequenced on Illumina HiSeq 2500 sequencers at the Macrogen facility in Korea (100-nt paired-end reads). We sequenced both genomes at approximately 6 X of coverage based on the size of the *A. carolinensis* genome (1.7 Gb). The quality of the reads was verified using FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>; last accessed September 13, 2019) and the remaining adaptors were removed with Trimmomatic (Bolger et al. 2014). We then followed a methodology previously applied to the analysis of sex chromosomes in snakes (Vicoso et al. 2013). Specifically, the male and female raw genomic reads were assembled into scaffolds using SOAP de novo (v.2; default parameters) (Luo et al. 2012), and the resulting scaffolds were aligned against the six assembled chromosomes and the X-linked scaffolds from the *A. carolinensis* reference genome using BWA (bwa-mem) (Li et al. 2009). The selected scaffolds in the male and female *B. vittatus* genomes were required to align over 50% of their sequence length and above 80% of identity against the *A. carolinensis* genome. We ordered the *B. vittatus* scaffolds following the sequence of the chromosomes and X-linked scaffolds in *A. carolinensis*. We used bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) to

align the raw DNA-seq reads from the male and female *B. vittatus* genomes onto the reconstructed chromosomes and X-linked scaffolds of *B. vittatus*. The aligned reads were sorted using SAMtools (Li et al. 2009) and the coverages for each chromosome (including the X chromosome) for males and females were calculated using BEDtools (Quinlan and Hall 2010). To compute the final data illustrated in the figures, we averaged the coverage using windows of 100,000 nucleotides for the 6 main chromosomes and windows of 10,000 nucleotides for the X chromosome. The novel X chromosome in *B. vittatus* was reconstructed using the sequence of the chicken chromosome 17, because the corresponding scaffolds in the *A. carolinensis* reference genome surpass the 100 fragments. We repeated the same procedure but changed the thresholds for the BWA analysis given that *B. vittatus* diverged before from chicken than from *A. carolinensis*. Selected scaffolds in the *B. vittatus* genomes were required to align over 40% of their sequence length and above 70% of identity against the chicken genome. Genomic data for *A. carolinensis* were taken from Marin et al. (2017).

Transcriptome Data Generation and Assembly of Y-Linked Transcripts

We generated strand-specific RNA-seq libraries (using the Illumina TruSeq Stranded mRNA Library protocol) for a total of 14 samples obtained from blood (twice), brain, heart, liver, kidney, and gonads for both a male and a female of *B. vittatus*. Each library was sequenced on Illumina HiSeq 2500 platforms at the Macrogen facility in Korea (100 nucleotides, paired-end). In order to assemble Y-linked transcripts in *B. vittatus* we used a subtraction approach we applied previously in two studies in mammals/birds (Cortez et al. 2014) and *A. carolinensis* (Marin et al. 2017). We first assessed the quality of the reads from the 14 samples with FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>; last accessed September 13, 2019), trimmed the remaining adaptors with Trimmomatic (Bolger et al. 2014) and removed all reads with ambiguous nucleotides (N). Next, we collapsed all male RNA-seq reads from *B. vittatus* into one single file and aligned these reads onto the *de novo* reconstructed female genome from *B. vittatus* using

Hisat2 (v2.0.2)(Kim et al. 2015); reads not mapping to this genome were selected. We then used all female RNA-seq data from *B. vittatus* to build an index of 35bp k-mers; following a previous procedure (Akagi et al. 2014). We calculated the frequency of these 35bp k-mers and removed those showing frequencies below ten; we did not consider rare k-mers as part of the overall signature of the female transcriptome. We used Bowtie2 (2.1.0) (Langmead and Salzberg 2012) to align the more abundant 35bp k-mers to the male reads that did not align onto the *B. vittatus* female genome (with no mismatches and no indels allowed); we selected the male reads with no successful alignments. Finally, we assembled a male transcriptome with Trinity (v2.0.2, default k-mer of 25bp) (Grabherr et al. 2011) based on the few selected read that passed all the filters. We obtained putative male-specific transcripts, which were aligned against the raw DNA-seq reads from the male and female *B. vittatus* using BlastN(Altschul et al. 1990). We searched for transcripts having 100% identity over 90% or more of their sequence length in the male genome and no significant alignments in the female genome. Twenty-three transcripts were only found in the male genome. To further reinforce our results, we decided to amplify a subset of six Y linked genes using genomic PCRs and DNA from *B. vittatus* blood samples (n= 6; three males and three females). The primers used were: *COL1A1* (autosomal/control) forward: TTT CGT GCA GGG TGG GTT CTT T, reverse: TCT GAA CTG GTG CAG CTT CAC A. Whereas Y-linked genes were: *CAMSAP1*, forward: AGT CTC AGT CTG CAC CAG TGA AAG, reverse: TGA TTT CTG AGC CCA GGC AGT T. *GOLGA2*, forward: AGG CTG TCA GTC TCA CTC AGT AAG, reverse: CCC CAT ATT CCC AGG TTC TGT CA. *EHMT1*, forward: TCT CCC AGG GTT ACG AAC GGA T, reverse: TGT CTA CGG AAT TGA CGC AGG GAA. *RAB14*, forward: GTG CCT TTG GCT GCT TCG TTT T reverse: ATG TGC TAG GCC TGC AAT GAG T. *HSPA5*, forward: TGT TTT GGA AGG CAC GCA GCT A, reverse: TCG TCA TCG TCA GCA AAC ACA C. *ZBTB34*, forward: TCC TGC CAA ACA GTG ACC AGA T, reverse: AGC ACC TCA TGG CTG GTT GT. *NIBANY/FAM129BY*, forward: AGC CGG GTC ATC GCC TCC TG, reverse: CTC TCG TCC AGG TGC GCT GAG. *CACNA1BY*, forward: GCA CAG TTG GCA ATG ATC AAG T, reverse:

GGT CAA CAA ACA TCC CTC TGG CA. Gene with unknown function, forward: CCG CAA CAG CCC TAT CAG CCA, reverse: ACC TGT TGC AGT ATC CTT CAG CT. *MEGF9Y*, forward: GCC CTC CTC GAC ATG ACA TCC C, reverse: AGC CAG TGA TGA TGA ACC TAC AG. *AKIY*, forward: AGC CAT TCT ACC CCG CTC CAA, reverse: TCG AGA GCC CAA AAC CAC GTC T. These primers were designed to specifically amplify Y sequences; accordingly, PCR reactions with female DNA did not show any amplification. The same PCR procedure was repeated using purified DNA from *C. hernandesii*. 0.2–0.5ml of blood was extracted from the caudal vein with a 1ml needle from 3 males and 3 females of *B. vittatus* and *C. hernandesii* (n= 6 for each species). Blood was immediately mixed with a buffer containing heparin and conserved at 4°C. The wound on the animal skin was disinfected and the animals were released 24h later at the same location where they were captured based on the recorded GPS coordinates. Male/female blood DNA was extracted following the manufacturer's instructions using the Kit Blood DNA Isolation Mini de Norgen Biotek (cat. 46300). PCRs were performed with the Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific; cat. F548S) 30 cycles at 98°C for 2s, 66°C for 5s, and 72°C for 10s. PCR reactions were run on agarose gels (2%). Initially, we did not know whether *B. vittatus* presented XY or ZW chromosomes. So, in parallel, we ran the methodology starting with female RNA-seq data to determine the presence of potential W-linked sequences. All potential W-linked sequences were found in both the male and female genomes and represented false-positive transcripts.

Search for *A. carolinensis* Y-Linked Genes

We applied a previously established genomic approach to search for Y genes using the orthologous genes found in other species (in this case, *A. carolinensis*) on the basis of high-throughput genomic sequencing data (Cortez et al. 2014; Marin et al. 2017). We figured that using orthologous sequences of Y and X gametologues, one could identify the orthologous genes from the genomic raw sequencing data in targeted species. Thereby, we used the known Y-linked

genes from *A. carolinensis* and searched for their best matching reads (best identity) in the *B. vittatus* male and female raw DNA-seq reads using BlastN

(Altschul et al. 1990). We then assembled the best target sequence (higher identity) and compared the resulting sequences against the sequences obtained with the same methodology but using the X gametologues from *A. carolinensis*. In both cases, using either the Y or the X gametologues, we reconstructed the orthologous gene to the *A. carolinensis* X-linked gene. Thus, we ruled out the presence of any *A. carolinensis* Y-linked genes that might have escaped the pleurodont Y chromosome by retrotransposition, transposition, or chromosomal fusion.

Assignment of Y Gene Names

To establish Y gene identity, we searched NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>; last accessed September 13, 2019) for the closest homologs using BlastN and BlastX (Altschul et al. 1990). Transcripts without any significant match and without clear open reading frame predictions were considered to be noncoding. We note that the RNA-seq-based Y transcript reconstructions are expected to usually yield the most frequent isoform for a given Y gene. Functions of Y-linked genes were obtained from genecards (<http://www.genecards.org>; last accessed September 13, 2019).

Synonymous Substitution Analyses

To estimate the approximate age at which XY gametologues halted homologous recombination, pairwise alignments of coding sequences of XY gametologues were obtained using PRANK (Loytynoja and Goldman 2005) based on encoded amino acid sequences. d_s values were then calculated using codeml (pairwise option) as implemented in the PAML package (Yang 1997). Six XY gametologues presented d_s values above 0.2 and five XY gametologues presented values below 0.2 that could represent older and younger gametologues, respectively. An

older (stratum 1) and a younger (stratum 2) strata were later confirmed by a PCR approach using genomic DNA from *C. hernandesii* (see main text).

To assess the age at which the novel XY system was originated, we followed a previous procedure (Cortez et al. 2014). Briefly, we used the codeml free-ratio model, as implemented in the PAML package (Yang 1997). For each pair of the six XY gametologues in stratum 1 (see above; table 1) we aligned using PRANK (Loytynoja and Goldman 2005) the coding sequences of XY genes in *B. vittatus* and the coding sequences from one-to-one orthologous genes in *A. carolinensis*, chicken, the soft-shell Chinese turtle, opossum, mouse, human, and *Xenopus*; orthologous coding sequences were downloaded from the Ensembl database (<https://www.ensembl.org/>; last accessed September 13, 2019; v.92). We concatenated the individual gene alignments and selected random positions from the concatenation to generate a new alignment with the original length; we repeated this operation 100 times (100 bootstrap rounds). For each round, we calculated the synonymous substitutions for all branches of the species tree using codeml (implemented in PAML; Yang 1997). The average branch lengths from the 100 bootstraps were calibrated to produce an ultrametric, time-calibrated tree, using the “chronos” library (from the “ape” package in R). We then retrieved the branch lengths just before and after the split of the XY gametologues and the time since corytophanids diverged from *A. carolinensis* (outgroup species). We calculated the age of the sex chromosomes based on the individual branch lengths that together are equivalent to the time that has passed since the divergence between corytophanids and *A. carolinensis*. 95% confidence intervals for the sex chromosome origin estimate were obtained from the estimates of the 100 individual replicates. The divergence time between corytophanids and *A. carolinensis* was retrieved from the recent time-calibrated phylogeny for Squamata reported in Zheng and Wiens (2016) and the weighted median of the divergence estimate reported at TimeTree (<http://www.timetree.org/>; last accessed September 13, 2019).

Table 1

Protein-Coding Y-Linked Genes Identified in *Basiliscus vittatus*

	Gene	Type	d_s	Y gene in <i>Corytophanes hernandesii</i>	Strata	Anolis Chromosome	Chicken Chromosome	Human Chromosome	Function
1	<i>NIBANY/FAM129BY</i>	Protein-coding	0.42	Yes	1	GL343556	17	9	Family with sequence similarity 129 member B
2	<i>CAMSAP1Y</i>	Protein-coding	0.36	Yes	1	GL343625	17	9	Calmodulin regulated spectrin associated protein 1
3	Unknown	Protein-coding	0.27	Yes	1	NA	NA	NA	Hypothetical zinc finger
4	<i>EHMT1Y</i>	Protein-coding	0.26	Yes	1	GL343556	17	9	Euchromatic histone lysine methyltransferase 1
5	<i>CACNA1BY</i>	protein-coding	0.24	Yes	1	GL343556	17	9	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 B
6	<i>AKIY</i>	Protein-coding	0.22	No	2	AAWZ02036994	17	9	Adenylate kinase isoenzyme 1
7	<i>MEGF9Y</i>	Protein-coding	0.17	No	2	GL343398	17	9	Multiple EGF like domains 9
8	<i>RAB14Y</i>	Protein-coding	0.11	No	2	AAWZ02036218	17	9	Member RAS oncogene family

9	<i>HSPA5Y</i>	Protein-coding	0.088	No	2	AAWZ02037731	17	9	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5
10	<i>GOLGA2Y</i>	protein-coding	0.083	No	2	GL343763	17	9	Golgin A2
11	<i>ZBTB34Y</i>	Protein-coding	0.069	No	2	GL343502	17	9	Zinc finger and BTB domain containing 34
12	<i>CCDC183Y</i>	Protein-coding	NA	No	2	NA	NA	9	Coiled-coil domain containing 183

RNA-Seq Read Mapping and Expression Analyses

We concatenated the RNA-seq data from the 12 samples from *B. vittatus* and reconstructed a full transcriptome using Trinity (v2.0.2, default k-mer of 25bp) (Grabherr et al. 2011). Then, RNA-seq reads were mapped to the reconstructed transcriptome using Kallisto (Bray et al. 2016). We downloaded from the Ensembl database (<https://www.ensembl.org/>; last accessed September 13, 2019; v.92) the transcriptomes of *A. carolinensis* and chicken. RNA-seq reads reported in a previous study (Marin et al. 2017) were mapped to the Ensembl transcriptomes of *A. carolinensis* and chicken using Kallisto. Gene expression estimates (transcripts per million or TPM) were calculated by Kallisto (100 bootstraps). For each gene in the *B. vittatus*, *A. carolinensis*, and chicken transcriptomes, we selected the transcript with the maximum expression level. Normalization across samples was performed using a previous median scaling procedure (Brawand et al. 2011) that uses one-to-one orthologous genes expressed in all samples to obtain correcting indexes. Comparisons of expression levels between genes on current/ancestral and male/female chromosomes were carried out as previously described (Julien et al. 2012; Cortez et al. 2014; Marin et al. 2017). Specifically,

to infer ancestral expression levels, we exploited the fact that current sex chromosomes are derived from ancestral autosomes and, therefore, have autosomal counterparts in species with nonhomologous sex chromosomes, which are informative concerning proto-sex chromosome expression patterns. We calculated ancestral sex chromosome expression levels as median expression levels of autosomal one-to-one orthologues of X genes in outgroup species with different sex chromosomes systems: *A. carolinensis* and chicken. Ancestral inferred expression output values were calculated per one gene copy/allele, that is, the obtained values were divided by 2. The tissue-specificity index (TSI) for a given gene was calculated as the expression level (TPM) in the tissue with the highest expression level divided by the sum of expressions values in all tissues (Julien et al. 2012).

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using the R package, standard libraries. Data were plotted using the R package, “ggplot2” library (<https://ggplot2.tidyverse.org/>; last accessed September 13, 2019).

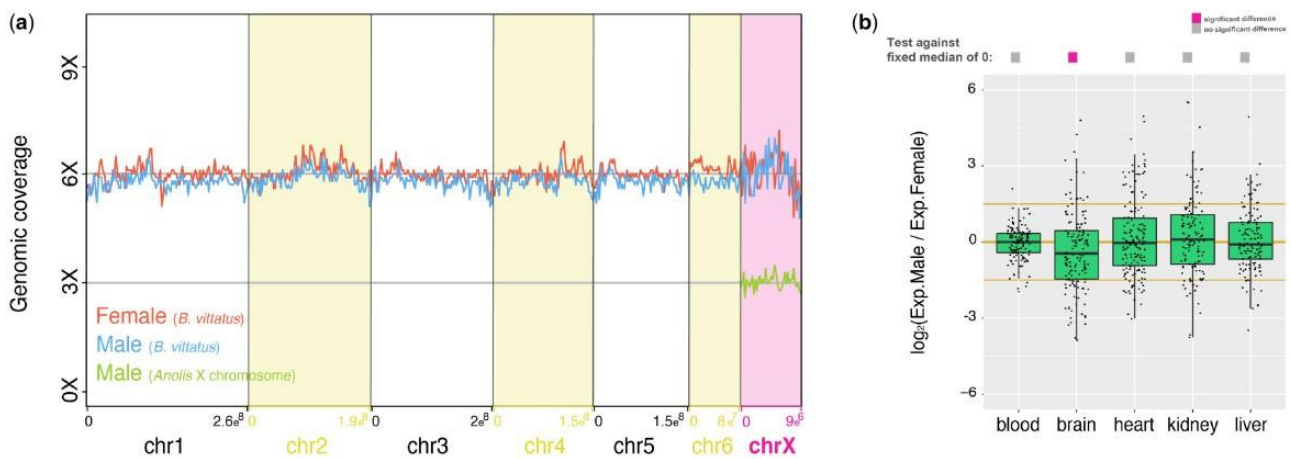
5.4 Results

Corytophanids Lost the XY System Present in All Other Families of Pleurodonts

We sequenced (6X of coverage given the size of the *A. carolinensis* genome (1.7 Gb).) and assembled into scaffolds the genomes of one male and one female individuals of *B. vittatus*. The scaffolds were identified and ordered based on their identity to the *A. carolinensis* reference genome (see Materials and Methods), assuming general conservation in gene synteny between the two species.

Analyses of the six main autosomes (chromosomes 1–6) resulted in the same genomic read coverage for males and females (fig. 2a, blue and red lines). Importantly, we also observed the same genomic read coverage in both sexes for the orthologous sequences to the X chromosome in *A. carolinensis* (fig. 2a,

blue and red lines), hence this chromosome is present in two copies in the male and female genomes of *B. vittatus* and it is indistinguishable from any other autosome. In contrast, in species that harbor heteromorphic XY chromosomes, such as *A. carolinensis*, the X chromosome shows half of the genomic read coverage in males (one X chromosome present; fig. 2a, green line) compared with females (two X chromosomes present). Scaffolds corresponding to the pleurodont X chromosome in *B. vittatus* are described in [supplementary table 1](#), [Supplementary Material](#) online.



B. vittatus scaffolds ordered on the basis of *A. carolinensis* chromosomes

FIG. 2. Analysis of the pleurodont X chromosome in *Basiliscus vittatus*. (a) Coverage analyses using either male (blue line) or female (red line) genomic reads for the six main autosomes and the pleurodont X chromosome. Autosomes and the pleurodont X chromosome in *B. vittatus* were assembled on the basis of *Anolis carolinensis* reference genome. The expected coverage of an X chromosome in males with heteromorphic XY chromosomes is exemplified by the genomic coverage of the X chromosome in *A. carolinensis* (green line); genomic data for *A. carolinensis* were taken from [Marin et al. \(2017\)](#). (b) Boxplots representing the male/female expression ratio of genes located on the pleurodont X chromosome ($n = 218$ genes) in somatic tissues. Significant differences (Mann–Whitney U test): Benjamin–Hochberg-corrected $P < 0.05$ of temperatures against a distribution with fixed median of 0 (i.e., similar expression levels of X genes in males and females). Gray filled squares denote nonsignificant differences between male/female ratios of X genes against a distribution with fixed median of 0, whereas pink filled squares denote significant differences. Error bars, maximum and minimum values, excluding outliers.

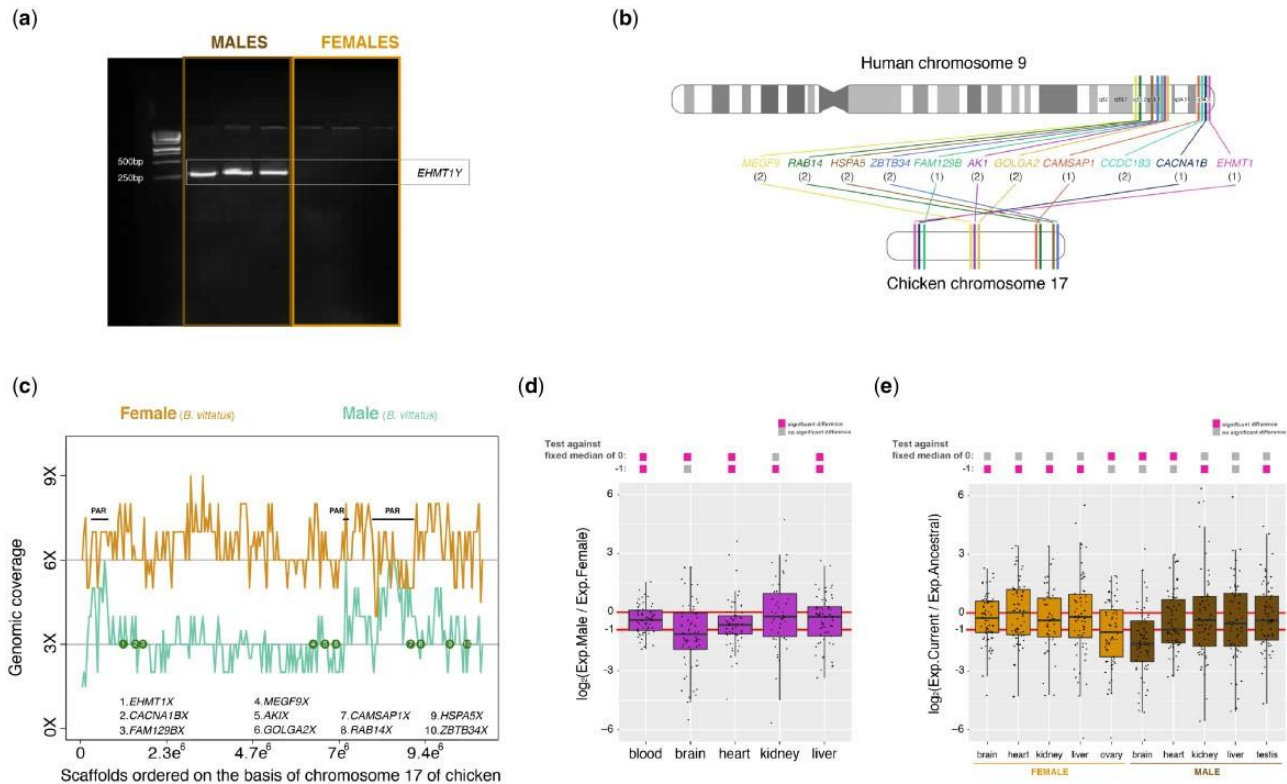


FIG. 3. Analysis of the novel XY chromosomes. (a) Agarose gel showing the PCR products of the *EHMT1Y* and *COL1A1* genes. The control gene, *COL1A1*, was amplified in both males and females, whereas the exemplified Y-specific gene, *EHMT1Y*, was amplified only in males. (b) Diagram depicting the chromosomal positions in human and in the chicken of the orthologous genes to the XY gametologues in *Basiliscus vittatus*. The numbers correspond to the strata assignments (see Table 1 and main text). (c) Coverage results for the novel X chromosome in *B. vittatus* using either male (green line) or female (orange line) genomic reads. The X chromosome in *B. vittatus* was assembled on the basis of the chicken chromosome 17. Green circles denote the approximate location of the X gametologues; numbers correspond to the genes shown in the figure. (d) Boxplots representing the male/female expression ratios of genes located on the novel X chromosome ($n = 67$ genes) in somatic tissues. Significant differences (Mann–Whitney U test): Benjamin–Hochberg corrected $P < 0.05$ of temperatures against distributions with fixed medians of 0 (i.e., similar expression levels of X genes in males and females) and 1 (i.e., half the expression levels of X genes in males compared with females). (e) Boxplots representing the current/ancestral expression ratio for genes located on the novel X chromosome ($n = 67$ genes) for female tissues (light brown) and male tissues (dark brown). Significant differences (Mann–Whitney U test): Benjamin–Hochberg-corrected $P < 0.05$ of temperatures against distributions with

fixed medians of 0 (i.e., current and ancestral expression levels are similar) and 1 (i.e., current expression levels are half of the ancestral expression levels). (d–e) Gray filled squares denote nonsignificant differences between male/female ratios of X genes and a distribution with fixed medians (0 or 1), whereas pink filled squares denote significant differences. Depending on the dispersion of the data, a sample could be either not significant or significantly different from the two fixed medians. Error bars, maximum and minimum values, excluding outliers.

Moreover, the old X chromosome in *B. vittatus* exhibited the same expression levels in most somatic tissues in males and in females (except for brain that shows female-bias expression; Benjamini–Hochberg-corrected Mann–Whitney U test against a reference value of “0,” $P < 0.05$; fig. 2b), indicating that the old X chromosome shows balanced expression levels between sexes and that the male-specific X upregulation mechanism described in *A. carolinensis* (Marin et al. 2017) is probably lost. Lastly, we searched the male and female genomes of *B. vittatus* for *A. carolinensis* Y-linked genes that could have either escaped the Y chromosome via retrotransposition or were translocated to a different chromosome. We could not find traces of any known Y-linked genes from *A. carolinensis*, meaning the pleurodont Y chromosome was completely lost from *B. vittatus* lineage.

Corytophanids Acquired a New Pair of XY Chromosomes

We applied a subtraction approach to the male and female transcriptomic data of *B. vittatus*. We used RNA-seq data from brain, heart, liver, kidney, and gonads of one male and one female *B. vittatus*. Briefly, we searched for RNA-seq reads that were only present in males or females. We then assembled sex-specific transcriptomes and aligned the resulting transcripts to the male and female genomic reads to discard those genes with sex-specific expression that are not truly located on sex chromosomes (see Materials and Methods). Out of 3,185 transcripts with male-biased expression, we found that 23 transcripts were present in the male genome of *B. vittatus* and absent from the female genome of *B. vittatus*. Of these 23 male-specific transcripts, 12 code for proteins (table 1),

whereas 11 appear to be long noncoding RNAs (no hits in public databases and with no obvious open reading frames) or transposable elements. We validated six protein coding Y genes employing genomic PCRs (see Materials and Methods), obtaining PCR amplifications only when male DNA was used (fig. 3a).

We noted that the protein-coding Y genes from *B. vittatus* were not orthologous to genes located on the X chromosome of *A. carolinensis*. Instead, they were orthologous to genes located on various scaffolds in this species with no chromosomal assignment (table 1). Despite the long evolutionary distance, we searched the Y-linked genes of *B. vittatus* in the reference genome of chicken. We found that all of them are located on chromosome 17, which is also orthologous to the final segment of the q arm on the human chromosome 9 (q33–q34; fig. 3b; table 1).

Detailed examination of the scaffolds in *B. vittatus* that are orthologous to the chromosome 17 in chicken showed that the genomic read coverage in males is half (3) of the genomic read coverage found in females (6; fig. 3c). Thus, *B. vittatus* shows a fully differentiated pair of XY chromosomes. Importantly, the X gametologues in *B. vittatus* are located on the nonrecombinant region (i.e., the male-specific region) of the sex chromosome (fig. 3c). Of the 287 protein-coding genes annotated on the chromosome 17 of chicken (https://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Location/Chromosome?r=17; last accessed September 13, 2019), which could serve as a proxy of the ancestral gene content, we recovered 95% of the genes on the X chromosome in *B. vittatus* but only 13 (4.5%) genes on the Y chromosome in *B. vittatus*. Based on these results, we inferred that most of the Y content has been lost. Note that the coverage between males and females is similar (6 of coverage) in three small segments of the chromosome sequence (fig. 3c; PAR labels). These segments likely represent the pseudoautosomal region, which appears divided into three segments probably due to chromosomal rearrangements that occurred following the divergence of chicken and the corytophanids.

We found that the expression levels of the corytophanid X chromosome are biased toward females in blood, brain, heart, and liver tissues (fig. 3d). Male/female expression level ratios of X-linked genes are different from a distribution with fixed median of 0 (i.e., similar expression levels of X genes in males and females), and are also different from a distribution with fixed median of 1 (i.e., half the expression levels of X genes in males compared with females). Therefore, the male/ female expression level ratios for the X chromosome are placed at an intermediate state. This suggests that the X chromosome in males is neither fully compensated nor shows the absence of dosage compensation. Expression level analyses indicate that most X-linked genes are partially compensated. Data from kidney showed data with larger variance and were not significant against the reference value of zero.

We decided to compare the current expression levels of the genes on the corytophanid X chromosome against the estimated ancestral expression. To infer ancestral expression levels, we exploited the fact that the current sex chromosomes are derived from ancestral autosomes and therefore have autosomal counterparts in species with nonhomologous sex chromosomes, which are informative concerning proto-sex chromosome expression patterns. We estimated ancestral expression levels using one-to-one orthologues of X genes in *A. carolinensis* and chicken. We found that the X chromosome in female tissues maintained the ancestral levels (except for ovary that shows lower current expression levels). In males, the pattern exhibited by the X chromosome seems more complex: brain, heart, and liver show reduced current expression levels, whereas kidney and testis have higher current expression levels.

Functions and Gene Expression Patterns of XY Gametologues in Corytophanids

The gene set found on the Y chromosome of *B. vittatus* is different from those usually described on the Y chromosomes of mammals (Hughes et al. 2010; Bellott et al. 2014, 2017; Cortez et al. 2014; Janecka et al. 2018), on the W chromosome of birds (Zhou et al. 2014), or on the Y chromosome of *A. carolinensis* (Marin et al. 2017), where many of the few remaining Y and W-linked genes have regulatory functions. In *B. vittatus*, however, only two genes show clear regulatory functions: *EHMT1Y* (transcription regulation) and *ZBTB34Y* (transcription repression). The majority of the Y-linked genes in *B. vittatus* code for proteins with functions associated with the membranes and intracellular trafficking (table 1), such as microtubule-organization (*CAMSAP1Y*), membrane protein (*MEGF9Y*), intracellular membrane trafficking (*RAB14Y*), Golgi-specific protein (*GOLGA2Y*), voltage-dependent calcium channel (*CACNA1BY*), and a member of the axoneme (*CCDC183Y*). Additionally, we found a regulator of phosphorylation (*FAM129BY*), a chaperone (*HSPA5Y*), and an intracellular adenine ratio sensor (*AK1Y*). Associated functions were retrieved from the GeneCards database (<https://www.genecards.org/>; last accessed September 13, 2019).

We also found that X gametologues in both females and males, which are not located in the pseudoautosomal region (fig. 3c), are lowly expressed compared with the ancestral expression levels (minus 1-fold change; fig. 4a). Moreover, with the exception of *ZBTB34Y*, Y-linked genes are very lowly expressed (minus 2.5-fold change; fig. 4a).

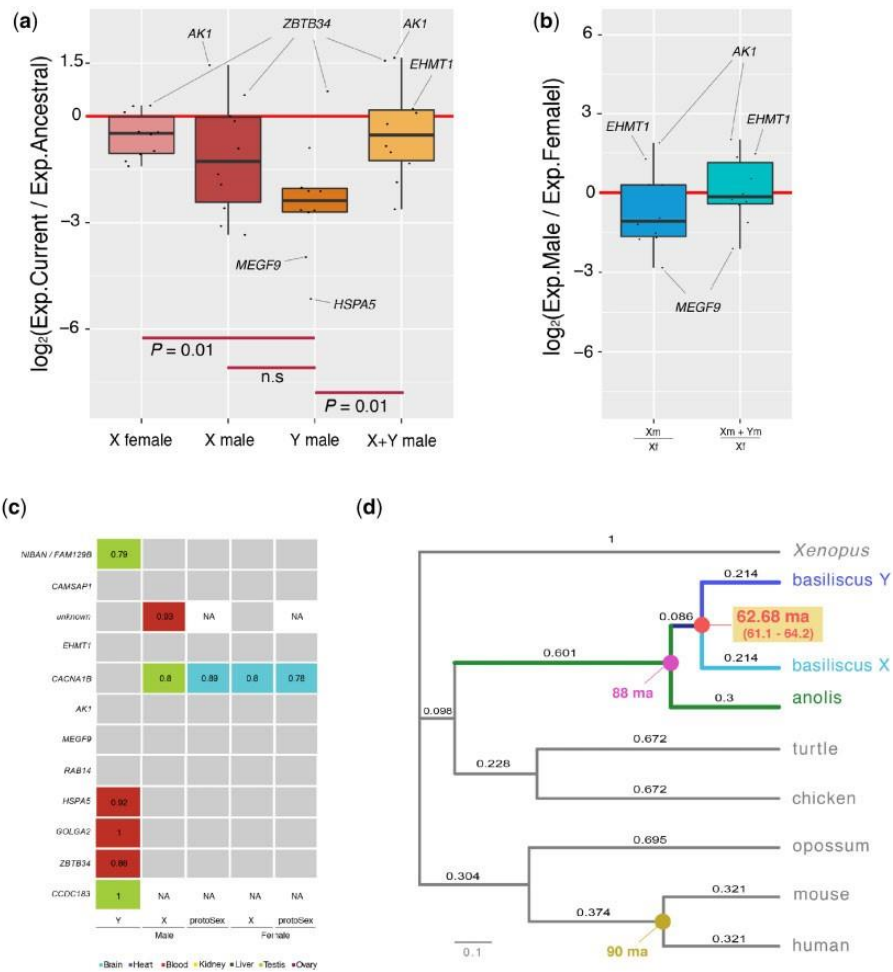


FIG.4.Analyses of XY gametologues. (a) Boxplots representing the current/ancestral expression ratio of X gametologues in females, X gametologues in males, Y gametologues in males, and the added expression of X and Y gametologues in males (n= 10 genes). Significant differences (Mann–Whitney U test). Genes with the highest and lowest expression ratios are indicated. (b) Boxplots representing the expression balance of XY gametologues between the two sexes, that is, the X gametologues expression levels in males compared with those in females, as well as the added expression levels of X and Y gametologues in males compared with the expression levels of the X gametologues in females (n= 10 genes). Genes with the highest and lowest expression ratios are indicated. (c) Tissue-specificity index (TSI) of XY gametologues and proto-sex genes (tissue-specificity of orthologous genes in the chicken and the green anole) in males and females. Genes with a tissue-specificity index below 0.7 are colored in gray. Genes with a tissue-specificity index above 0.7 are filled using the colors shown at the bottom of the figure; TSI values are indicated. (d) ds tree built using the concatenated coding nucleotide sequences of stratum 1 genes and orthologous sequences in other tetrapod species. The age of the sex chromosome system in corytophanids was obtained by comparing specific branch lengths and the age at specific nodes (see Materials and Methods). Age estimates for specific nodes are based on Zheng and Wiens (2016). Millions of years ago are denoted by “Ma.”

However, the added expression of Y and X gametologues in males is similar to the expression of X gametologues in females (fig. 4b), meaning selection has probably acted to maintain a balanced expression level despite the low expression levels of the Y-linked genes.

Interestingly, *EHMT1Y-X*, a gene that codes for a protein capable of modifying the epigenetic landscape of the genome (<https://www.genecards.org/>; last accessed September 13, 2019), retained the ancestral expression levels in males when the expression levels of both gametologues were combined (fig. 4a–b). Finally, in corytophanids, following Y expression decay, very few genes changed their tissue-specificity. Most genes were expressed in all tissues at similar levels (fig. 4c). One gene gained testis specificity (*NIBAN/ FAM129BY*; fig. 4c), one gene appears to be unique to the Y chromosome and shows testis specificity (*CCDC183Y*; fig. 4c), three genes gained blood specificity (*GOLGA2Y*, *HSPA5Y*, and *ZBTB34Y*; fig. 4c), and one gene gained kidney specificity (*MYO6Y*; fig. 4c).

Origin of the New XY System in Corytophanids

To define the presence of potential strata on the sex chromosomes of *B. vittatus*, we first calculated d_s values between XY gametologues. Six genes showed d_s values greater than 0.2 and could represent older gametologues (table 1). Five genes showed d_s values smaller than 0.2 and could represent younger gametologues (table 1). Finally, one gene, *CCDC183Y* could not be analyzed because the X gene was absent from our database.

The XY chromosomes in *B. vittatus* could be unique of the species or could be present in other species of corytophanids. Previous studies (Rovatsos, Pokorna, et al. 2014; Altmanova et al. 2018), however, indicate that several species of corytophanids most likely replaced the pleurodont sex chromosomes by another sex determination system. However, multiple sex determination systems could have evolved in the family. To confirm the presence of the XY system in other corytophanids we sought to amplify by means of genomic PCR the 12 Y-linked protein-coding genes from *B. vittatus* in DNA samples from *C. hernandesii*; this species belongs to the second major clade in the *Corytophanidae* family (fig. 1). The five Y genes with the largest d_s values, *NIBANY/FAM129BY*, *CAMSAP1Y*,

the gene with unknown function, *EHMT1Y*, and *CACNA1BY* showed PCR amplification specifically in males (table 1; supplementary fig. 1, Supplementary Material online, for an example), indicating that *C. hernandesii* shares the XY system with *B. vittatus*. According to the fossil record, *B. vittatus* and *C. hernandesii* diverged 61.7Ma (fig. 1) (Taylor et al. 2017). Finally, we classified the XY gametologues in two strata: five genes in stratum 1, which halted recombination before the split of *B. vittatus* and *C. hernandesii* (>61.7Ma) and seven genes in stratum 2 that are probably exclusive of the *B. vittatus* lineage (<61.7Ma).

Since the split between the *Corytophanidae* and *Crotaphytidae* (sister group) (Zheng and Wiens 2016) families occurred 76.5Ma (fig. 1) (Zheng and Wiens 2016), then the sex chromosome system turnover in corytophanids occurred at some point over a period of 14.8Myr. In order to obtain a more precise estimate for the origin of the corytophanid XY system, we performed analyses based on ds trees. We built the trees using the nucleotide sequences of the XY gametologues in *B. vittatus* and orthologous sequences from *A. carolinensis*, chicken, mammals, and *Xenopus*. We compared the branch lengths of the ultrametric, time-calibrated tree, X and Y sequences against the branch length just before their divergence. We calibrated the values based on the divergence time between *A. carolinensis* and *B. vittatus* using the most recent time-calibrated phylogeny of squamates (85.7Ma; Zheng and Wiens 2016; figs. 1 and 4d; see Materials and Methods). From the concatenated data of stratum 1 gametologues we estimated that the origin of the corytophanid XY system occurred 61.05Ma (95% confident intervals: 59.55–63.1 Ma, values derived from 100 bootstrap rounds; fig. 4d).

The age of the sex chromosomes is based on specific branch lengths in the ds trees and the most recent time calibrated phylogeny for squamata (Zheng and Wiens 2016). However, alternative phylogenies may affect the inferences we draw from evolutionary processes (Title and Rabosky 2017). We, therefore, repeated the analysis using the time estimate retrieved from the TimeTree database (<http://www.timetree.org/>; last accessed September 13, 2019), which reports the weighted-average divergence estimate from multiple scientific studies. The *A. carolinensis*/*B. vittatus* split reported in Time Tree is of 88Ma. We

estimated the origin of the XY system to have taken place around 62.68 (61.1–64.2 Ma; 95% confident intervals).

5.5 Discussion

In this study, we confirmed that corytophanids lost the pleurodont XY system that, otherwise, has been preserved in all other families of the pleurodont clade (31 species from 12 families of pleurodons have been examined so far) (Gamble et al. 2014; Rovatsos, Pokorna, et al. 2014; Altmanova et al. 2018) for 160–170 Myr. Moreover, we showed that corytophanids acquired a new pair of XY chromosomes. The pleurodont Y chromosome was completely lost from corytophanids after the emergence of a new sex-determining gene able to control the signaling cascade that triggers the development of gonads.

The pleurodont Y-linked genes were most likely lost because they conserved functional redundancy with the X gametologues and did not evolve significant male-specific functions. This hypothesis could be tested in pleurodons with the ancestral XY system

We also found that the new sex chromosome system in corytophanids has several attributes that are unique compared with other sex chromosomes that have been studied in amniotes. For instance, in mammals, the X gametologues are among the X-linked genes with the highest expression levels (Cortez et al. 2014), and Y-linked genes show regulatory functions that could be beneficial to males, for example, in spermatogenesis. In contrast, Y-linked genes in *B. vittatus* are very lowly expressed, show membrane or intracellular trafficking-related functions and particular tissue-specificity gains, such as blood- and kidney-specific expression. The membrane and transport-related functions of most Y-linked genes are also at odds with the master regulatory role Y chromosomes are supposed to play, a process that is generally driven by genes coding for transcription factors or epigenetic regulators.

After screening the Y-linked catalog of *B. vittatus*, the gene *EHMT1Y*, a histone lysine methyltransferase, or the gene *ZBTB34Y*, a transcription repressor, could be promising candidates for sex determination. The *ZBTB34Y*

gene, however, is preferentially expressed in blood, which does not fit well with activity during sex determination. The *EHMT1Y* gene shows broad conserved expression across many somatic tissues, which is also not compatible with a role as a sex-determining regulator. More experiments would be needed to identify the sex-determining gene on either the Y or X chromosomes in corytophanids.

In theory, the X chromosome in females should show twice the expression level compared with males when the Y chromosome has degenerated and there is no dosage compensation mechanism. We propose that males of corytophanids exhibit incomplete dosage compensation, that is, most genes are partially compensated (i.e., relatively lower expression levels in males compared with females). A similar model was proposed for the sex chromosomes in platypus and chicken (Julien et al. 2012).

Gametologues are subjected to specific selection forces because males have maintained an X and Y active alleles that could potentially produce a dosage conflict. In humans, for instance, because one complete X chromosome is inactivated in females, the X gametologues tend to escape the inactivation process (Bellott et al. 2014) to preserve balanced expression levels between males and females. In *B. vittatus*, XY gametologues show balanced expression levels in both sexes, despite their low expression levels. It has been suggested that Y- and W-linked genes were probably selected due to their haploinsufficiency (i.e., the quantity of proteins produced by one allele is insufficient to carry out the biological function) (Bellott et al. 2014; Cortez et al. 2014). Our results suggest that this hypothesis fits well with the data found in *B. vittatus*.

We classified the XY gametologues in two strata. Stratum 1 is composed of five genes that halted recombination before the split of *B. vittatus* and *C. hernandesii* (>61.7Ma).

Using the synonymous substitution rates of these genes we estimated that the “old-XY system -> new-XY system” transition occurred 62.68Ma in the ancestor of the *Corytophanidae* family. Note that this estimate could change as new fossils of casqued-head lizards are found (Taylor et al. 2017).

We were unable to identify which environmental or genetic factors could have triggered, 63 Ma, the sex chromosome system transition in corytophanids. New

methods are therefore required to reconstruct the species' ancestral geographical ranges, which could help associate specific sex chromosome system transitions with past environmental fluctuations.

5.6 Supplementary Material

Supplementary data are available at Genome Biology and Evolution online.

5.7 Acknowledgments

This study was supported by grants from PAPIIT-UNAM (RA200516, RA-200518) and CONACyT-SEP Basic Science grant (254240) awarded to D.C. We thank the people from the community of “La Selva del Marinero” in Veracruz for their assistance. We also thank the people working at the Massive Sequencing Unity of the University of Mexico (UUSMDUNAM), particularly Ricardo Grande, Gloria Vazquez, and Alejandro Sanchez. We thank Luis Gamboa for his help.

5.8 Authors' Contributions

D.C. designed the study. A.A. and D.C. performed the analyses. O.H.-G. and F.M.-C. organized the fieldwork. A.A., D.C., L.A.R.-M., G.S.-V., D.A.-G., O.H.-G., and F.M.-C. participated in the fieldwork. M.G.-M. manipulated and sacrificed the animals. A.L.-N. performed additional analyses. G.S.-V., L.A.R.-M., O.H.-G., and F.M.-C. contributed to the interpretation of the results with their vast knowledge of the *Corytophanidae* family. D.C., O.H.-G., and F.M.-C. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

5.9 Literature Cited

- Akagi T, Henry IM, Tao R, Comai L. 2014. Plant genetics. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* 346(6209):646–650.
- Alfoldi J, et al. 2011. The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature* 477:587–591.
- Altmanova M, et al. 2018. All iguana families with the exception of basilisks share sex chromosomes. *Zoology (Jena)* 126:98–102.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403–410.
- Bachtrog D, et al. 2014. Sex determination: why so many ways of doing it? *PLoS Biol.* 12(7):e1001899.

- Bellott DW, et al. 2014. Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* 508(7497): 494–499.
- Bellott DW, et al. 2017. Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. *Nat Genet.* 49(3):387–394.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114–2120.
- Brawand D, et al. 2011. The evolution of gene expression levels in mammalian organs. *Nature* 478(7369):343–348.
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol.* 34(5):525–527.
- Cortez D, et al. 2014. Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. *Nature* 508(7497):488–493.
- Gamble T, Geneva AJ, Glor RE, Zarkower D. 2014. Anolis sex chromosomes are derived from a single ancestral pair. *Evolution* 68(4):1027–1041.
- Graherr MG, et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNAseq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 29(7):644–652.
- Hughes JF, et al. 2010. Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. *Nature* 463(7280):536–539.
- Janecka JE, et al. 2018. Horse Y chromosome assembly displays unique evolutionary features and putative stallion fertility genes. *Nat Commun.* 9(1):2945.
- Julien P, et al. 2012. Mechanisms and evolutionary patterns of mammalian and avian dosage compensation. *PLoS Biol.* 10(5):e1001328.
- Kichigin IG, et al. 2016. Evolutionary dynamics of Anolis sex chromosomes revealed by sequencing of flow sorting-derived microchromosomespecific DNA. *Mol Genet Genomics* 291(5):1955–1966.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12(4):357–360.
- Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9(4):357–359.
- Li H et al.; Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16):2078–2079.
- Loytynoja A, Goldman N. 2005. An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(30):10557–10562.
- Luo R, et al. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memoryefficient short-read de novo assembler. *Gigascience* 1(1):18.
- Marin R, et al. 2017. Convergent origination of a Drosophila-like dosage compensation mechanism in a reptile lineage. *Genome Res.* 27(12):1974–1987.
- Pennell MW, Mank JE, Peichel CL. 2018. Transitions in sex determination and sex chromosomes across vertebrate species. *Mol Ecol.* 27(19):3950.
- Quinlan AR, Hall IM. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26(6):841–842.
- Rovatsos M, Altmanova M, Pokorna M, Kratochvil L. 2014a. Conserved sex chromosomes across adaptively radiated Anolis lizards. *Evolution* 68(7):2079–2085.
- Rovatsos M, Altmanova M, Pokorna MJ, Kratochvil L. 2014b. Novel X-linked genes revealed by quantitative polymerase chain reaction in the green anole, *Anolis carolinensis*. *G3 (Bethesda)* 4:2107–2113.
- Rovatsos M, Pokorna M, Altmanova M, Kratochvil L. 2014. Cretaceous park of sex determination: sex chromosomes are conserved across iguanas. *Biol Lett.* 10(3):20131093.
- Rupp SM, et al. 2017. Evolution of dosage compensation in *Anolis carolinensis*, a reptile with XX/XY chromosomal sex determination. *Genome Biol Evol.* 9(1):231–240.
- Taylor GW, et al. 2017. Sexual dimorphism, phenotypic integration, and the evolution of head structure in casque-headed lizards. *Ecol Evol.* 7(21):8989–8998.
- Title PO, Rabosky DL. 2017. Do macrophylogenies yield stable macroevolutionary inferences? An example from squamate reptiles. *Syst Biol.* 66(5):843–856.

- 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 Biol.* 11(8):e1001643.
- Yang Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci.* 13:555–556.
- 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. *Mol Phylogenet Evol.* 94:537–547.
- Zhou Q, et al. 2014. Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa. *Science* 346(6215):1246338.


6. CAPÍTULO 2: SISTEMAS DE DETERMINACIÓN SEXUAL POR CROMOSOMAS SEXUALES EN REPTILES QUE HABITAN EN CLIMAS FRÍOS

Artículo de investigación: Viviparous reptile regarded to have temperature-dependent sex determination has old XY chromosomes. Paola Cornejo-Páramo, Duminda S B Dissanayake, Andrés Lira-Noriega, Mónica L Martínez-Pacheco, Armando Acosta, Ciro Ramírez-Suástegui, Fausto R Méndez-de-la-Cruz, Tamás Székely, Araxi O Urrutia, Arthur Georges, Diego Cortez. *Genome Biology and Evolution*, Volume 12, Issue 6, June 2020, Pages 924–930, <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa104>.

Resumen:

E. tympanum y *E. heatwolei* son reptiles que viven en ecosistemas con temperaturas ambientales promedio que oscilan entre 12 y los 15 °C durante su temporada de reproducción. Sin embargo, estudios previos encontraron que estos scincidos tenían un sistema de determinación sexual por temperatura, donde elevadas temperaturas (>32 °C) producían 100% de machos. Los *Eulamprus* son los únicos reptiles conocidos que son vivíparos (las crías se desarrollan completamente al interior del tracto reproductivo de la madre) y que tienen una determinación sexual por temperatura. Nuestra hipótesis fue que *Eulamprus* presentaba cromosomas sexuales no identificados y una reversión del sexo a temperaturas extremas, que es realidad una característica ancestral que no se ha perdido completamente. Trabajando con transcriptomas y el genoma de *E. heatwolei* se identificaron un total de 14 gametólogos pertenecientes a un sistema XY. Este estudio demuestra dos cosas 1) que los reptiles que viven en climas fríos evolucionaron cromosomas sexuales para evitar fuertes sesgos en la proporción de alguno de los sexos producto de condiciones climáticas extremas y 2) que todos los reptiles vivíparos poseen, hasta donde se conoce, cromosomas sexuales.

Viviparous Reptile Regarded to Have Temperature-Dependent Sex Determination Has Old XY Chromosomes

Paola Cornejo-Paramo^{1,2,†}, Duminda S.B. Dissanayake^{3,4,†}, Andres Lira-Noriega^{5,†}, Monica L. Martinez-Pacheco^{1,†}, Armando Acosta^{1,†}, Ciro Ramirez-Suastegui^{1,2}, Fausto R. Mendez-de-la-Cruz⁶, Tamas Szekely^{2,7}, Araxi O. Urrutia^{2,8}, Arthur Georges ³, and Diego Cortez^{1,*}

¹Center for Genome Sciences, UNAM, Cuernavaca, Mexico ²Department of Biology and Biochemistry, Milner Centre for Evolution, University of Bath, United Kingdom ³Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Australia ⁴CSIRO, Australian National Wildlife Collection, Canberra, Australia

⁵CONACYT Research Fellow, Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec 351, Xalapa, Veracruz, Mexico

⁶Biology Institute, UNAM, Mexico City, Mexico ⁷Department of Evolutionary Zoology and Human Biology, University of Debrecen, Hungary ⁸Institute of Ecology, UNAM, Mexico City, Mexico

*Corresponding author: E-mail: dcortez@ccg.unam.mx.

Accepted: 15 May 2020

† These authors contributed equally to this work.

Data deposition: This project has been deposited at NCBI-SRA database (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra, last accessed May 25, 2020) under the accession BioProject PRJNA573688. Y-linked sequences found in *Eulamprus heatwolei* are available in [Supplementary Material online](#). Shapefiles of geographical ranges of reptiles are available in the figshare platform at the following link https://figshare.com/articles/Reptile_shapefiles/7416638 (last accessed May 25, 2020). The program to map climatic data onto geographical ranges is available in the GitHub platform at the following link <https://github.com/annakrystalli/IUCNextractR> (last accessed May 25, 2020).

6.1 Abstract

The water skinks *Eulamprus tympanum* and *Eulamprus heatwolei* show thermally induced sex determination where elevated temperatures give rise to male offspring. Paradoxically, *Eulamprus* species reproduce in temperatures of 12–15 °C making them outliers when compared with reptiles that use temperature as a cue for sex determination. Moreover, these two species are among the very few viviparous reptiles reported to have thermally induced sex determination. Thus, we tested whether these skinks possess undetected sex chromosomes with thermal override. We produced transcriptome and genome data for *E. heatwolei*. We found that *E. heatwolei* presents XY chromosomes that include 14 gametologs with regulatory functions. The Y chromosomal region is 79–116 Myr old and shared between water and spotted skinks. Our work provides clear

evidence that climate could be useful to predict the type of sex determination systems in reptiles and it also indicates that viviparity is strictly associated with sex chromosomes.

Key words: temperature-dependent sex determination, viviparous reptiles, genetic sex determination systems, water skinks, *Eulamprus heatwolei*.

6.2 Introduction

Eulamprus tympanum and *Eulamprus heatwolei* Reproduce in Colder Conditions Compared with Other Species with Temperature-Dependent Sex Determination

Vertebrates exhibit two major classes of sex determination systems. Genotypic sex determination (GSD), where genetic components guide the development of the gonads, and temperature-dependent sex determination (TSD), where specific incubation temperatures define the sex of the embryos (Bachtrog et al. 2014). TSD in reptiles is thought to have evolved when external conditions that enhance either male or female offspring fitness could influence the sex of the embryos (Charnov and Bull 1977; Shine 1999). For this reason, the discovery of TSD in a viviparous skink was particularly notable (Robert and Thompson 2001). In viviparous species, the external conditions have little effect because embryonic development and hatchling occur inside the mother's womb in a relatively stable environment.

The viviparous water skinks *Eulamprus tympanum* and *E. heatwolei* (family *Scincidae*) are classified as TSD species (Tree of Sex 2014) because cytogenetic analyses found no evidence of heteromorphic sex chromosomes and female *Eulamprus* skinks give rise to male offspring when they are kept at warm temperatures (32C) during pregnancy (Robert and Thompson 2001). Three features, however, make this classification of *Eulamprus* as TSD suspect: 1) These two species inhabit alpine habitats in southeastern Australia (Cogger 2000), whereas most reptiles with TSD systems inhabit lowland areas; 2) Uniquely, although all known viviparous reptiles have genetic sex determination

systems, *E. tympanum* and *E. heatwolei* are the only known viviparous reptiles classified as TSD; and 3) Several studies have found 1:1 sex ratios in *E. heatwolei* at mild temperatures, both in the laboratory and in the field (Schwarzkopf and Shine 1991; Robert and Thompson 2001; Allsop et al. 2006). Taken together, these features implied either a GSD system with thermal override or, although less likely, an atypical TSD system.

We first examined whether ambient temperatures in areas inhabited by *E. tympanum* and *E. heatwolei* during breeding seasons were unusual compared with reptile species with TSD or GSD. For this, we mapped 30 years of ambient temperatures onto the geographic ranges of 101 species with TSD and 99 species with GSD during their breeding season (fig. 1). Average ambient temperatures for *E. heatwolei* and *E. tympanum* during their breeding seasons are 15 and 12.4 C, respectively (fig. 1). Thus, *E. heatwolei* and *E. tympanum* are clear outliers when considered as TSD species, located at 3 and 4 SDs away from the mean of the distribution, respectively (fig. 1). In contrast, *Eulamprus* species are found within the distribution of species with GSD (fig. 1). These results are suggestive of the presence of previously undetected sex chromosomes in these two species.

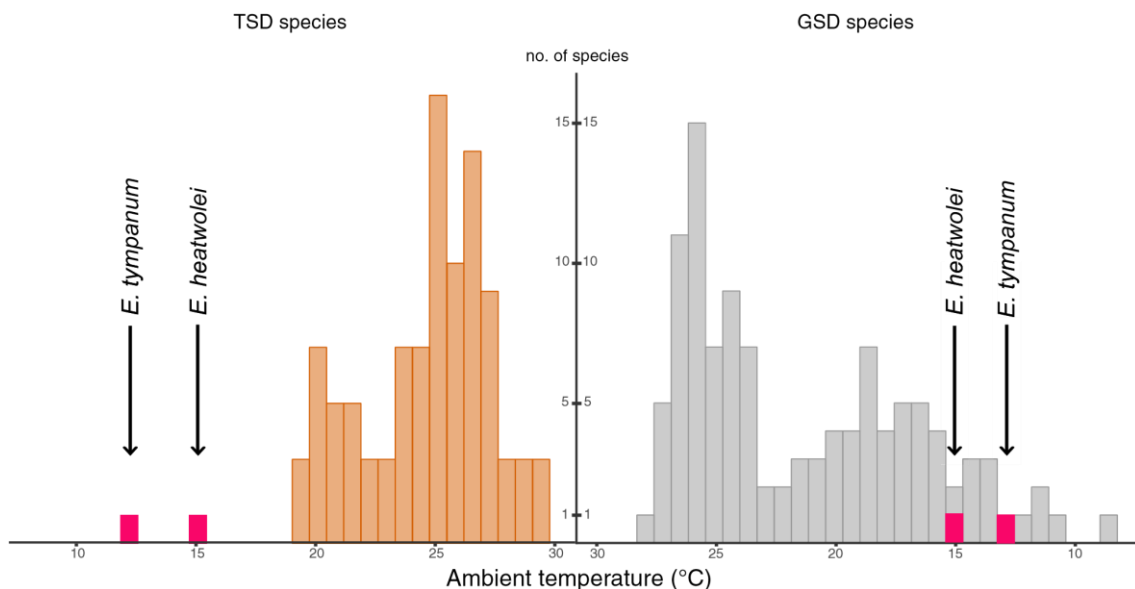


Fig.1.—Distribution of average ambient temperature in geographical ranges during breeding seasons for reptile species with TSD (n= 101) and species with GSD (n= 99). Labeled bars in red correspond to average ambient temperature for *Eulamprus heatwolei* and *Eulamprus tympanum*.

Eulamprus heatwolei Has XY Chromosomes

To test for the presence of previously unidentified sex chromosomes in skinks, RNAseq data were generated from brain, liver, and gonads of one adult male and one adult female *E. heatwolei*. We then applied a subtraction approach (Cortez et al. 2014; Marin et al. 2017) to the male and female transcriptomic data of *E. heatwolei*. Specifically, we assembled a male-restricted transcriptome and used male and female genomic reads to uncover Y-linked transcripts (see Materials and Methods). We identified Y-linked transcripts from 14 protein-coding genes with known orthologous genes located on a single syntenic block on chromosome 5 in *Anolis carolinensis* and chromosome 1 in chicken (fig. 2a and [supplementary table 3, Supplementary Material online](#)). Additionally, we performed a male and female genomic read coverage analysis of six chromosomes of *E. heatwolei* (see Materials and Methods). We found a region on chromosome 5 where the male shows only half of the coverage (i.e., one genomic copy, fig. 2b, and [supplementary fig. 1, Supplementary Material online](#)). XY gametologs map to this specific region on chromosome 5 (fig. 2a and b) and analysis of their genomic coverage is consistent with two X gametologs in females but one X and one Y gametolog in males ([supplementary fig. 2, Supplementary Material online](#)). Lastly, we screened the genomes of seven males and seven females using standard PCRs and found that we could only amplify Y-linked sequences in males (fig. 2c and [supplementary fig. 3, Supplementary Material online](#)). In summary, the results reveal the presence of sex chromosomes in *E. heatwolei*.

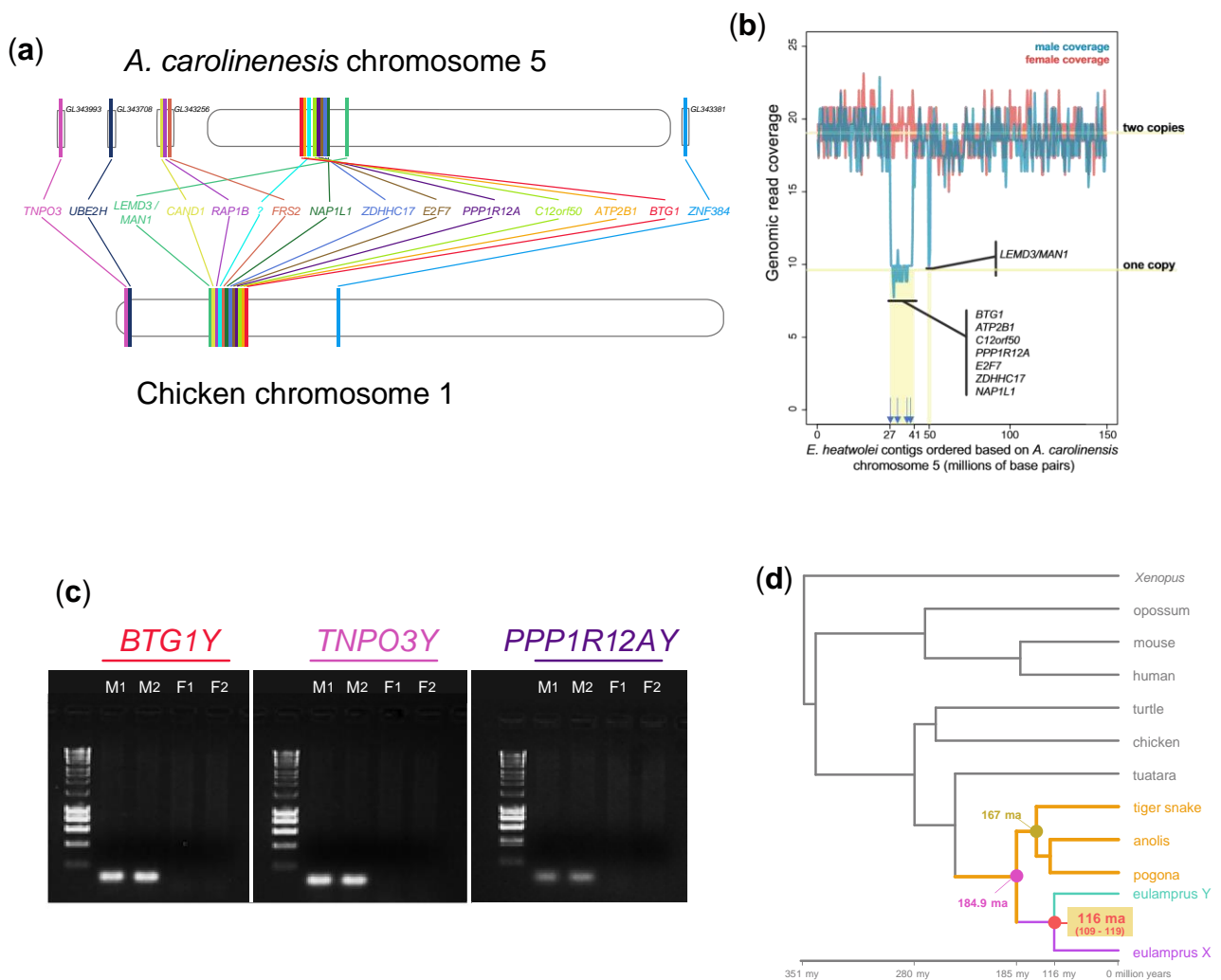


Fig. 2.—(a) Synteny of the 14 XY gametologs in other species. (b) Male (blue) and female (red) genomic coverage along the chromosome 5 of *Eulamprus heatwolei*. A syntenic region shows half of the coverage in males (one copy) but regular coverage in females (two copies). XY gametologs map to this region. Blue arrows show the matching locations of Y-linked markers from *Niveoscincus ocellatus*. (c) PCR screenings of two males and two females using primers designed to amplify three Y-linked genes (seven males and seven females were screened in total; see [supplementary fig. 3, Supplementary Material online](#)). (d) Time-calibrated synonymous substitution tree used to estimate the age of the XY chromosomes in *E. heatwolei*. Branch lengths represent millions of years.

Functions associated to the identified Y-linked genes (retrieved from the GeneCards database; www.genecards.org, last accessed May 25, 2020) include ubiquitination (*UBE2H* and *CAND1*), signaling pathways (*LEMD3/MAN1* and

FRS2), cell cycle, cell growth and differentiation (*PPP1R12A*, *E2F7*, *RAP1B*, and *BTG1*), transcription regulation (*ZNF384*), ion transport (*ATP2B1*), fatty acid metabolism (*ZDHHC17*), and DNA replication (*NAP1L1*). Many of the identified Y chromosome-linked genes have known regulatory functions. Examining the list of putative Y-linked genes, *PPP1R12A* is of particular interest. The protein coded by this gene is part of the *PPP1C* protein complex that catalyzes many protein dephosphorylation reactions in the cell and is essential for male fertility in mice (Silva et al. 2015). Another member of the *PPP1C* complex, the *PPP1CC* gene, is one of the oldest genes on the Y chromosome of pleurodonts (Marin et al. 2017), a group that diverged from the skink lineage 184.9 Ma (data retrieved from the TimeTree database; www.timetree.org/, last accessed May 25, 2020). The convergent co-option of genes forming part of the same molecular pathways (*PPP1R12A* and *PPP1CC* are probably involved in spermatogenesis) on the Y and W chromosomes is a frequent phenomenon in vertebrates (Marshall Graves and Peichel 2010; O’Meally et al. 2012).

To obtain an estimate for the origin of the male-specific region on the Y chromosome (MSY) in the *E. heatwolei* lineage, we used ds trees based on the nucleotide sequences of the XY gametologs in *E. heatwolei* and orthologous sequences from other species (see Materials and Methods). From the synonymous substitution rates of the concatenated sequences of the XY gametologs, we estimated that *E. heatwolei* sex chromosomes originated 116 Ma (95% confident intervals: 109.45–119.28 Ma; values derived from 100 bootstrap rounds; fig. 2d). Moreover, estimates obtained using BEAST resulted in a sex chromosome age of 93 Ma ([supplementary fig. 4, Supplementary Material online](#)). Next, we retrieved Y-linked markers reported for the spotted skink, *Niveoscincus ocellatus* (Hill et al. 2018). These sequences are short (17– 70 bp) and likely represent repeated, intergenic or intronic regions of the MSY. Only nine Y markers aligned to the *E. heatwolei* and *A. carolinensis* genomes; four mapped to multiple genomic locations (i.e., likely repeated sequences), one mapped to chromosome 3, and four mapped to chromosome 5, exactly within the MSY of *E. heatwolei* (fig. 2, blue arrows; [supplementary table 3, Supplementary Material online](#)). This association is highly significant (Fisher exact test, $P < 0.001$) and indicative that water and spotted skinks likely share a common MSY, which

originated >79 Ma (divergence time between the two groups of skinks; data retrieved from TimeTree; <http://www.timetree.org/>, last accessed May 25, 2020).

6.3 Conclusions

Our work identified the MSY locus in *E. heatwolei*'s chromosome 5 and, importantly, it provided evidence that climate could be a good predictor of sex determination systems in reptiles. We can now reclassify *E. heatwolei* (and probably *E. tympanum*) as a viviparous skink showing GSD with thermally induced sex reversal at elevated temperatures (Shine et al. 2002; Quinn et al. 2007; Radder et al. 2008; Holleley et al. 2015). In the past, also the viviparous skink, *N. ocellatus* was assumed to have TSD on a lowland population (Pen et al. 2010). Here, we found that *E. heatwolei* and *N. ocellatus* share Y-linked sequences. We estimated that the sex-linked locus originated 79–116 Ma. Note that other species in the Scincidae family also have XY chromosomes (supplementary fig. 5, Supplementary Material online), so perhaps all skink species share the same GSD system.

Formerly, reptiles were thought to either have GSD or TSD systems. However, various studies have shown that in several species, including the viviparous *E. heatwolei* (Robert and Thompson 2001) (and this work), the viviparous *N. ocellatus* (Hill et al. 2018), the oviparous *Pogona vitticeps* (Quinn et al. 2007; Holleley et al. 2015), and the oviparous *Bassiana duperreyi* (Shine et al. 2002; Radder et al. 2008), certain incubation temperatures can override the signaling cascade initiated by sex-linked genes and influence the fate of the embryonic gonads. These thermally induced sex reversal mechanisms may represent retained elements of ancestral TSD systems. Further analyses in *E. heatwolei* and related species could help answer this question.

We know that viviparity has evolved from oviparity >100 times (Sites et al. 2011; Pyron and Burbrink 2014) and it is strongly correlated with the colonization of cold alpine environments (Lambert and Wiens 2013). The *Eulamprus* species were the last viviparous reptiles classified as TSD (Tree of Sex 2014). Our results indicate, for the moment, that viviparity in reptiles is strictly associated with GSD systems.

6.4 Materials and Methods

Data Generation

One adult male (Euhea_18_05) and one adult female individual (Euhea_18_03) of *E. heatwolei* species were captured from a population that inhabits Woods Reserve, Corin Road, ACT, Australia (35.480751, 148.940398). Both individuals were sacrificed by intraperitoneal injection of pentobarbitone following the standard operating procedures specified by the animal ethics committee of the University of Canberra. We generated DNA-seq libraries for a male and female *E. heatwolei* from liver tissue using the Illumina TruSeq DNA protocol for short insert size (400–450nt). We generated strand-specific RNA-seq libraries (using the Illumina TruSeq Stranded mRNA Library protocol) for a total of six samples obtained from brain, liver, and gonads for a male and female *E. heatwolei*. All libraries were sequenced on Illumina HiSeq 2500 sequencers at the University of Canberra. We generated 262–269 million 150-nt pairedend DNaseq reads. We generated 82–95 million 125-nt paired-end RNAseq reads. Further details in [supplementary table 4, Supplementary Material online](#). Quality of the reads was verified using FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>, last accessed May 25, 2020) and the remaining adaptors were removed with Trimmomatic (Bolger et al. 2014).

Assembly of Y-Linked Transcripts

To assemble Y-linked transcripts in *E. heatwolei*, we used a subtraction approach based on male and female RNAseq data (Cortez et al. 2014; Marin et al. 2017; Acosta et al. 2019). Briefly, male RNA-seq reads were aligned onto the de novo reconstructed female transcriptome from *E. heatwolei* using Hisat2 (v2.0.2) (Kim et al. 2015); no mismatches allowed; reads not mapping were selected. We also removed male RNA-seq reads sharing k-mers with the female transcriptome (Akagi et al. 2014). The selected reads were passed to Trinity (v2.0.2, default k-mer of 25bp) (Grabherr et al. 2011) to assemble transcripts that were only present in male tissues. We obtained 21,249 transcripts that were subsequently aligned to the male and female genomic reads using BlastN (Altschul et al. 1990); at a

100–99% identity threshold. We selected those transcripts showing 4–14 of averaged coverage of male genomic reads and zero averaged coverage of female genomic reads (supplementary table 3, Supplementary Material online). To establish Y gene identity, we searched NCBI GenBank (Reptile taxa only; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, last accessed May 25, 2020) with BlastN and BlastX for the closest homologs and identified transcripts that coded for 14 proteins (supplementary table 3, Supplementary Material online). BlastX searches also allowed the identification of CDS regions. For these 14 Y-linked protein-coding genes, we performed BlastN searches against the *de novo* reconstructed female transcriptome from *E. heatwolei* to find the X gametologs (best match over the entire sequence; 95–97% identity). We verified the X gametologs identity using coverage analyses of male and female genomic reads and GenBank searches (same gene identity as Y gametologs). XY gametologs in *E. heatwolei* were searched against the *A. carolinensis* and chicken genomes using the sequence search engine at the ENSEMBL webpage (<https://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>, last accessed May 25, 2020) to establish whether they formed a syntenic block. We validated the presence of a Y chromosome by PCR screenings using genomic DNA obtained from tails snips of seven males and seven females. Additional information can be found in the extended Materials and Methods section in the Supplementary Material online. We retrieved the Y-linked markers in *N. ocellatus* (Hill et al. 2018) and used BlastN (evalue < 0.01) to map these sequences onto the reconstructed *E. heatwolei* chromosomes and the *A. carolinensis* reference genome downloaded from the Ensembl database (<https://www.ensembl.org/>, last accessed May 25, 2020; v.97). More details in supplementary table 3, Supplementary Material online.

Genomic Coverage Analyses

We followed a methodology previously published (Vicoso et al. 2013). Briefly, the male and female genomic reads were assembled into contigs. The contigs were subsequently aligned and ordered based on the *A. carolinensis* reference genome. We used bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) to align the DNA-seq reads from the male and female *E. heatwolei* onto the reconstructed chromosomes. Coverage along the chromosomes was calculated using BEDtools (Quinlan and Hall 2010), bins of 100,000 nucleotides. Additional

information can be found in the extended Materials and Methods section in the [Supplementary Material online](#).

Data Collection

Full list of reptiles with known TSD system was obtained from the Tree of Sex database (Tree of Sex 2014) and literature searches. We searched the literature and dedicated databases for the duration and month intervals of the breeding seasons. We collected information for 101 species with TSD ([supplementary tables 1 and 2, Supplementary Material online](#)). Temperature data from the entire surface of the planet were downloaded from the Climatic Research Unit (http://catalogue.ceda.ac.uk/uuid/3df7562727314bab963282e6a0284_f24, last accessed May 25, 2020; version 3.24.01). Additional information can be found in the extended Materials and Methods section in the [Supplementary Material online](#).

Geographical Ranges

Shapefiles for 29 species were downloaded from the RedList database (<http://www.iucnredlist.org/>, last accessed May 25, 2020; version 3; [supplementary table 1, Supplementary Material online](#)). For 72 additional species ([supplementary table 2, Supplementary Material online](#)) we generated geographic ranges using the ecological niche modeling routines applying the maximum entropy algorithm in Maxent (Phillips et al. 2006) using the R package kuenm (Cobos et al. 2019). Additional information can be found in the extended Materials and Methods section in the [Supplementary Material online](#).

Mapping Climate Data to the Species Distribution

We matched the climate data with the species shapefiles using a dedicated R package built by Dr Anna Krystalli as part of the Newton Advanced Fellowship program (<https://github.com/annakrystalli/IUCNextractR>, last accessed May 25, 2020). We recovered the median temperature (ambient temperature) of all months comprised in the breeding season. Additional information can be found in the extended Materials and Methods section in the [Supplementary Material online](#).

Synonymous Substitution Analyses

To assess the age at which the XY system was originated in *E. heatwolei*, we followed a previous procedure (Cortez et al. 2014; Marin et al. 2017; Acosta et al. 2019). Briefly, we aligned using PRANK (Loytynoja and Goldman 2005) the coding sequences of XY gametologs in *E. heatwolei* and coding sequences of 1–1 orthologous in other reptiles, mammalian and *Xenopus* species downloaded from the Ensembl database (<https://www.ensembl.org/>, last accessed May 25, 2020; v.97). We obtained the species' tree from the

TimeTree database (<http://www.timetree.org/>, last accessed May 25, 2020). We concatenated the alignments and calculated synonymous substitution rates (ds) using codeml (Yang 1997) and a bootstrap approach. Branch lengths on the species' tree were used to obtain an ultrametric, time-calibrated, tree using the chronos library (ape package in R, v5.0) (Paradis and Schliep 2019). The age of the sex chromosomes was obtained from the calibrated branch lengths just before and after the split of the XY gametologs and the time since *E. heatwolei* diverged from the Snake–*Pogona*–*Anolis* lineage (divergence data retrieved from TimeTree; <http://www.timetree.org/>, last accessed May 25, 2020). We also calculated the age of the sex chromosomes using BEAST v1.10.4 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/>), which resulted in an age estimate of 93 Ma. We used the relaxed clock and calibrated the tree based on the reptile/mammalian divergence time. We ran the analyses two independent times for 100,000,000 generations, sampling every 1,000 generations. Additional information can be found in the extended Materials and Methods section in the [Supplementary Material online](#).

6.5 Supplementary Material

[Supplementary data](#) are available at Genome Biology and Evolution online.

6.6 Acknowledgments

This research was supported by a Frontiers in Science CONACYT grant (No. FC-2016/1682) and a Royal Society Newton Advanced Fellowship (No. NA160564) to D.C., T.S., and A.O.U.; an Australian Research Council (DP170101147) awarded to A.G.; a NKFIH-2558-1/2015 and ELVONAL-KKP 126949 to T.S.; a NERC grant (NE/P004121/1), a Royal Society Dorothy Hodgkin Research Fellowship (DH071902), and a CONACyT-AMC-Royal Society Newton mobility grant to A.O.U.; travel grants SEP-UNAM-FUNAM Programa de Capacitacion en Metodos de Investigacion/2016 to P.C.-P. and C.R.-S.; and a special grant from the Undergraduate Program on Genomic

Sciences—UNAM to P.C.-P. We thank the UNAM, the Australian Research Council, the University of Canberra, the University of Bath, CONACYT and the Royal Society for their support.

6.7 Author Contributions

D.C., A.O.U., T.S., and A.G. designed the study. D.S.B.D. and A.G. performed the fieldwork, tissue collection, DNA and RNA extractions, and PCR screenings. P.C.-P., D.S.B.D., A.L.N., M.L.M.P., A.A., and D.C. performed the analyses. C.R.-S. performed additional analyses. F.R.M.C. contributed to the analyses, discussion, and ecological data collection. All authors contributed to the interpretation of the results. A.O.U., A.G., T.S., and D.C. wrote the article. All authors read and approved the final article.

6.8 Literature Cited

- Acosta A, et al. 2019. Corytophanids replaced the pleurodont XY system with a new pair of XY chromosomes. *Genome Biol Evol.* 11(9):2666–2677.
- Akagi T, Henry IM, Tao R, Comai L. 2014. Plant genetics. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* 346(6209):646–650.
- AllsopDJ,WarnerDA,LangkildeT,DuW,ShineR.2006.Dooperationalsex ratios influence sex allocation in viviparous lizards with temperaturedependent sex determination? *J Evol Biol.* 19(4):1175–1182.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403–410.
- Bachtrog D, et al. 2014. Sex determination: why so many ways of doing it? *PLoS Biol.* 12(7):e1001899.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114–2120.
- Charnov EL, Bull J. 1977. When is sex environmentally determined? *Nature* 266(5605):828–830.
- Cobos ME, Peterson AT, Barve N, Osorio-Olvera L. 2019. kuenm: an R package for detailed development of ecological niche models using Maxent. *PeerJ* 7:e6281.
- Cogger HG. 2000. Reptiles and amphibians of Australia. 6th ed. Sidney: Reed New Holland.
- Cortez D, et al. 2014. Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. *Nature* 508(7497):488–493.
- Grabherr MG, et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNAseq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 29(7):644–652.
- Hill PL, Burrigge CP, Ezaz T, Wapstra E. 2018. Conservation of sex-linked markers among conspecific populations of a viviparous skink, *Niveoscincus ocellatus*, exhibiting genetic and temperaturedependent sex determination. *Genome Biol Evol.* 10(4):1079–1087.
- Holleley CE, et al. 2015. Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature* 523(7558):79–82.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods.* 12(4):357–360.
- Lambert SM, Wiens JJ. 2013. Evolution of viviparity: a phylogenetic test of the cold-climate hypothesis in phrynosomatid lizards. *Evolution* 67(9):2614–2630.
- Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 9(4):357–359.
- Loytynoja A, Goldman N. 2005. An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(30):10557–10562.
- Marin R, et al. 2017. Convergent origination of a *Drosophila*-like dosage compensation mechanism in a reptile lineage. *Genome Res.* 27(12):1974–1987.
- Marshall Graves JA, Peichel CL. 2010. Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options? *Genome Biol.* 11(4):205.
- O’Meally D, Ezaz T, Georges A, Sarre SD, Graves JA. 2012. Are some chromosomes particularly good at sex? Insights from amniotes. *Chromosome Res.* 20(1):7–19.

- Paradis E, Schliep K. 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35(3):526–528.
- Pen I, et al. 2010. Climate-driven population divergence in sex-determining systems. *Nature* 468(7322):436–438.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Model.* 190(3–4):231–259.
- Pyron RA, Burbrink FT. 2014. Early origin of viviparity and multiple reversions to oviparity in squamate reptiles. *Ecol Lett.* 17(1):13–21.
- Quinlan AR, Hall IM. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26(6):841–842.
- Quinn AE, et al. 2007. Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science* 316(5823):411–411.
- Radder RS, Quinn AE, Georges A, Sarre SD, Shine R. 2008. Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sexdetermining systems in a lizard. *Biol Lett.* 4(2):176–178.
- Robert KA, Thompson MB. 2001. Sex determination. Viviparous lizard selects sex of embryos. *Nature* 412(6848):698–699.
- Schwarzkopf L, Shine R. 1991. Thermal biology of reproduction in viviparous skinks, *Eulamprus tympanum*: why do gravid females bask more? *Oecologia* 88(4):562–569.
- Shine R. 1999. Why is sex determined by nest temperature in many reptiles? *Trends Ecol Evol.* 14(5):186–189.
- Shine R, Elphick MJ, Donnellan S. 2002. Co-occurrence of multiple, supposedly incompatible modes of sex determination in a lizard population. *Ecol Lett.* 5(4):486–489.
- Silva JV, Freitas MJ, Fardilha M. 2015. Phosphoprotein phosphatase 1 complexes in spermatogenesis. *Curr Mol Pharmacol.* 7(2):136–146.
- Sites JW, Reeder TW, Wiens JJ. 2011. Phylogenetic insights on evolutionary novelties in lizards and snakes: sex, birth, bodies, niches, and venom. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 42(1):227–244.
- Tree of Sex C. 2014. Tree of sex: a database of sexual systems. *Sci Data.* 1:140015.
- 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 Biol.* 11(8):e1001643.
- Yang Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci.* 13(5):555–556.

7. CAPÍTULO 3: CÁLCULO DE LA EDAD DE APARICIÓN DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES EN PLEURODONTES BASADO EN ANÁLISIS DEL SESGO DE MUTACIÓN MASCULINA

Artículo de investigación: Deciphering Ancestral Sex Chromosome Turnovers Based on Analysis of Male Mutation Bias. Armando Acosta, Mónica L Martínez-Pacheco, Karina Díaz-Barba, Niccole Porras, Mariana Gutiérrez-Mariscal, Diego Cortez. *Genome Biology and Evolution*, Volume 11, Issue 11, November 2019, Pages 3054–3067, <https://doi.org/10.1093/gbe/evz221>.

Resumen:

En los vertebrados, los cromosomas autosomales tienen tasas de sustitución similares, mientras que los cromosomas sexuales muestran tasas diferentes. Esto se debe a que después de la aparición del gen que determina el sexo, los cromosomas sexuales (el cromosoma X y el cromosoma Y) dejaron de recombinar entre sí en machos, pero los cromosomas X siguieron recombinando en hembras. Por otro lado, sabemos que existe una diferencia en las tasas de mutación por errores de replicación en la línea germinal masculina con respecto a la femenina. Es decir, mientras son necesarias dos divisiones celulares para obtener un óvulo maduro, se requieren más de 40 divisiones para obtener un espermatozoide maduro. Esta diferencia en el número de divisiones celulares hace que los machos transfieran mayor número de mutaciones a las siguientes generaciones. A este fenómeno se le conoce como sesgo de mutación masculina (*male mutation bias* o MMB, en inglés). Este sesgo afecta por igual a los autosomas, porque éstos pasan el mismo tiempo en machos y en hembras. Sin embargo, el cromosoma X pasa 2/3 partes de su tiempo en hembras y sólo 1/3 parte de su tiempo en machos. Por ende, el cromosoma X se ve menos afectado por el sesgo de mutación masculina y tiene una tasa de mutación más baja. Caso contrario le sucede al cromosoma Y, el cual pasa todo su tiempo en los machos y está sujeto a la máxima tasa de mutación. Nuestra hipótesis en este trabajo fue la siguiente: si un linaje tuvo un recambio de cromosomas sexuales en el pasado, es decir, si en el ancestro se perdió, por ejemplo, un sistema sexual del

tipo XY, entonces es posible que las secuencias que estuvieron en ese cromosoma X ancestral todavía muestren señales de una menor tasa de mutación, aunque en la actualidad ese cromosoma sea un autosoma. Este análisis es muy útil para saber si ciertos grupos compartieron cromosomas sexuales en el pasado. Se realizaron los análisis trabajando con tasas de sustitución sinónimas de secuencias ortólogas en mamíferos (como control positivo, ya que los monotremas nunca compartieron el sistema XY con placentarios y marsupiales) y para comprobar la hipótesis de que los acrodontes y pleurodontes compartieron un mismo sistema XY ancestral. Se crearon una serie de modelos donde se evolucionaron secuencias artificiales bajo diferentes niveles de sesgos de mutación masculina. Después, se compararon los datos de las simulaciones con los datos obtenidos de las secuencias de las especies. En el caso de los mamíferos, y en concordancia a estudios previos, se confirmó que los monotremas no compartieron el sistema XY con los mamíferos placentarios. En el caso de los reptiles, se observó que los pleurodontes sí compartieron el mismo sistema de determinación sexual con los acrodontes durante muchos millones de años, antes de que estos últimos transitaran -- por razones aún desconocidas-- a otros sistemas de determinación sexual.

Deciphering Ancestral Sex Chromosome Turnovers Based on Analysis of Male Mutation Bias

Armando Acosta^{1,†}, Monica L. Martínez-Pacheco^{1,†}, Karina Diaz-Barba¹, Niccole Porras¹, Mariana Gutierrez-Mariscal², and Diego Cortez^{1,*}

¹ Center for Genome Sciences, UNAM, Cuernavaca, Mexico

² Biotechnology Institute, UNAM, Cuernavaca, Mexico

† These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: E-mail: dcortez@ccg.unam.mx.

Accepted: October 5, 2019

Data deposition: This project has been deposited at NCBI-SRA database (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra; last accessed October 16, 2019) under the accession BioProject PRJNA490698; RNAseq data for a female green iguana (*Iguana iguana*) and a female leopard-lizard (*Gambelia wislizenii*). Genomic sequences for a male *Anolis carolinensis* and a male Fiji-banded iguana (*Brachylophus fasciatus*) are available on the NCBI-SRA database, BioProject accession number PRJNA381064 (Marin et al. 2017). RNA-seq data for *Ctenophorus decresii*, *Phrynocephalus vlangalii*, *Deinagkistrodon acutus*, *Echis coloratus*, *Pantherophis guttatus*, and *Opheodrys aestivus* are available on the NCBI-SRA database, accession numbers PRJNA478483, PRJNA248542, PRJNA314559, and SRR1287707–SRR1287715, respectively (Hargreaves et al. 2014; Yang et al. 2014; Yin et al. 2016). RNA-seq data for *Thamnophis elegans* are available on the Reptilian Transcriptomes v2.0 database (Tzika et al. 2015). CDS sequences for *Anolis*, human, mouse, elephant, opossum, platypus, chicken, Chinese soft-shell turtle, and *Xenopus* are available on the ENSEMBL database (www.ensembl.org; last accessed October 16, 2019). CDS sequences for *Pogona vitticeps* are available on the Pogona Genome Project (Georges et al. 2015). Supplementary table 2, Supplementary Material online, summarizes the data used in this study.

7.1 Abstract

The age of sex chromosomes is commonly estimated by comparing the substitution rates of XY gametologs. Coupled with phylogenetic reconstructions, one can refine the estimate of the origin of a sex chromosome system relative to specific speciation events. However, these approaches are insufficient to determine the presence and duration of ancestral sex chromosome systems that were lost in some species. In this study, we worked with genomic and transcriptomic data from mammals and squamates, and analyzed the effect of male mutation bias on X-linked sequences in these groups. We searched for signatures indicating whether monotremes shared the same sex chromosomes with placental mammals or whether pleurodonts and acrodonts had a common ancestral sex chromosome system. Our analyses indicate that platypus did not share the XY chromosomes with placental mammals, in agreement with previous work. In contrast, analyses of agamids showed that this lineage maintained the pleurodont XY chromosomes for several million years. We performed multiple

simulations using different strengths of male mutation bias to confirm the results. Overall, our work shows that variations in substitution rates due to male mutation bias could be applied to uncover signatures of ancestral sex chromosome systems.

Key words: synonymous substitution rates, sex chromosomes, sex chromosome system turnovers, male mutation bias.

7.2 Introduction

Current evolutionary models recognize that sex chromosomes evolved from a pair of autosomes, following the emergence of a sex-determining gene and the arrest of homologous recombination around this locus (Bachtrog 2013). The synonymous substitution rates of XY (or ZW) gametologs, together with specific speciation events, are used to trace the origin of sex chromosomes. A previous study applied this approach to date the origin of sex chromosomes in therian and monotreme mammals (Cortez et al. 2014). The XY chromosomes in placental mammals and the Y_5X_5 sex chromosomes in monotremes originated 181–175 Ma. However, another study (Lahn and Page 1999) suggested that the therian XY chromosomes originated 300 Ma, and thus, monotremes might have maintained the placental sex chromosomes for a period of time before their split from placental mammals (167–192 Ma; data retrieved from Timetree database; [http://www. timetree.org/](http://www.timetree.org/); last accessed October 16, 2019) and the origin of the current Y_5X_5 chromosomes.

Contrary to mammals, reptiles show both old and recent sex chromosomes (Tree of Sex 2014; Gamble et al. 2015; Sabath et al. 2016; Pennell et al. 2018). For example, pleurodonts, anguimorpha, and many snakes have conserved their sex chromosomes for >100 Myr (Marin et al. 2017; Altmanova et al. 2018; Augstenova et al. 2018; Rovatsos et al. 2019), whereas boas and chameleons exhibit recently acquired sex chromosomes (<50 Myr old) (Rovatsos et al. 2015; Gamble et al. 2017; Augstenova et al. 2018). Furthermore, transitions between sex determination systems show a higher frequency in reptiles compared to mammals, birds, and amphibians (Pennell et al. 2018).

Additionally, a recent study dated the XY chromosome system in the green anole, *Anolis carolinensis*, which originated 170–160 Ma (Marin et al. 2017). The sex chromosomes arose around the time pleurodents and acrodents diverged (Zheng and Wiens 2016). In the pleurodont clade (i.e., iguanas, anoles, spiny lizards, etc.) most species share the same pair of XY chromosomes (Rovatsos, Pokorna et al. 2014; Altmanova et al. 2018). Moreover, ancestral state reconstructions of squamate sex determination systems indicate that the sex determination system in the ancestor of pleurodents and acrodents (i.e., agamids and chameleons) was probably temperature-dependent (Gamble et al. 2015). However, phylogenetic analyses of the oldest XY gametologs from two pleurodont species, *A. carolinensis* and the Fiji-banded iguana (*Brachylophus fasciatus*), showed that the XY chromosomes could have originated prior to the divergence of pleurodents and acrodents (Marin et al. 2017). This result is relevant, since extant species of agamids and chameleons show either a great variety of sex chromosomes or thermally induced sex-biased offspring (Tree of Sex 2014). These results suggest that acrodents may have undergone an ancestral sex determination system turnover that consisted in the loss of the pleurodont XY chromosomes (fig. 1). Pleurodents and acrodents offer a unique opportunity to test methods to estimate the age of ancestral sex chromosomal losses, which, for the moment, can only be indirectly inferred using phylogenetic-based analyses.

In species with XY chromosomes, sex-linked sequences have distinctive mutation rates compared to autosomal sequences (Wilson Sayres and Makova 2011). In numerous vertebrates, male gametes go through a higher number of replication cycles than female gametes, leading to a male-biased mutation rate linked to replication errors. This phenomenon is known as male mutation bias (MMB) and its strength is reflected in the values taken by α ; α is defined as the ratio of male to female mutation rate. Hence, when MMB is present in a given lineage, α values are >1 (Drost and Lee 1995; Hurst and Ellegren 1998; Makova and Li 2002). MMB was first described in rodents and primates (Wolfe and Sharp 1993; McVean and Hurst 1997; Makova and Li 2002; Sandstedt and Tucker 2005; Venn et al. 2014) and later observed in most mammals (Wilson Sayres et al.

2011; Link et al. 2017), birds (Bartosch-Harlid et al. 2003), snakes (Vicoso et al. 2013), and fish (Ellegren and Fridolfsson 2003).

When MMB is present ($\alpha > 1$), the male-specific Y chromosome is expected to be the fastest evolving chromosome, followed by the autosomes, which spend half their time in males and a half in females. Finally, the X chromosome, which spends only one-third of its time in males is expected to be the slowest evolving chromosome (Wilson Sayres and Makova 2011). In species with ZW chromosomes, the expected pattern is that Z-linked sequences would evolve faster than W-linked and autosomal sequences (Wilson Sayres and Makova 2011). The strength of α is relative to the general mutation rate in the germ-line and the generation time of the species (Amster and Sella 2016). MMB has a larger effect in species with extended lifespans and late sexual maturity such as primates (Amster and Sella 2016). Nevertheless, in theory, one could use the effect of MMB on the mutation rates of ancient sex-linked sequences and exploit this information to trace ancestral sex chromosomal losses.

In this study, we show that the analysis of MMB is useful to find signatures of ancestral sex chromosomes. We tested our approach under two scenarios. We first hypothesized that monotreme mammals (platypus) shared the XY chromosomes with placental mammals for a period of time (fig. 1a). We then tested a second hypothesis in which agamids maintained the pleurodont XY chromosomes for a number of million years (fig. 1b). In this second hypothesis, we specifically tested whether hypothetical former X-linked sequences in three agamid species (*Pogona vitticeps*, *Ctenophorus decresii*, and *Phrynocephalus vlangualii*) showed traces of MMB. Presently, these three agamid species appear to harbor three different sex determination systems: *P. vitticeps* shows ZW microsex chromosomes (Ezaz et al. 2005) as well as thermally induced sex reversal (Li et al. 2016), *C. decresii* shows temperature-dependent sex determination (Harlow 2000) and finally, *Phr. vlangualii* has differentiated ZW chromosomes (Zeng et al. 1997).

In both hypotheses (fig. 1a and b), when the ancestral XY chromosomes were replaced by a new sex chromosomal system, the Y chromosome disappeared from the population, whereas the X chromosome was restored as an autosome (fig. 1a and b). However, owing to MMB, the mutation rate on former X-linked

sequences in agamids and monotremes decreased during the time these species conserved the ancestral XY chromosome system (fig. 1a and b). In contrast, X-linked sequences in pleurodonts and therians have been differentially affected by MMB since the origin of the XY chromosome system, whereas orthologous sequences from outgroup species should not show traces of MMB (fig. 1a and b).

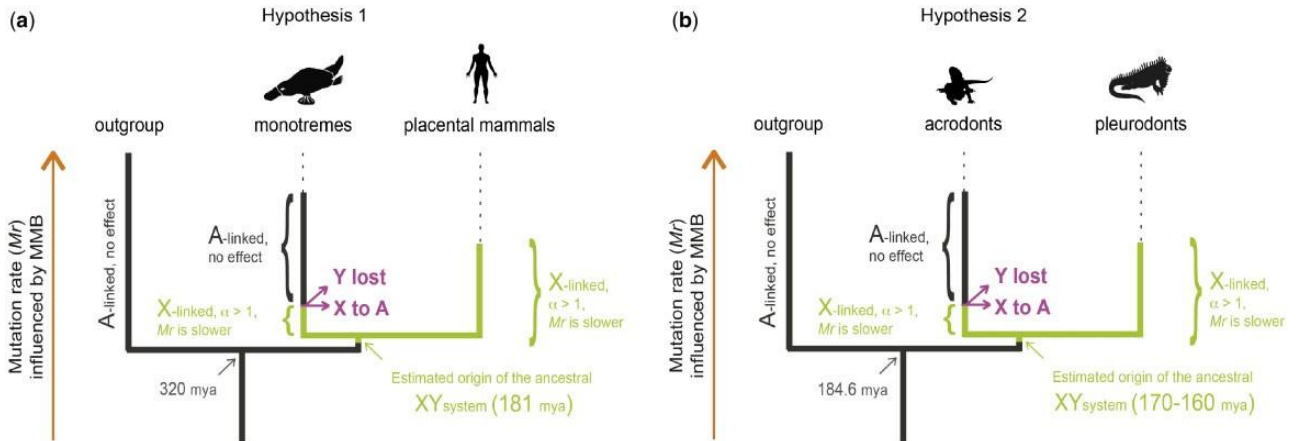


FIG. 1. The hypotheses tested in the study. (a) In the first hypothesis, the XY chromosomes present in placental mammals were shared by monotremes during an unknown amount of time before they were replaced by the current X_5 – Y_5 chromosomes (Ezaz et al. 2005). (b) In the second hypothesis, acrodonts and pleurodonts shared the same XY chromosomes during an unknown amount of time before they were replaced in acrodonts by other sex determination systems. In both hypotheses, synonymous substitution rates of X-linked sequences were differentially affected by male mutation bias, whereas synonymous substitution rates of orthologous sequences in outgroup species, located on autosomes (A-linked), were not differentially affected by male mutation bias. In platypus and acrodonts, synonymous substitution rates of former X-linked sequences were only differentially affected by male mutation bias during the time they remained X-linked. Once the ancestral XY chromosome systems were lost, the X chromosomes became autosomes and their synonymous substitution rates were no longer differentially affected by male mutation bias.

We found that platypus does not show signatures of sharing the sex chromosomes with placental mammals. Furthermore, we found that pleurodont species probably exhibit a strong MMB ($\alpha = 6$). Consistently, former X-linked sequences in three agamid species showed substitution rates that are higher than the substitution rates from three pleurodont species but lower than the substitution rates from five snake species. These observations suggest that

agamids conserved the ancestral XY chromosome system for several million years. Numerous simulations confirmed the results and helped establish that the *Pogona/Ctenophorus* and *Phrynocephalus* lineages conserved the ancestral XY chromosomes for 110–160 and 80–100 Myr, respectively. Our method will surely be refined as we learn more about the germ-line mutation rates in pleurodonts and we obtain more accurate α values.

7.3 Materials and Methods

Data Collection

Mammalian species were selected based on two criteria: having the maximum number of one-to-one orthologous genes to the human X genes and defined male mutation bias. The threshold was set to 144 one-to-one orthologous genes. CDS sequences for human, rat, mouse, rabbit, dolphin, dog, elephant, and armadillo, as well as CDS sequences from outgroup species, opossum, platypus, chicken, Chinese softshell turtle, and *Xenopus*, were obtained from the ENSEMBL database (release 90; www.ensembl.org; last accessed October 16, 2019).

For reptiles, our aim was to analyze the potential sex chromosome transition in acrodonts. We searched in public databases for genomic and transcriptomic data for acrodont species and their sister groups: pleurodonts, anguimorpha, and snakes. The species were selected based on the maximum number of X-linked genes (and orthologous sequences) with complete or almost complete CDS. The threshold was set to 77 one-to-one orthologous genes. Lack of pleurodont species with sufficient genomic or transcriptomic data, besides *A. carolinensis*, persuaded us to produce dedicated data for the study.

We generated strand-specific RNA-seq libraries (using the Illumina TruSeq Stranded mRNA Library protocol) for five tissues (brain, heart, liver, kidney, and ovaries) from a female green iguana (*Iguana iguana*) and five tissues (brain, heart, liver, kidney, and ovaries) from a female leopard-lizard (*Gambelia wislizenii*); BioProject accession number PRJNA490698. Both individuals were sacrificed using a lethal dose of pentobarbital; this study met legal regulations

and institutional procedures for the investigation of the University of Mexico. The project was reviewed and approved by the Ethical Committee of the University (approval project No. 369).

RNA quality was assessed using a Fragment Analyzer machine from Advanced Analytical. Each library was sequenced on Illumina HiSeq 2000 platform at the Massive Sequencing Unity of the University of Mexico (UNAM). At least 17 million sequencing reads (100-nt, paired-end) were produced for each library. The female green iguana and the female leopard-lizard were bought from authorized pet shops.

We downloaded the complete chromosomal sequences and coding sequences (CDS) from the reference genomes of *A. carolinensis* available on the ENSEMBL database (release 90; www.ensembl.org; last accessed October 16, 2019). We downloaded the CDS sequences for *P. vitticeps* from the Pogona Genome Project (Georges et al. 2015). Similarly, we downloaded from the SRA database (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra; last accessed October 16, 2019) RNA-seq data for *C. decresii*, *Phr. vlangualii* (Yang et al. 2014), *Deinagkistrodon acutus* (Yin et al. 2016), and *Echis coloratus*, *Pantherophis guttatus*, and *Opheodrys aestivus* (Hargreaves et al. 2014). RNA-seq data for *Thamnophis elegans* were downloaded from the Reptilian Transcriptomes v2.0 database (Tzika et al. 2015).

Transcriptomic sequences were produced using an Illumina Hiseq 2000 or Hiseq 2500 machines and showed a minimum of 20 million reads of 100nt long. Additionally, we collected the genomic sequences for a male *A. carolinensis* and a male Fiji-banded iguana (*B. fasciatus*) from ref. (Marin et al. 2017). Libraries were DNA-seq, sequenced on Illumina HiSeq 2500 sequencers (100-nt paired-end reads).

Assessing Chromosomal Substitution Rates at X-, Y-Linked, and Autosomal Intronic Sequences from *A. carolinensis* and *B. fasciatus*

We estimated X-linked, Y-linked, and autosomal substitution rates as proxies of mutation rates. We worked with intronic sequences from the green anole, *A. carolinensis*, and the Fijibanded iguana (*B. fasciatus*). We applied an approach

we had previously used in mammals (Link et al. 2017) where we compared aligned sequences between two species to calculate the chromosomal substitution rates. Briefly, we assembled the genomic raw reads from the Fiji-banded iguana into scaffolds with SOAP-de novo (Luo et al. 2012) (kmer = 31). We selected all scaffolds in the *A. carolinensis* reference genome and Fiji-banded iguana assemblies that mapped using BlastN (Altschul et al. 1990) to known Y- and X-linked genes in *A. carolinensis*; others and us have previously identified the Y-linked genes (Marin et al. 2017) and X-linked genes in this species (Alfoldi et al. 2011; Rovatsos, Altmanova et al. 2014; Marin et al. 2017).

To limit the risk of including nonorthologous positions in the alignments, we considered only the intronic sequences that were located in the same scaffolds as conserved one-to-one orthologous exons in *A. carolinensis* and the Fiji-banded iguana. Then, we used Lagan20 (Brudno et al. 2003), an alignment program designed to work on noncoding sequences, to align the concatenated exonic and intronic sequences from *A. carolinensis* and the Fiji-banded iguana. We then removed ambiguous positions using Gblocks (Talavera and Castresana 2007) and excluded the first intron of all genes from the alignments because these introns often contain various regulatory elements (Chamary and Hurst 2004). We further removed potentially hidden exons from the alignments and the first 20 intronic nucleotides flanking the exons in order to remove regulatory sites such as splicing sites and splicing enhancers (Pink and Hurst 2010). We also removed all detectable C_pG sites from our alignments, because C_pG sites could cloud the effect of male mutation bias (Taylor et al. 2006).

Finally, only those genes showing intronic alignments >1,000bp were considered for the analyses, since shorter sequences could produce more extreme values. In order to minimize uncertainties in the substitution rate estimates of X- and Y-linked sequences, we applied a nonparametric double bootstrap approach (Axelsson et al. 2004), which bootstraps the intronic alignments by both introns and sites. We repeated this procedure 1,000 times, and for each new alignment, we calculated the substitution rate using the Tamura–Nei model with the baseml program, implemented in the PAML44 package (Yang 1997).

The α value for pleurodonts species was calculated using the median values of X, Y, and autosomal substitution rates and Miyata's three equations (Miyata et al. 1987): 1) $\alpha (Y/X) = 2/[(3X/Y)^1]$, 2) $\alpha (Y/A) = 1/[(2A/Y)^1]$, and 3) $\alpha (X/A) = [4(3X/A)]/[(3X/A)^2]$.

Assessing Chromosomal Synonymous Substitution Rates at X-Linked and One-to-One Orthologous Genes

We downloaded from the ENSEMBL database (release 90; www.ensembl.org; last accessed October 16, 2019) the lists of one-to-one orthologous genes across *A. carolinensis*, human, mouse, elephant, opossum, platypus, chicken, the Chinese soft-shell turtle, and *Xenopus*, and selected only the orthologous genes to the X-linked genes in *A. carolinensis* (Xlinked genes found in [Marin et al. 2017](#)). RNA-seq reads for five snakes (*D. acutus*, *E. coloratus*, *Pantherophis guttatus*, *O. aestivus*, and *T. elegans*), three agamids (*P. vitticeps*, *C. decresii*, and *Phr. vlangalii*) and two pleurodonts (*I. iguana* and *G. wislizenii*) were assembled using Trinity (v2.0.2) ([Grabherr et al. 2011](#)) and one-to-one orthologous sequences to the *A. carolinensis* X-linked genes were identified using best-bidirectional BlastN ([Altschul et al. 1990](#)) searches.

X genes from different strata have the potential to affect the substitution rates since genes found in younger strata or in the pseudoautosomal regions should show a similar mode of inheritance to the autosomes. Therefore, we focused the analyses on genes located on scaffolds of the X chromosome that in *A. carolinensis* exhibit only one copy in males (data taken from [Alfoldi et al. 2011](#); [Rovatsos, Altmanova et al. 2014](#); [Marin et al. 2017](#)).

Although detailed information about chromosomal strata or pseudoautosomal regions on the X chromosome of pleurodonts is not known, the Y chromosomes in this group has highly degenerated since it conserves only 2% of its original gene content ([Marin et al. 2017](#)), and analyses of various X-linked genes in many families of pleurodonts consistently show amplifications corresponding to a single copy in males ([Rovatsos, Pokorna et al. 2014](#); [Altmanova et al. 2018](#)); except for corytophanids. The information available, therefore, suggests that the majority of X-linked genes in pleurodonts have likely not recombined with the Y chromosomes for >110 Myr (estimated divergence time between the two studied

species: *A. carolinensis* and *B. fasciatus*), and most likely, many of them stopped recombination when the sex chromosomes originated 170–160 Ma (Marin et al. 2017).

Next, we built codon-based concatenated and individual alignments using PRANK (Loytynoja and Goldman 2005) for the 77 X-linked genes in *A. carolinensis* with one-to-one orthologous sequences in all other 17 species of amniotes (supplementary table 1, Supplementary Material online). We then performed a bootstrapping approach by sampling random codons from the concatenated alignment until we obtained the same number of sites as in the original concatenate. We repeated this procedure 100 times, and for each new concatenated alignment, we calculated a d_S tree using the codeml program, implemented in the PAML44 package (Yang 1997). This bootstrap approach was used to reduce potential biases introduced by individual genes and/or positions. We obtained a consensus d_S tree by taking the median values for each branch from the 100 individual (bootstrapped) d_S trees. We repeated this procedure 100 times for autosomal genes in *A. carolinensis* and their one-to-one orthologous sequences in the other 17 species of amniotes. For each round, we randomly selected 77 autosomal genes from the reference genome, aligned the nucleotide sequences of the selected genes, and constructed a d_S tree. In order to obtain comparable estimates for snakes, agamids, and pleurodents, we added all branch lengths from the individual species' branch length until the ancestral branch length corresponding to the ancestor of snakes or the ancestor of agamids/pleurodents; thus, each species' estimate would be composed of d_S values representing the same amount of time (from the last common ancestor of snakes/pleurodents until the present).

Next, in order to correct for potential biases introduced by fast or slow evolving groups, we corrected the X-linked synonymous substitution rates using averaged autosomal synonymous substitution rates, which served as proxies of the overall genomic mutation rate in each lineage. We worked with the d_S tree's branch lengths as proxies of synonymous substitution rates. So, for snakes, agamids, and pleurodents, we used the added branch lengths (from the last common ancestor of snakes/pleurodents until the branches of the individual species) of the autosomal consensus tree to calculate the differences across median values of

squamates species. We used the differences across the species' individual medians and the average value of all species from the autosomal consensus ds tree in order to correct the branch lengths for pleurodents, agamids, and snakes in the X-linked consensus tree. For example, if a given lineage presented a long branch in the autosomal consensus ds tree (i.e., a lineage with high substitution rate), the difference with the average value of all species in the autosomal consensus ds tree would result in a large positive number and, therefore, we would reduce the species' branch length in the X-linked tree by a larger value.

On the other hand, if a given lineage presented a particularly short branch in the autosomal consensus ds tree (i.e., a lineage with low substitution rate), the difference with the average value of all species in the autosomal consensus ds tree would result in large negative number and, therefore, we would increase the species' branch length in the X-linked tree by a larger value. We only corrected the branches of snakes, agamid, and pleurodents.

In order to further reduce the uncertainties within groups, we averaged the estimates of snakes and pleurodents, separately. We repeated the autosomal-based correction using 100 random sets of autosomal sequences as a substitute for the X-linked sequences. We reckon that the complete gene set of the ZW chromosomes in *Pogona* and *Phrynocephalus* is not known and some genes we considered as autosomal could be sex-linked in these species. However, we expect that the average signal from hundreds of randomly selected genes will reflect the average autosomal rate rather than a rate from a minority of sex-linked genes. Moreover, since chromosome 6 from *A. carolinensis* is orthologous to the Z chromosome in snakes (Vicoso et al. 2013) genes from this chromosome were avoided in the analyses.

We downloaded from the ENSEMBL database (release 90; www.ensembl.org; last accessed October 16, 2019) the lists of one-to-one orthologous genes across human, rat, rabbit, dolphin, dog, elephant, armadillo, platypus, chicken, *A. carolinensis*, and *Xenopus*, and selected only the orthologous genes to the X-linked genes in human. For all selected species MMB was previously estimated (Wilson Sayres et al. 2011). We worked with 114 X-linked genes in human that are one-to-one orthologous in all other amniote species (supplementary table 1, Supplementary Material online). We reconstructed both the individual ds trees for

the 114 X-linked genes and the concatenated ds tree. We worked with the oldest genes on the X chromosome. That is, X-linked genes from the oldest strata (X-conserved region; Pandey et al. 2013) were considered for the analyses. Most of these genes stopped recombination with the Y chromosome 180 Ma when the sex chromosomes originated (Cortez et al. 2014). We built codon-based alignments using PRANK (Loytynoja and Goldman 2005) and performed the individual and bootstrapped sampling of random codons from the concatenated alignment 100 times using the codeml program, implemented in the PAML44 package (Yang 1997). We also selected random subsets of 104 autosomal genes to obtain the overall genomic substitution rates in order to perform the substitution rate correction (see above) to prevent potential biases introduced by fast or slow evolving groups.

Simulations

We generated random sequences of 3,000 nucleotides-long and evolved these sequences following the species' tree using GenSeq (version 1.3.4) (Rambaut and Grassly 1997). We used the same species used in the previous ds-based analyses. The species' tree was downloaded from the Timetree database (<http://www.timetree.org/>; last accessed October 16, 2019). The squamate tree was reshaped based on ref. (Zheng and Wiens 2016). We transformed the resulting branch lengths (representing millions of years) to substitution rates using a value of $2.22e-09$ mutations per million years, which is an averaged substitution rate derived from a wide number of mammalian genomes (Kumar and Subramanian 2002); a similar estimate is not yet available for pleurodonts; we considered the mammalian substitution rate as a proxy of the amniote substitution rate. We reckon that mutation rates may be affected by different variables such as extended generation times and late sexual maturity. Generation times among the selected reptiles, except for *A. carolinensis* that has a generation time of 1 year, are similar: 2–3.5 years in agamids and pleurodonts, and 3–4 years in snakes. We modeled nucleotide evolution under 16 scenarios. Under the first scenario, the null hypothesis, agamids never had the XY chromosomes, their branches were not affected by MMB and their lengths were equivalent to those from snakes. In this null scenario, sequences from snakes and agamids were evolving at a rate of $2.22e-09$ mutations per million years.

Then, we modeled nucleotide evolution under 15 alternative scenarios under four different strengths of α , 1.8 (α reported in snakes; Vicoso et al. 2013), 2.4 (α in most mammals 2.46 0.26 95% CI—Wilson Sayres et al. 2011; Link et al. 2017 and birds 2.476 0.2 95% CI—BartoschHarlid et al. 2003), 4, and 6 (values of α reported for primates; Makova and Li 2002; Venn et al. 2014 and pleurodonts; this study). GenSeq (Rambaut and Grassly 1997) uses two different models (GTR and HKY) and, based on the branch lengths, it applies a particular substitution rate. Thus, by modifying the branch lengths, we were able to simulate the effect of MMB.

For each of the 15 alternative scenarios, we gradually shortened the branch lengths in the agamid clade (or in specific branches) by 0.00683, 0.0091, 0.0151, and 0.0227, which represented the substitution rates occurring over a period of 10 Myr under α values of 18, 2.4, 4, and 6, respectively. The higher the strength of MMB, the more rapidly the branch lengths will be reduced. In other words, by shortening the branch lengths of agamids by the indicated values, the species in this lineage were no longer evolving at a rate of 2.22×10^{-9} mutations per million years for 170 Myr (approximate age of the sex chromosomes), and the differences in lengths were equivalent to the substitution rate owing to MMB during the amount of time the sequences were X-linked.

GenSeq (Rambaut and Grassly 1997) is a high-speed program and it can be run with multiple processes in parallel. We repeated the process with 100 different randomly generated nucleotide sequences for each simulation. During the simulations, snake sequences were not differentially affected by MMB, whereas pleurodont sequences were always affected by $\alpha = 6$. Finally, for each set of evolved sequences, we calculated a ds tree using the codeml program, implemented in the PAML44 package (Yang 1997).

For placental mammals, we performed simulations as described above with few changes. The species' tree was downloaded from the Timetree database (<http://www.timetree.org/>; last accessed October 16, 2019). We transformed the resulting branch lengths (representing millions of years) to substitution rates using a value of 2.22×10^{-9} mutations per million years, which is an averaged substitution rate derived from a wide number of mammalian genomes (Kumar and Subramanian 2002). Prior to the simulations, we modified the branch lengths on

the tree to simulate the effect of MMB in placental mammals reported in ref. (Wilson Sayres et al. 2011). That is, we shortened the branch lengths in the placental clade by 0.122 when $\alpha = 1.6-2$ (rat, dog, and armadillo); by 0.198 when $\alpha = 2.9-3.3$ (rabbit and elephant); by 0.27 when $\alpha = 3.9-4$ (dolphin); by 0.39 when $\alpha > 6$ (human). The internal nodes were modified following the tree structure and averaging the α values of the tips or the previous branches.

We modeled nucleotide evolution under 18 scenarios. Under the first scenario, the null hypothesis, platypus never had the placental XY chromosomes and its branch was not affected by MMB and the length was equivalent to those from the outgroup species. Then, we modeled nucleotide evolution under 17 alternative scenarios; two additional scenarios compared to reptiles since the placental sex chromosomes are 10–20 Myr older than the sex chromosomes in pleurodonts/acrodonts (Cortez et al. 2014; Marin et al. 2017). In these alternative scenarios, we considered that platypus shared the placental XY chromosomes for increasing periods of time. Thus, platypus' branch was shortened by 0.0113 every 10 Myr based on the averaged α value of 2.9 reported in ref. (Link et al. 2017) for monotreme mammals. Finally, we ran 100 times each hypothesis using a different set of randomly generated sequences and every time we calculated a ds tree using the codeml program, implemented in the PAML44 package (Yang 1997).

The values plotted in figures 2, 6, and 5, and [supplementary figures 1 and 2, Supplementary Material](#) online, were taken from the ds trees. All simulations were run using balanced compositions of nucleotides due to the specificities of GenSeq (Rambaut and Grassly 1997). Therefore, when plotting the data we adjusted the scale of the simulated data to match the scale of the observed data to account for changes in GC content in the species' sequences.

Statistical Analyses and Graphics

Statistical tests were performed using the R package, standard libraries. Data were plotted using the R package, "ggplot2" library.

7.4 Results

Monotreme Mammals Did Not Share the Same XY Chromosome System with Placental Mammals

We assessed the evolution at neutral sites using branch specific rates of synonymous substitutions (d_s trees) from 114 genes that are X-linked in placental mammals but are autosomal in platypus and outgroup species. We generated 100 bootstrapped d_s trees based on the concatenated alignment of the 114 X-linked genes and one-to-one orthologous sequences in platypus and outgroup species. To correct for potential biases introduced by fast or slow evolving lineages, we corrected the X-linked substitution rates using autosomal substitution rates (see Materials and Methods), which can be used as proxies of the overall genomic mutation rate in each lineage. Figure 2a summarizes the autosomal-corrected X linked substitution rates. We observed that platypus and the outgroup species showed similar values significantly higher compared to the substitution rates exhibited by placental mammals.

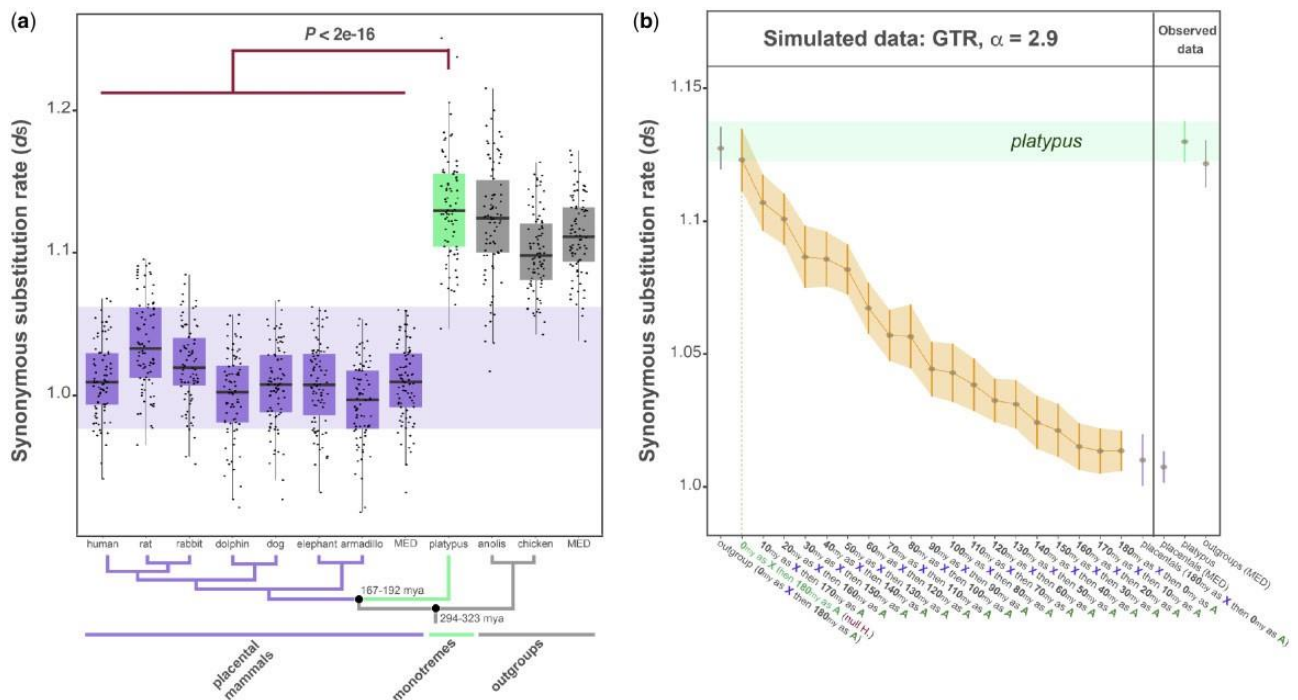


FIG. 2. Synonymous substitution rates of X-linked genes in placental mammals and orthologous genes in platypus and outgroup species. (a) Boxplots of autosomal-corrected synonymous substitution rates of X-linked sequences in placental mammals and orthologous sequences in platypus and outgroup species obtained from the concatenated alignment of 114 genes analyzed by 100 bootstrap rounds (see Materials and Methods). MED indicates

the median value within placental or outgroup species. The shaded purple area marks values covered by placental mammals. Benjamini–Hochberg-corrected P values, Welch two sample t-tests. Error bars, maximum and minimum values, excluding outliers. Black dots represent the values from 100 bootstrap rounds. The species tree specifies the relationships among the analyzed species. (b) Platypus sequences were simulated as X-linked for different amounts of time and under $\alpha = 2.9$ (see Materials and Methods). In the first scenario (the null hypotheses; red label), platypus sequences were modeled as X-linked sequences for 0 Myr and then modeled as autosomal sequences for 180 Myr. In the 17 alternative scenarios, platypus sequences were modeled as X-linked sequences for an increasing number of millions of years (by steps of 10 Myr) and then modeled as autosomal sequences for a decreasing number of millions of years (by steps of 10 Myr). Outgroup sequences were evolved in the absence of male mutation bias, whereas placental sequences were always evolved under specific α values (see Materials and Methods). MED indicates the median value within placental or outgroup species. Error bars indicate the Welch's 95% confident intervals and the brown dots represent the mean values from 100 simulations. The shaded orange area highlights the pattern followed by the simulated data. The potential ages when the XY chromosome system loss would occur is given by the overlap between the observed and the simulated data (green horizontal bar). The overlap is also highlighted by the green dotted vertical line and the colored label on the x axis (light green).

Finally, we ran simulations (see Materials and Methods) using a set of randomly generated sequences, the GTR substitution model, following the species' tree, and using the known (Wilson Sayres et al. 2011; Link et al. 2017) male mutation bias intensities (α values) for each group. Each simulation tested a specific scenario in which platypus maintained the placental sex chromosomes for an increasing number of million years. We then compared the simulated and the observed data (from fig. 2b). We found that the observed data overlapped the simulated data only when the tested scenario specified that platypus never shared the placental XY chromosome system (fig. 2c). These results strongly indicate that platypus most likely did not share the sex chromosomes present in placental mammals.

Male Mutation Bias in the Green Anole and the Fiji-Banded Iguana

In order to apply the same approach in squamates, we first needed to determine whether these species presented male mutation bias. Therefore, we analyzed the

substitution rates at neutral sites of intronic sequences from X-linked, Y-linked, and autosomal genes between two pleurodont species, *A. carolinensis* and the Fiji-banded iguana (*B. fasciatus*), and found that Y-linked sequences have evolved faster than both the X-linked and autosomal sequences (Welch two sample t-test, $P < 2e-16$; fig. 3). The observed pattern is consistent with the presence of MMB (Link et al. 2017) in squamates. We applied Miyata's equations (Miyata et al. 1987) to the median values of X, Y, and autosomal substitution rates and calculated the strength of MMB (α) in pleurodonts. We obtained an α value of 6 (95% confident intervals: 5.7–7) for the Y/X comparison, an α value of 5 (95% confident intervals: 3.2–7) for the X/A comparison, and an α value of 7.5 (95% confident intervals: 7–11) for the Y/A comparison, corresponding to a strong MMB in pleurodonts. The α values are similar and the confident intervals overlap in the three comparisons, which is consistent with MMB being the primary force shaping the chromosomal substitution rates (Link et al. 2017) in these species.

Substitution Rates in X-Linked Sequences in Pleurodonts and Orthologous Genes in Agamids and Snakes

We estimated the substitution rates at neutral sites across distant taxa by building ds trees with the coding sequences of X-linked genes in pleurodonts and one-to-one orthologous sequences in agamids, snakes, and other amniote species (see Materials and Methods). We produced 100 individual bootstrapping ds trees based on the concatenated alignment of the 77 X-linked genes and one-to-one orthologous sequences in other species. We corrected the X-linked substitution rates using autosomal substitution rates to reduce the effect of fast or slow evolving lineages. The results indicated that the snake orthologous sequences (i.e., sequences that were not X-linked) have evolved faster than the sequences from pleurodonts (i.e., sequences that have been X-linked for 170–160 Myr; Benjamini–Hochberg corrected $P < 0.001$, Welch two sample t-test; fig. 4a and b). Importantly, the sequences from the three species of agamids (*P. vitticeps*, *C. decresii*, and *Phr. vlangalii*) showed branch lengths that were significantly larger than those from pleurodonts, but significantly shorter than those from snakes (Benjamini–Hochberg corrected $P < 0.001$, Welch two sample t-test; fig. 4a and b). We could not find significant differences when random subsets of autosomal genes were taken as a substitute for the X-linked genes (Benjamini–Hochberg

corrected $P > 0.05$, Welch two sample t-test; fig. 4c). These results were consistent with the presence of male mutation bias in agamids and strongly supported the hypothesis that agamids shared the XY chromosome system with pleurodents during a number of million years. Lastly, the clear differences in substitution rates between *P. vitticeps*/*C. decresii* and *Phr. vlangualii* could indicate that the XY chromosome system was conserved longer in the *Pogona*/*Ctenophorus* lineage or, alternatively, that the *Pogona*/*Ctenophorus* and *Phrynocephalus* lineages experienced different strengths of MMB.

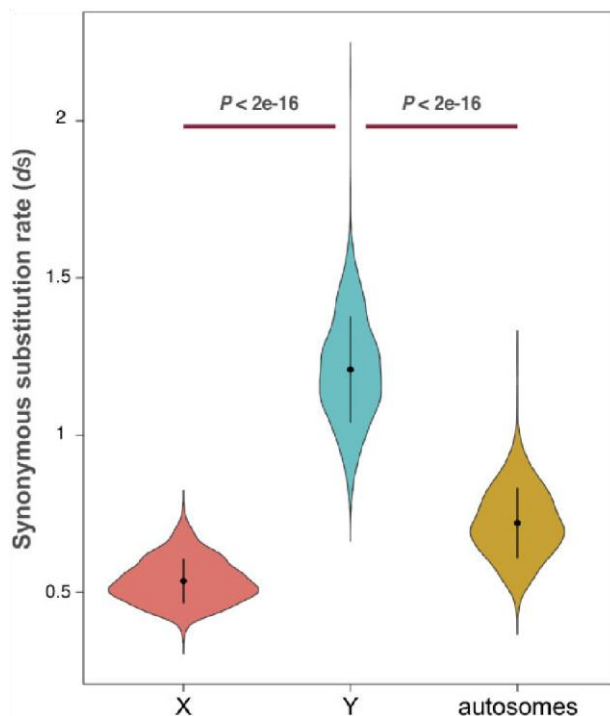


FIG. 3. Synonymous substitution rates for sex-linked and autosomal sequences in pleurodents. Violin plots of synonymous substitution rates obtained from the comparison of Y, X, and autosomal intronic sequences between two pleurodont species, the green anole *Anolis carolinensis* and the Fiji-banded iguana. P value, Welch two sample t-test. N= 1,000 bootstrap rounds. Error bars represent 1 SD from the mean.

Simulated Data in Squamates

We evolved nucleotide sequences considering 16 different scenarios. The first scenario (i.e., the null hypothesis; figs. 5 and 6, red labels) considered that agamids did not share the ancestral XY chromosome system with pleurodents. In addition, we modeled 15 alternative scenarios in which we assumed that agamids maintained the ancestral XY chromosome system for an increasing

number of million years (fig. 5 and [supplementary fig. 1, Supplementary Material online](#); see Materials and Methods). Since α values are not available for agamids due to scarce sequencing data, we decided to use different intensities of male mutation bias (fig. 5 and [supplementary fig. 1, Supplementary Material online](#)). In the simulations, the branch lengths of snakes and pleurodonts were not different between the observed values and simulated values (Mann–Whitney U test, $P > 0.05$; fig. 5 and [supplementary fig. 1, Supplementary Material online](#), grey horizontal bars). This result indicates that the simulations can correctly recapitulate that autosomal sequences in snakes have not been differentially affected by MMB, whereas X-linked sequences in pleurodonts have been under a strong MMB. On the other hand, the longer the sequences in agamids were modeled as X-linked, and were differentially affected by MMB, their branch lengths became shorter, moved away from the snake values and approached the values exhibited by pleurodonts (fig. 5 and [supplementary fig. 1, Supplementary Material online](#), shaded areas). Importantly, the simulations supported the hypothesis that agamids conserved the ancestral XY chromosome system for several million years. In other words, when we assumed that agamids did not share the ancestral XY chromosome system with pleurodonts (fig. 5 and [supplementary fig. 1, Supplementary Material online](#), the red “null H.” label on the x axis), regardless of the intensity of MMB, the results were incompatible with the observed data for the three species (no overlap between the observed values and the simulated values; fig. 5 and [supplementary fig. 1, Supplementary Material online](#), horizontal light and dark green bars).

We further explored the simulated data to infer the approximate time at which agamids lost the XY chromosome system. To do so, we matched the observed values and the simulated values for *Pogona/Ctenophorus* as a single lineage, given their close phylogenetic relationship (Zheng and Wiens 2016), and *Phrynocephalus* as another lineage (fig. 5 and [supplementary fig. 1, Supplementary Material online](#), horizontal light and dark green bars). We initially assumed that these lineages were affected by similar intensities of MMB. The results obtained with low values of α (1.8 and 2.4) were incompatible with the observed data for *Pogona/Ctenophorus* (no overlap between the observed values and the simulated values; fig. 5a and b and [supplementary fig. 1, Supplementary](#)

Material online). In addition, the results obtained using a high value of α ($\alpha = 6$) implied that *Phrynocephalus* lost the XY chromosome system in the ancestor of both groups, but *Pogona/Ctenophorus* lost the XY chromosome system after the speciation event (fig. 5d and supplementary fig. 1, Supplementary Material online, vertical pink line), which would mean that *Pogona/Ctenophorus* lost the sex chromosomes twice. Only the simulations using a medium value of α ($\alpha = 4$) provided sounded results. In this scenario, the *Pogona/Ctenophorus* lineage lost the XY chromosome system 20–50 Ma (fig. 5c and supplementary fig. 1, Supplementary Material online), whereas the *Phrynocephalus* lineage lost the XY chromosome system 70–110 Ma (fig. 5c and supplementary fig. 1, Supplementary Material online), which coincides with the time it diverged from *Pogona/Ctenophorus* (105.5 Ma; 79 Myr after the common ancestor of *Pogona* and *Phrynocephalus* lineages; Zheng and Wiens 2016).

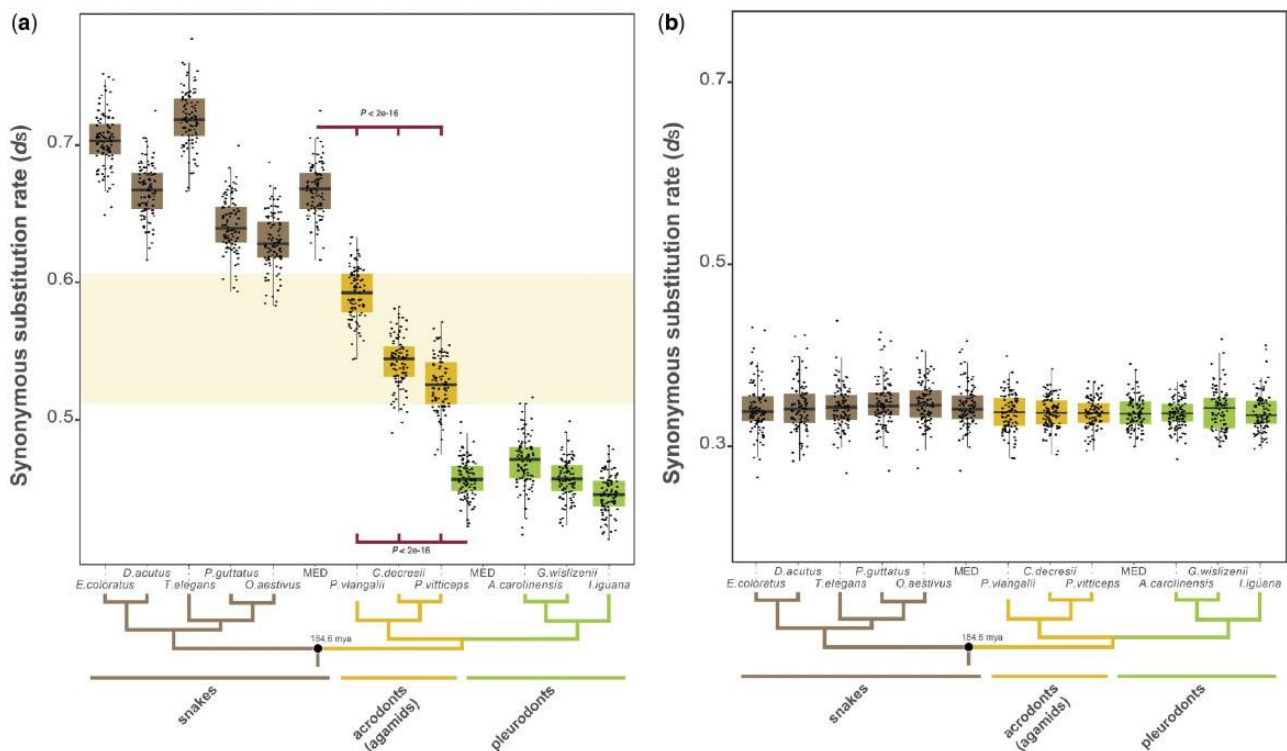


FIG. 4. Synonymous substitution rates of X-linked genes and autosomes in pleurodonts and orthologous genes in agamids and snakes. (a) Boxplots of autosomal-corrected synonymous substitution rates for X-linked sequences in pleurodonts and orthologous sequences in acrodonts (agamids) and snakes obtained from the concatenated alignment of 77 genes analyzed by 100 bootstrap rounds (see Materials and Methods). MED indicates the median value within placental or outgroup species. The shaded yellow area marks values covered by agamids. Benjamini–Hochberg-corrected P values, Welch two sample t-tests. Error bars,

maximum and minimum values, excluding outliers. Black dots represent the values from 100 bootstrap rounds. The species tree specifies the relationships among the analyzed species. (c) Same as in (b) but for autosomal-corrected synonymous substitution rates of random subsets of autosomal sequences.

It is, however, very likely that the *Pogona/Ctenophorus* and *Phrynocephalus* lineages experienced different intensities of MMB after their divergence. Changes in MMB intensities have been seen in placental mammals (Wilson Sayres et al. 2011) and have the potential to affect the results. Therefore, we explored combinations of low, medium, and high values of α , both in the ancestor and in the specific branches leading to *Pogona/Ctenophorus* and *Phrynocephalus*. In agreement with the first round of simulations (results in fig. 5), we found that a combination of low values of α ($\alpha < 4$) were incompatible with the observed data in *Pogona/Ctenophorus*, and a combination of high values of α ($\alpha > 6$) resulted in *Pogona/Ctenophorus* losing the XY chromosome system twice. Ultimately, only four scenarios were compatible with the observed data, as well as with the evolution of the species (i.e., divergence time; fig. 6 and supplementary fig. 2, Supplementary Material online). In the first scenario (fig. 6a), the ancestor and *Phrynocephalus* lineage experienced low MMB, but *Pogona/Ctenophorus* specifically experienced an acute increase in α . In this scenario, *Pogona/Ctenophorus* and *Phrynocephalus* lost the XY chromosome system very recently (20–30 Ma). Other plausible scenarios included (i) an independent increase of α in agamids (fig. 6b), (ii) an increase of α in *Pogona/Ctenophorus* coupled with a decrease of α in *Phrynocephalus* (fig. 6c), and (iii) an increase of α specifically in *Pogona/Ctenophorus* coupled with moderate α in *Phrynocephalus* (fig. 6d). These three scenarios provided similar results, meaning *Pogona/Ctenophorus* consistently lost the XY chromosome system in recent times, 20–60 Ma, whereas *Phrynocephalus* lost the XY chromosome system around the time the *Pogona* and *Phrynocephalus* lineages split (105.5 Ma; 79 Myr after the common ancestor of *Pogona* and *Phrynocephalus* lineages; Zheng and Wiens 2016).

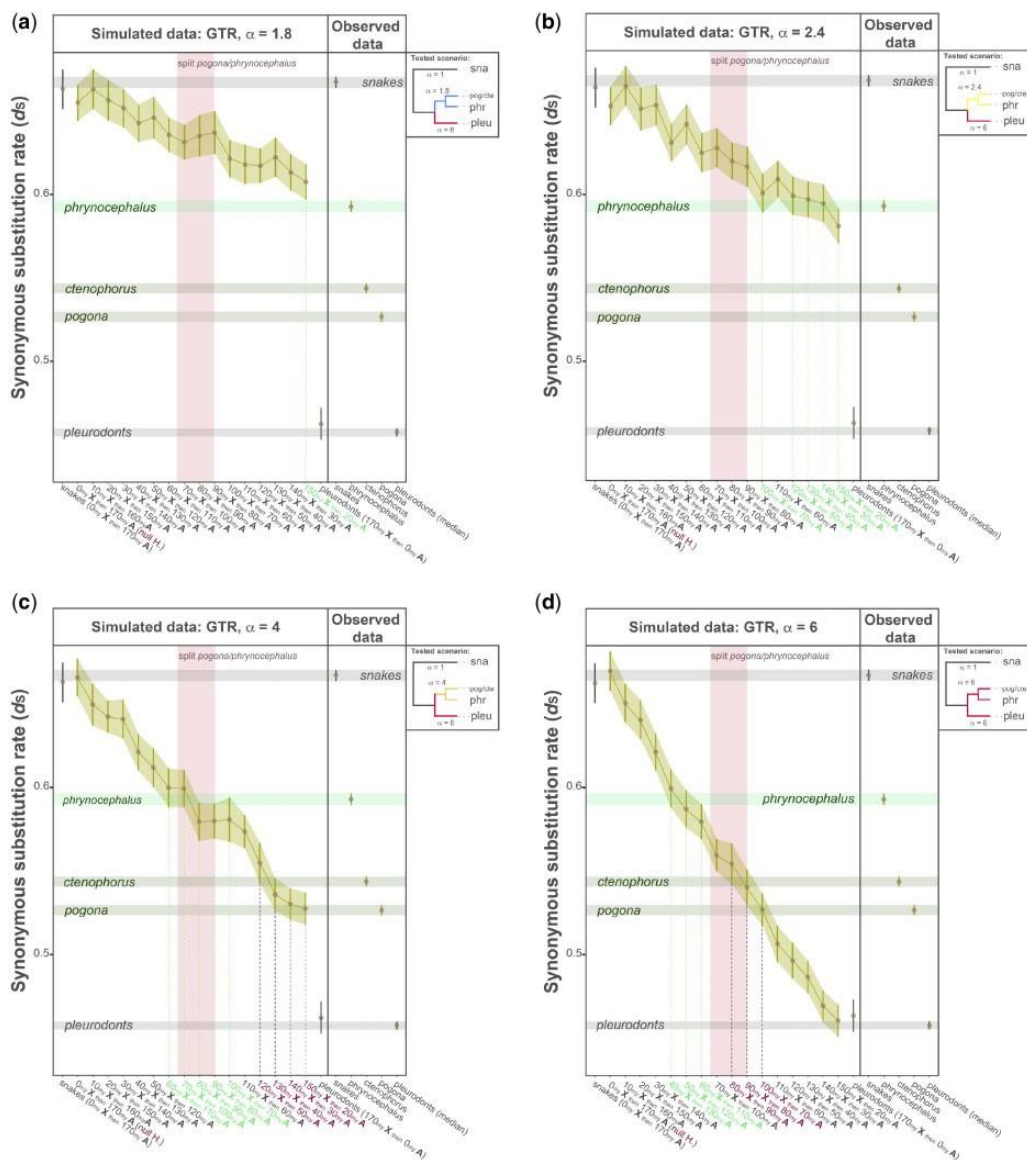
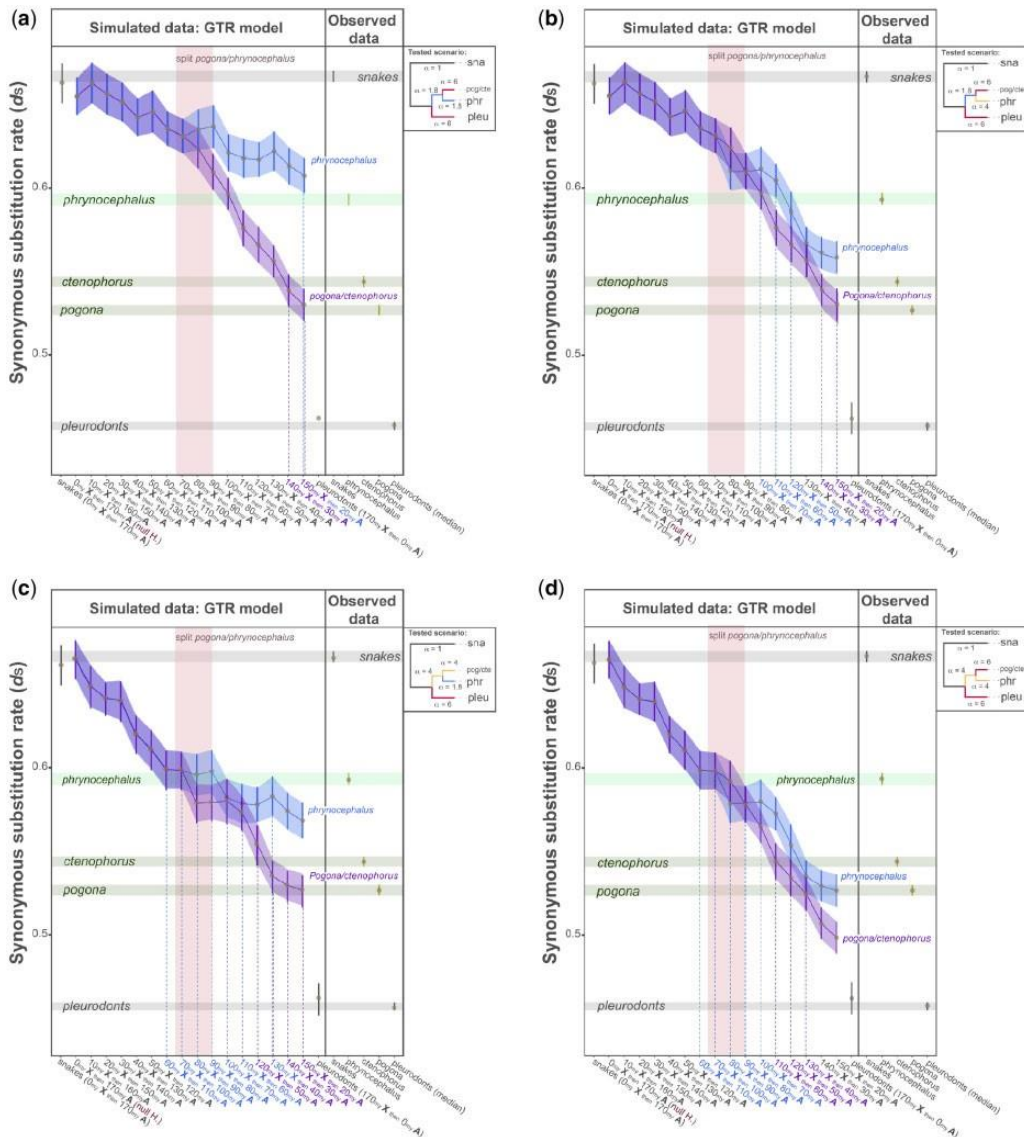


FIG.5. Simulations in squamates using the GTR model. Agamid sequences were simulated as X-linked for different amounts of time. *Phrynocephalus* and *Pogona/Ctenophorus* lineages were subjected to constant intensities of α : (a) $\alpha = 1.8$, (b) $\alpha = 2.4$, (c) $\alpha = 4$, and (d) $\alpha = 6$. In the first scenario (the null hypotheses; red labels), agamid sequences were modeled as X-linked sequences for 0 Myr and then modeled as autosomal sequences for 170 Myr. In the 15 alternative scenarios, agamid sequences were modeled as X-linked sequences for an increasing number of millions of years (by steps of 10 Myr) and then modeled as autosomal sequences for a decreasing number of millions of years (by steps of 10 Myr). Snake sequences were evolved in the absence of male mutation bias, whereas pleurodont sequences were always evolved under strong male mutation bias ($\alpha = 6$). The trees in the lateral boxes summarize the strength of α applied to the different groups; sna is snakes, pog

is *pogona*, cte is *ctenophorus*, phr is *phrynocephalus*, and pleu are pleurodonts. Error bars indicate the Welch's 95% confident intervals and the brown dots represent the mean values from 100 simulations. The green shaded areas highlight the patterns followed by the simulated data. The potential ages when the XY chromosome system loss would occur are given by the overlap between the observed and the simulated data (green horizontal bars, light and dark green for *Phrynocephalus* and *Pogona/Ctenophorus* lineages, respectively). These overlaps are also highlighted by the dotted vertical lines and the colored labels on the x axis (light green and magenta for *Phrynocephalus* and *Pogona/Ctenophorus* lineages, respectively). The pink vertical bars indicate the *Pogona/Phrynocephalus* speciation event (79 Myr after the last common ancestor of the two lineages; taken from Zheng and Wiens



2016).

FIG.6. Simulated data in squamates using the GTR model. Agamid sequences were simulated as X-linked for different amounts of time. *Phrynocephalus* and *Pogona/Ctenophorus* lineages were subjected to variable intensities of α : (a) low-strong, (b) low-medium-strong, (c) medium-lowstrong, and (d) medium-strong. In the first scenario (the

null hypotheses; red labels), agamid sequences were modeled as X-linked sequences for 0 Myr and then modeled as autosomal sequences for 170 Myr. In the 15 alternative scenarios, agamid sequences were modeled as X-linked sequences for an increasing number of millions of years (by steps of 10 Myr) and then modeled as autosomal sequences for a decreasing number of millions of years (by steps of 10 Myr). Snake sequences were evolved in the absence of male mutation bias, whereas pleurodont sequences were always evolved under strong male mutation bias ($\alpha = 6$). The trees in the lateral boxes summarize the strength of α applied to the different groups; sna is snakes, pog is *pogona*, cte is *ctenophorus*, phr is *phrynocephalus*, and pleu are pleurodons. Error bars indicate the Welch's 95% confident intervals and the brown dots represent the mean values from 100 simulations. Shaded areas highlight the patterns followed by the simulated data (blue for *Phrynocephalus* and purple for *Pogona/Ctenophorus*). The potential ages when the XY chromosome system loss would occur are given by the overlap between the observed and the simulated data (green horizontal bars, light and dark green for *Phrynocephalus* and *Pogona/Ctenophorus* lineages, respectively). These overlaps are also highlighted by the dotted vertical lines and the colored labels on the x axis (blue and purple for *Phrynocephalus* and *Pogona/Ctenophorus* lineages, respectively). The pink vertical bars indicate the *Pogona/Phrynocephalus* speciation event (79 Myr after the last common ancestor of the two lineages; taken from Zheng and Wiens 2016).

7.5 Discussion

Overall, our work showed that by tracing the effects of male mutation bias on a specific group of sequences we could hint at former X chromosomes. Specifically, we first showed that monotremes did not share the sex chromosomes with placental mammals. A number of studies support this result since phylogenetic analyses of both monotreme X_5Y_5 and therian XY gametologs indicated an independent origin for the sex chromosomes in these two groups (Cortez et al. 2014). Furthermore, we showed that pleurodons and acrodons probably shared the same sex chromosomes, and that acrodons conserved the pleurodont XY chromosomes for several millions of years.

In the majority of the scenarios we tested, either with fixed or variable α values, we obtained similar results. That is, the *Pogona/Ctenophorus* lineage probably lost the XY chromosome system in more recent times than the *Phrynocephalus* lineage, which seemed to have probably lost the XY chromosome system around the time it diverged from *Pogona*. This result entails an interesting possibility since

a sex determination system turnover could have been a key factor promoting the speciation of the *Phrynocephalus* lineage. At this stage, we cannot know which genetic or environmental factors triggered the sex chromosome turnover in acrodonts and whether this event responded to either selection pressures or genetic drift (Saunders et al. 2018).

So far, the Tree of Sex database contains information regarding the sex determination systems in 27 species of agamids and 3 species of chameleons (Bachtrog et al. 2014). Additional studies have added a few extra species to the list (Rovatsos et al. 2015; Hansson and Olsson 2018; Nielsen et al. 2018). However, there are 500 extant species in the acrodont clade. We should, therefore, continue with the characterization of the sex determination systems in this group since some species may have maintained the ancestral XY chromosome system we still observe in pleurodonts.

We note that the reported age estimates for the sex determination system turnovers in acrodonts should be taken with prudence. At this stage, our method could hint at whether a particular group of species shared specific sex chromosomes during an approximated range of time before undergoing a sex determination system turnover. We note, however, that although the general patterns are robust, the variation in synonymous substitution rates is high within groups, particularly in snakes. This could be due to species specific variations in the mutation rates or the strength of MMB. But also due to the heterogeneity in synonymous substitution rates among autosomes of the same species. Therefore, we cannot exclude that all agamid groups lost the pleurodont XY system in a single ancestral event. Our results will surely be refined as we learn more about the mutation rates and X chromosome strata in reptiles. More accurate estimates will require knowing the strength of MMB in a larger number of species of pleurodonts, acrodonts, and snakes, and for this, further sequencing data will be required. However, simulations offer a good alternative since they present direct estimates that derive from the sole effect of MMB, regardless of any confounding factor.

The method described in this work could be suitable to study a broad number of groups where sex turnovers are suspected but the obvious genomic signatures have been eroded owing to the loss of the Y chromosome and the present

autosomal nature of the former X chromosome***OK. The method could also be applied in species with ZW chromosomes. Male mutation bias would make the Z chromosome to evolve faster because it spends more time in the male germline (Wilson Sayres and Makova 2011). The simulations should be modified accordingly. We note that the only prerequisites to apply the method are sufficient sequencing data and presence of MMB in the groups of interest. Snakes are a potential candidate group to test the method. One could test whether pythons and boas shared the canonical ZW system before evolving specific XY systems (Gamble et al. 2017; Augstenova et al. 2018). Another example could be amphibians and their recently described panoply of sex chromosome transitions (Jeffries et al. 2018).

7.6 Supplementary Material

Supplementary data are available at Genome Biology and Evolution online.

7.7 Acknowledgments

This study was supported by grants from PAPIIT-UNAM (No. RA-200516 and No. RA-200518) and CONACyT-SEP Basic Science grant (No. 254240) awarded to D.C. We thank the people working at the Massive Sequencing Unity of the University of Mexico (UUSMD-UNAM), particularly Ricardo Grande, Gloria Vazquez, and Alejandro Sanchez. We also thank Laurence D. Hurst for his valuable comments.

7.8 Authors' Contributions

D.C. designed the study. A.A., M.L.M.-P., and D.C. performed the analyses. K.D. and N.P. performed additional analyses and figures. M.G.-M. manipulated and sacrificed the animals. All authors contributed to the interpretation of the results. D.C. wrote the article. All authors read and approved the final article.

7.9 Literature Cited

- Alfoldi J, et al. 2011. The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature* 477:587–591.
- Altmanova M, et al. 2018. All iguana families with the exception of basilisks share sex chromosomes. *Zoology (Jena)*. 126:98–102.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215(3):403–410.
- Amster G, Sella G. 2016. Life history effects on the molecular clock of autosomes and sex chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(6):1588–1593.
- Augstenova B, et al. 2018. ZW, XY, and yet ZW: sex chromosome evolution in snakes even more complicated. *Evolution* 72(8):1701–1707.
- Axelsson E, Smith NGC, Sundström H, Berlin S, Ellegren H. 2004. Malebiased mutation rate and divergence in autosomal, z-linked and wlinked introns of chicken and Turkey. *Mol Biol Evol*. 21(8):1538–1547.

- Bachtrog D. 2013. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nat Rev Genet.* 14(2):113–124. Bachtrog D, et al. 2014. Sex determination: why so many ways of doing it? *PLoS Biol.* 12(7):e1001899.
- Bartosch-Harlid A, Berlin S, Smith NG, Moller AP, Ellegren H. 2003. Life history and the male mutation bias. *Evolution* 57:2398–2406.
- Burdno M, et al. 2003. LAGAN and Multi-LAGAN: efficient tools for largescale multiple alignment of genomic DNA. *Genome Res.* 13(4):721–731.
- Chamary JV, Hurst LD. 2004. Similar rates but different modes of sequence evolution in introns and at exonic silent sites in rodents: evidence for selectively driven codon usage. *Mol Biol Evol.* 21(6):1014–1023.
- Cortez D, et al. 2014. Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. *Nature* 508(7497):488–493.
- Drost JB, Lee WR. 1995. Biological basis of germline mutation: comparisons of spontaneous germline mutation rates among drosophila, mouse, and human. *Environ Mol Mutagen.* 25(Suppl 26):48–64.
- Ellegren H, Fridolfsson AK. 2003. Sex-specific mutation rates in salmonid fish. *J Mol Evol.* 56(4):458–463.
- Ezaz T, et al. 2005. The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Res.* 13(8):763–776.
- Gamble T, et al. 2015. Restriction site-associated DNA sequencing (RADseq) reveals an extraordinary number of transitions among Gecko sexdetermining systems. *Mol Biol Evol.* 32(5):1296–1309.
- Gamble T, et al. 2017. The discovery of XY sex chromosomes in a boa and python. *Curr Biol.* 27:2148–2153 e2144.
- Georges A, et al. 2015. High-coverage sequencing and annotated assembly of the genome of the Australian dragon lizard *Pogona vitticeps*. *Gigascience* 4(1):45.
- Grabherr MG, et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNASeq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 29(7):644–652.
- Hansson A, Olsson M. 2018. Incubation temperature and parental identity determine sex in the Australian agamid lizard *Ctenophorus pictus*. *Ecol Evol.* 8(19):9827–9833.
- Hargreaves AD, Swain MT, Logan DW, Mulley JF. 2014. Testing the Toxicofera: comparative transcriptomics casts doubt on the single, early evolution of the reptile venom system. *Toxicon* 92:140–156.
- Harlow PS. 2000. Incubation temperature determines hatchling sex in Australian rock dragons (Agamidae: Genus *Ctenophorus*). *Copeia* 2000(4):958–964.
- Hurst LD, Ellegren H. 1998. Sex biases in the mutation rate. *Trends Genet.* 14(11):446–452.
- Jeffries DL, et al. 2018. A rapid rate of sex-chromosome turnover and nonrandom transitions in tree frogs. *Nat Commun.* 9(1):4088.
- Kumar S, Subramanian S. 2002. Mutation rates in mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(2):803–808.
- Lahn BT, Page DC. 1999. Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 286(5441):964–967.
- Li H, Holleley CE, Elphick M, Georges G, Shine R. 2016. The behavioural consequences of sex reversal in dragons. *Proc R Soc B.* 283:1–7.
- Link V, Aguilar-Gomez D, Ramirez-Suastegui C, Hurst LD, Cortez D. 2017. Male mutation bias is the main force shaping chromosomal substitution rates in monotreme mammals. *Genome Biol Evol.* 9(9):2198–2210.
- Loytynoja A, Goldman N. 2005. An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(30):10557–10562.
- Luo R, et al. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memoryefficient short-read de novo assembler. *Gigascience* 1(1):18.
- Makova KD, Li WH. 2002. Strong male-driven evolution of DNA sequences in humans and apes. *Nature* 416(6881):624–626.

- Marin R, et al. 2017. Convergent origination of a *Drosophila*-like dosage compensation mechanism in a reptile lineage. *Genome Res.* 27(12):1974–1987.
- McVean GT, Hurst LD. 1997. Evidence for a selectively favourable reduction in the mutation rate of the X chromosome. *Nature* 386(6623):388–392.
- Miyata T, Hayashida H, Kuma K, Mitsuyasu K, Yasunaga T. 1987. Maledriven molecular evolution: a model and nucleotide sequence analysis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 52(0):863–867.
- Nielsen SV, Banks JL, Diaz RE Jr, Trainor PA, Gamble T. 2018. Dynamic sex chromosomes in old world chameleons (Squamata: Chamaeleonidae). *J Evol Biol.* 31(4):484–490.
- Pandey RS, Wilson Sayres MA, Azad RK. 2013. Detecting evolutionary strata on the human x chromosome in the absence of gametologous y-linked sequences. *Genome Biol Evol.* 5(10):1863–1871.
- Pennell MW, Mank JE, Peichel CL. 2018. Transitions in sex determination and sex chromosomes across vertebrate species. *Mol Ecol.* 27(19):3950.
- Pink CJ, Hurst LD. 2010. Timing of replication is a determinant of neutral substitution rates but does not explain slow Y chromosome evolution in rodents. *Mol Biol Evol.* 27(5):1077–1086.
- Rambaut A, Grassly NC. 1997. Seq-Gen: an application for the Monte Carlo simulation of DNA sequence evolution along phylogenetic trees. *Comput Appl Biosci.* 13:235–238.
- Rovatsos M, Altmanova M, Pokorna MJ, Kratochvil L. 2014. Novel Xlinked genes revealed by quantitative polymerase chain reaction in the green anole *Anolis carolinensis*. *G3 (Bethesda)* 4:2107–2113.
- Rovatsos M, Johnson Pokorna M, Altmanova M, Kratochvil L. 2015. Female heterogamety in Madagascar chameleons (Squamata: Chamaeleonidae: Furcifer): differentiation of sex and neo-sex chromosomes. *Sci Rep.* 5(1):13196.
- Rovatsos M, Pokorna M, Altmanova M, Kratochvil L. 2014. Cretaceous park of sex determination: sex chromosomes are conserved across iguanas. *Biol Lett.* 10(3):20131093.
- Rovatsos M, Rehak I, Velensky P, Kratochvil L. 2019. Shared ancient sex chromosomes in varanids, beaded lizards, and alligator lizards. *Mol Biol Evol.* 36(6):1113–1120.
- Sabath N, et al. 2016. Sex determination, longevity, and the birth and death of reptilian species. *Ecol Evol.* 6(15):5207–5220.
- Sandstedt SA, Tucker PK. 2005. Male-driven evolution in closely related species of the mouse genus *Mus*. *J Mol Evol.* 61(1):138–144.
- Saunders PA, Neuenschwander S, Perrin N. 2018. Sex chromosome turnovers and genetic drift: a simulation study. *J Evol Biol.* 31(9):1413–1419.
- Talavera G, Castresana J. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol.* 56(4):564–577.
- Taylor J, Tyekucheva S, Zody M, Chiaromonte F, Makova KD. 2006. Strong and weak male mutation bias at different sites in the primate genomes: insights from the human-chimpanzee comparison. *Mol Biol Evol.* 23(3):565–573.
- Tree of Sex C. 2014. Tree of Sex: a database of sexual systems. *Sci Data.* 1:140015.
- Tzika AC, Ullate-Agote A, Grbic D, Milinkovitch MC. 2015. Reptilian transcriptomes v2.0: an extensive resource for Sauropsida genomics and transcriptomics. *Genome Biol Evol.* 7(6):1827–1841.
- Venn O, et al. 2014. Nonhuman genetics. Strong male bias drives germline mutation in chimpanzees. *Science* 344(6189):1272–1275.
- Vicoso B, Emerson JJ, Zektser Y, Mahajan S, Bachrog D. 2013. Comparative sex chromosome genomics in snakes: differentiation, evolutionary strata, and lack of global dosage compensation. *PLoS Biol.* 11(8):e1001643.
- Wilson Sayres MA, Makova KD. 2011. Genome analyses substantiate male mutation bias in many species. *Bioessays* 33(12):938–945.
- Wilson Sayres MA, Venditti C, Pagel M, Makova KD. 2011. Do variations in substitution rates and male mutation bias correlate with life-history traits? A study of 32 mammalian genomes. *Evolution* 65(10):2800–2815.

- Wolfe KH, Sharp PM. 1993. Mammalian gene evolution: nucleotide sequence divergence between mouse and rat. *J Mol Evol.* 37(4):441–456.
- Yang W, Qi Y, Fu J. 2014. Exploring the genetic basis of adaptation to high elevations in reptiles: a comparative transcriptome analysis of two toad-headed agamas (Genus *Phrynocephalus*). *PLoS One* 9(11):e112218.
- Yang Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci.* 13:555–556.
- Yin W, et al. 2016. Evolutionary trajectories of snake genes and genomes revealed by comparative analyses of five-pacer viper. *Nat Commun.* 7(1):13107.
- Zeng M, et al. 1997. Karyotypes of nine species in the genus *Phrynocephalus*, with discussion of karyotypic evolution of Chinese *Phrynocephalus*. *Acta Zoolog Sin.* 43:399–410.
- 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. *Mol Phylogenet Evol.* 94:537–547.

8. DISCUSIÓN

Las tecnologías de secuenciación han permitido estudiar más a fondo y desde una perspectiva más amplia los sistemas de determinación sexual, comparadas con la limitada información obtenida anteriormente con las técnicas de cariotipos o qPCRs. La secuenciación del genoma y transcriptoma me permitió estudiar en detalle eventos evolutivos a través del tiempo en los sistemas de determinación sexual de *B. vitattus* (Acosta y Cortez et al., 2019a) y *Eulamprus* (Acosta y Cortez et al., 2020), así como la caracterización de estos sistemas. El presente trabajo refleja la importancia de la elección correcta de los modelos de estudio que nos permitan comprender más acerca de la evolución de los sistemas de determinación sexual.

Evolución de los cromosomas sexuales en Corytophanidae

En términos generales, la conservación de los sistemas de determinación sexual durante millones de años de antigüedad se puede observar en reptiles (160-170 millones de años; Marin y Cortez et al., 2017), mamíferos (180 millones de años con el mismo sistema XY; Cortez et al., 2014), en aves (120 millones de años con un sistema ZW; Mank y Ellegren, 2007) e insectos (210 millones de años en Lepidoptera/Trichoptera; Misof et al., 2014; 240 millones de años en Hemiptera; Pal y Vicoso, 2015). Pero diversos estudios han demostrado que organismos con cromosomas Y/W altamente degenerados frecuentemente tienen descendencia con cariotipos celulares XO/ZO (Raudsepp et al., 2012; Halkka, 1960; Manna, 1982; Papeschi y Bressa, 2006) y en casos extremos como los mamíferos del género *Ellobius* y *Tokudaia*, insectos del género *Nemophora* y los reptiles de la familia *Corytophanidae* se ha observado una pérdida completa del sistema de determinación sexual de la especie (Bakloushinskaya et al., 2018; Koroïwa et al., 2010; Washio, 2019; Fraïsse et al., 2017; Acosta y Cortez et al., 2019a).

Ha sido bien documentado que algunas especies usan estrategias como el rejuvenecimiento a través de fusiones o traslocaciones de cromosomas autosómicos para la conservación de los cromosomas sexuales degenerados (Blackmon y Demuth, 2015). En dos especies de género *Tokudaia* (roedores),

se ha perdido el gen que determina el sexo en mamíferos, *Sry*, pero otros genes del Y saltaron por transposición a los autosomas, lo que tal vez quiera decir que estos genes juegan un papel importante en el nuevo sistema de determinación sexual en la especie (Koroiwa et al., 2010; Washio, 2019). Por otro lado, una tercera especie de *Tokudaia* agregó material genético a sus cromosomas sexuales por medio de la fusión de éstos con autosomas (Murata et al., 2012). Nuestro trabajo demuestra que los *Corytophanidae* no recurrieron al rejuvenecimiento como estrategia evolutiva, pues realicé una búsqueda de los genes determinantes del sexo ancestrales presentes en *Anolis* a nivel genoma y transcriptoma, y mis resultados mostraron una completa ausencia de éstos (Acosta y Cortez et al., 2019a). De haber existido un proceso de rejuvenecimiento mediante traslocación o fusión de cromosomas autosómicos con el degenerado cromosoma Y del sistema ancestral, los genes determinantes del sexo seguirían presentes dentro del genoma de *B. vittatus*. Los resultados del presente trabajo demuestran que el caso de los *Corytophanidae* se asemeja a la transición de determinación sexual observada en los roedores del género *Ellobius* (Just et al., 1995; Bakloushinskaya et al., 2018), en donde hay una ausencia completa de los antiguos genes que determinantes del sexo y un nuevo sistema de determinación sexual ha suplido su función (Acosta y Cortez et al., 2019a).

Estudios previos realizados por Marin y Cortez et al. (2017), han demostrado que especies del infraorden Iguania como *A. carolinensis* posee sólo un total de 7 genes en el cromosoma Y (0.46% del contenido original) y *Bachilophus fasciatus*, parece solo tener un total de 4 genes totales. Estos resultados indican que el cromosoma Y en el infraorden Iguania está altamente degenerado, lo que además sugiere que estas especies presentan las características necesarias para que ocurran transiciones entre cromosomas sexuales, tal señala la hipótesis de la fragilidad del cromosoma Y propuesta por Blackmon y Demuth (2015): los sistemas de determinación ancestral altamente degenerados se convierten en una carga evolutiva para sus portadores, permitiendo que si aparece un nuevo sistema de determinación sexual que proporcione menos desventajas (menor cantidad de mutaciones deletéreas acumuladas, secuencias repetidas y pérdida de función de genes) éste sea fijado

dentro de las poblaciones. Aunque los cromosomas sexuales se consideran “trampas evolutivas” de las que es casi imposible salir, mecanismos como las transiciones de determinación sexual presentan una alternativa ante la inminente degradación y pérdida de los cromosomas Y/W (Pennell et al., 2018).

Una de las mejores técnicas para la reconstrucción de cromosomas completos es el uso de mapas genéticos, contruidos con datos de pedigrí o cruza (Ellegren, 2012). Sin embargo, algunas especies protegidas que generalmente no se pueden usar para cruza artificiales o diseños de reproducción de medios hermanos (*half-sib breeding*) requieren esfuerzos adicionales en el genotipado: en la mayoría de los sistemas es difícil encontrar genealogías profundas con un número suficiente de eventos de meiosis (Romanov et al., 2009).

Como alternativa a la reconstrucción de cromosomas putativos, se puede usar información en el orden de sintenia de especies relacionadas, teniendo en cuenta que puede haber reordenamientos cromosómicos, incluso en especies emparentadas (Ekblom y Wolf, 2014). Tomando en cuenta que la conservación de la sintenia de genes ortólogos puede permitir la reconstrucción de cariotipos ancestrales de diferentes especies (Schartl, 2015), durante el primer esfuerzo hacia la caracterización del sistema de determinación sexual en *Corytophanidae* usé como referencia el genoma de *A. carolinensis*. Mediante el uso de análisis de cobertura, los cuales nos permiten identificar cromosomas sexuales homomórficos (Vicoso y Bachtrog, 2011, 2013; Vicoso et al., 2013; Darolti et al., 2019), traté de identificar la presencia de un sistema GSD en *B. vittatus*. Desafortunadamente, los resultados no mostraron diferencias en las coberturas de los cromosomas reportados en *A. carolinensis*, lo que podría deberse a que los nuevos cromosomas sexuales de los *Corytophanidae* tienen rearrreglos diferentes a sus equivalentes cromosomales en *A. carolinensis*. Sin embargo, la reconstrucción del antiguo sistema de cromosomas sexuales concuerda con los estudios de Rovatsos et al. (2014), en donde se observaban dos copias de los cromosomas X ancestrales en ambos sexos de los *Corytophanidae*. Adicionalmente, realicé un análisis de expresión diferencial de los cromosomas X ancestrales que demuestran que los niveles de expresión son los mismos en ambos sexos (Acosta y Cortez et al., 2019a). Lo anterior se debe a que cuando

un sistema de determinación sexual se pierde, los cromosomas X/Z regresan a ser cromosomas autosomales (White, 1973; Palmer et al., 2019) y por ende sus niveles de expresión vuelven a ser iguales en machos y hembras.

Tomando como referencia el alto grado de sintenia documentado entre *G. gallus* y varios reptiles, resultado del grado relativamente bajo de reordenamientos en ambos grupos (Ezaz et al., 2009,2017; Matsubara et al., 2006, Kawai et al., 2009; Alföldi et al., 2011; Srikulnath et al., 2009, 2013, 2014; O'connor et al., 2018; Ibney et al., 2020), decidí hacer la reconstrucción de los cromosomas de *Corytophanidae* basados en los cromosomas de *G. gallus*, esperando que la sintenia en bloques con esta especie fuera lo suficientemente alta para permitir identificar los cromosomas sexuales mediante análisis de cobertura genética. Este segundo esfuerzo para la detección de cromosomas sexuales por medio de las coberturas me permitió observar diferencias en cobertura en el cromosoma correspondiente al microcromosoma 17 de *G. gallus* en *B. vittatus*, mostrando la mitad de la dosis génica en machos, algo que se espera de cromosomas sexuales heteromórficos. En este nuevo cromosoma heteromórfico pude identificar los 12 genes del nuevo sistema XY de *Corytophanidae*, confirmando de esta manera que la diferencia en cobertura se debe a que éstos son cromosomas sexuales. Esto posiblemente significa que los rearrreglos del actual par de cromosomas sexuales de *Corytophanidae* y su equivalente en *A. carolinensis*, se dieron posterior a la divergencia entre ambos grupos, mientras que los rearrreglos entre *G. gallus* y los *Corytophanidae* no han sido lo suficientemente grandes y ha permitido la conservación de una alta sintenia en bloques.

Aplicando el método de sustracción de transcriptoma desarrollado por Marin y Cortez et al. (2017) corroboré la presencia de 12 genes específicos del macho propios de un nuevo sistema XY de origen independiente y el uso de la técnica de PCR genómica me permitió dilucidar que estos genes sólo están presentes en machos. Aplicando la misma técnica con muestras de sangre de *C. hernandesii* pude documentar la presencia de al menos cinco de los 12 genes de este nuevo sistema XY de *B. vittatus*. Estos resultados sugieren que el resto de los genes del cromosoma Y de *B. vittatus* surgieron mediante duplicaciones

y/o traslocaciones posteriores a la divergencia entre ambos grupos, o que eventualmente *C. hernandesii* perdió los genes Y.

Lo anterior indica que al menos dos de los tres géneros de la familia *Corytophanidae* pasaron por una transición de determinación sexual que ocurrió previo a la divergencia de estos dos grupos (Acosta y Cortez et al., 2019a). Los estudios de Rovatsos et al. (2014) que registran un par de cromosomas X del sistema ancestral de Iguania para machos y hembras en el género *Laemanctus* podrían indicar que comparten el mismo sistema XY reciente de *C. hernandesii* y *B. vittatus*, pero para poder corroborarlo es necesario tomar muestras de tejido de al menos un ejemplar de cada sexo y corroborar mediante PCRs que los genes del nuevo cromosoma Y estén presentes.

Una de las limitantes de las técnicas de caracterización mediante el uso de transcriptómica y genómica usadas en el presente trabajo es que aun cuando se pueden identificar genes propios del sexo heterogamético, y por ende saber si éstos pertenecen a un sistema XY o ZW, el ensamblaje de los cromosomas usando como referencia a organismos modelos representa sólo una aproximación a lo que podría ser la estructura real de los cromosomas de los organismos de estudio. Hay que tener en cuenta que aun cuando las especies estén cercanas filogenéticamente, puede haber rearrreglos específicos que surjan después de la divergencia entre ambas, cambiando la disposición de los genes a través de los cromosomas (Ekblom y Wolf, 2014).

Sin embargo, el uso de especies de referencia filogenéticamente cercanas para la reconstrucción de cromosomas en ensamblajes *de novo* y la identificación de sintenia en bloques puede darnos una perspectiva más amplia acerca de la disposición de los genes a lo largo de los cromosomas de una especie (Ekblom y Wolf, 2014; Ellegren, 2014; O'Connor et al., 2018; Ibney et al., 2020). Diversos trabajos empíricos recientes (Georges et al., 2015; Pokorná et al., 2011; Ezaz et al., 2009, 2017; Matsubara et al., 2006, Kawai et al., 2009; Alföldi et al., 2011; Srikulnath et al., 2009, 2013, 2014; O'Connor et al., 2018; Ibney et al., 2020), incluyendo el presente (Acosta y Cortez et al., 2019a), apoyan el uso de *G. gallus* en la reconstrucción de regiones cromosomales en ensamblajes *de novo* gracias a su enorme sintenia con reptiles. Debido a que con el uso de estas técnicas no es posible saber si los genes determinantes del sexo forman parte un

microcromosoma o macrocromosoma, han sufrido fusiones o traslocaciones con cromosomas autosomales, o algún otro tipo de rearreglos. Trabajos posteriores con el uso de BAC-FISH podrían ayudar a identificar y corroborar la exacta ubicación de los genes que determinan el sexo y los cromosomas sexuales en *Corytophanidae*, dándonos la respuesta de si pertenecen a macro o microcromosomas sexuales, tal como se ha hecho en estudios recientes con reptiles (Giovannotti et al., 2017; Alam et al., 2020; Lee, et al., 2020). Esta técnica es útil para el mapeo físico de genes, marcadores y otras secuencias de copia única o baja frecuencia, usa el mismo principio base de FISH, pero con la construcción de una biblioteca parcial de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) que permite insertos de mayor tamaño que la técnica de FISH tradicional, el mapeo físico de secuencias de copia única o baja frecuencia que es útil para correlacionar mapas genéticos y físicos (Lee et al., 2020).

Como mencioné anteriormente, los diferentes estudios enfocados a la identificación del sistema de determinación sexual en *Corytophanidae* previos a este trabajo se basaban principalmente en la observación de cariotipos (Schwenk et al., 1982; Gorman et al., 1967; Viets et al., 1994). En estos estudios nunca se pudieron identificar cromosomas sexuales. Gorman et al. (1967) identificó un total de 6 pares de macrocromosomas y 12 pares de microcromosomas, tanto en *Corytophanidae* como en algunas otras especies de Iguania.

Según los antecedentes que indican la presencia de microcromosomas en *B. vittatus* y alta sintenia en bloques con el microcromosoma 17 de *G. gallus* con los cromosomas sexuales (Acosta y Cortez et al., 2019a) existe la posibilidad de que los nuevos cromosomas sexuales de los *Corytophanidae* correspondan a microcromosomas. Es importante destacar que en reptiles como *Anolis gingivinus* (Gorman y Atkins, 1996), *Anolis blanquillanus* (Gorman, 1975), *P. vitticeps*, *Pogona barbata*, *Amphibolurus nobbi* (dragón nobbi) y *Ctenophorus fordii* (dragón militar mallee) (Ezaz et al., 2005, Ezaz et al., 2009) se han logrado identificar microcromosomas sexuales, por lo que la presencia de éstos en *Corytophanidae* es algo factible.

En *B. vittatus* las regiones donde se encuentran los genes determinantes sexuales están altamente diferenciadas, pero cabe la posibilidad de que el resto

del cromosoma no lo esté, por lo tanto, sean cromosomas homomórficos. Estas razones explicarían el por qué en el pasado no se pudo identificar mediante cariotipos cromosomas sexuales heteromórficos en los *Corytophanidae*.

Esta falta de degeneración se asocia a menudo con una transición de determinación sexual, ya que estos cromosomas son jóvenes y no han tenido el tiempo suficiente para que la pérdida de genes sea tan masiva (Volf et al., 2007; Perrin, 2009). Diversas especies de peces ((Mank y Avise, 2009; Mank et al., 2006; Volf et al., 2007) y ranas (Miura, 2007; Ogata et al., 2008, 2021; Furman y Evans, 2018) con frecuente número de transiciones parecen apoyar esta hipótesis. Como muestro en los resultados del capítulo 1, usando las tasas de mutación sinónimas de las secuencias de los cromosomas sexuales pude estimar que el nuevo sistema de determinación sexual surgió hace aproximadamente 61 millones de años, dicho sistema aún es joven en comparación de los cromosomas sexuales de Iguania de 160 - 170 millones de años (Cortez et al., 2014) o los 240 millones de años en Hemiptera (Pal y Vicoso, 2015), entre otros. Lo anterior podría explicar la ausencia de cromosomas sexuales heteromórficos en *Corytophanidae*s (Acosta y Cortez et al., 2019).

Aún cuando pude identificar los genes del nuevo sistema de cromosomas sexuales XY en *Corytophanidae*, una de las limitantes del método de sustracción de transcriptomas es que no permite conocer el verdadero rol en la cascada de determinación del sexo para los genes del machos. Sin embargo, mediante el alineamiento con las secuencias ortólogas de los genes del nuevo cromosoma Y compartidos entre *C. hernandesii* y *B. vittatus*, y las bases de datos de vertebrados podemos tener una primera aproximación de la función de éstos. Por lo que una búsqueda en la base de datos de NCBI Gene Bank mediante la herramienta de alineación BlastN y BlastX me permitió identificar los genes ortólogos en reptiles y la función reportada para éstos en bases de datos como GeneCards. Los resultados apuntan a *EHMT1Y-X*, un gen codificante para una proteína capaz de modificar epigenéticamente el genoma, como el principal candidato a un gen regulador maestro. Sin embargo, es necesario confirmar mediante métodos experimentales alternativos si este gen u otro de los 11 restantes pertenecen a un gen regulador maestro. El uso de técnicas como CRISPR-Cas9, en donde la mutación *EHMT1Y-X* mediante esta técnica podría

proporcionar la información necesaria que verifique si este gen es el regulador maestro dentro del nuevo sistema XY de *Corytophanidae*, esta técnica ya ha sido usada antes en mamíferos, en donde mutaciones sobre el gen *Sry* genera descendencia hermafrodita o inhibe el desarrollo de gónadas en machos genéticos (Imaimatsu et al., 2018, Song et al., 2018).

Ohno (1967), propuso que en cromosomas heteromórficos altamente diferenciados debido al tamaño tan pequeño del cromosoma Y/W y a la monosomía del cromosoma X/Z en el sexo heterogamético, era necesaria la presencia de un sistema de compensación de dosis que igualase los niveles de expresión de los cromosomas sexuales en el sexo homogamético. Algunas especies documentadas como mamíferos (Gupta et al., 2006; Nguyen y Disteché, 2006; Julien et al., 2015; Pessia et al., 2012; Lin et al., 2012), nemátodos (Ercan et al., 2007; Reinke et al., 2004), insectos (Baker et al., 1994, 2011; Franke y Baker, 1999; Prince et al., 2010; Hahn y Lanzaro, 2005; Wilkinson et al., 2013), reptiles (Marin y Cortez et al., 2017) y plantas (Muyle et al., 2012) cumplen con esta regla de compensación de dosis completa. Sin embargo, algunas especies de aves (Itoh et al., 2007; Ellegren et al., 2007; Uebbing et al., 2013; Arnold et al., 2008; Moghadam et al., 2013; Naurn et al., 2011; Wolf y Bryk, 2011), insectos (Walters et al., 2015; Harrison et al., 2012), platelmintos (Vicoso y Bachtrög, 2011; Zha et al., 2009; Arunkumar et al., 2009), reptiles (Schield et al., 2019; Acosta y Cortez et al., 2019a) y peces (Leder et al., 2010) mantienen sistemas de compensación de dosis incompletos. A través de análisis de expresión diferencial de genes del cromosoma X en diferentes tejidos somáticos de machos y hembras, he observado que el nuevo sistema de cromosomas sexuales XY en *Corytophanidae* parece tener un sistema de dosis parcialmente compensado por lo menos en *B. vittatus*, pues los niveles de expresión génicos en machos son más bajos que en hembras. Muyle et al. (2012) argumenta que los mecanismos de compensación de dosis comienzan a aparecer en los sistemas de determinación sexual tan pronto como la expresión del cromosoma Y/W disminuye. En el caso de los mamíferos, los estratos más antiguos tienen una compensación de dosis más optimizada y los estratos más jóvenes tienen una mayor proporción de genes que escapan a la inactivación del cromosoma X (Carrel y Willard, 2005). Este mismo caso parece corresponder a lo que he

documentado *B. vittatus* quienes, al tener cromosomas sexuales más recientes, en comparación al sistema ancestral de *A. carolinensis* (con un sistema de compensación de dosis completo) (Marin y Cortez et al., 2017), es posible que estén pasando por un estado transitorio hacia un sistema de dosis completo, en lugar de presentar un sistema de compensación de dosis incompleto o deficiente. Una segunda hipótesis es que los genes que presentan una expresión diferencial en machos sean genes haplosuficientes (necesitan solo una copia para su correcto funcionamiento) (Makino y MCLysaght, 2010). Los análisis de expresión diferencial en los cromosomas sexuales nos permiten identificar como es la dinámica del sistema de compensación de dosis actual en las especies. Sin embargo, no es posible determinar mediante esta técnica cuáles son los factores asociados que ayudan a mantener dosis equivalentes en ambos sexos. El uso de técnicas como el método de conformación de captura Hi-C podría ayudarnos a dilucidar el mecanismo asociado en la dosificación de la expresión de los genes en los cromosomas sexuales de *Corytophanidae*. Con Hi-C se pueden identificar los dominios estructurales de la cromatina, llamados TADs, que permiten tener una visión de la organización del genoma y la regulación de los genes (Belton et al., 2012; Fang et al., 2019).

Aún con la tecnología actual, los datos que se tienen de las especies y cómo funcionan los mecanismos de compensación de dosis es todavía difícil evaluar si una especie con compensación de dosis incompleta: 1) está en proceso de establecer tasas óptimas de transcripción de cada gen en los cromosomas X/Z del sexo homogamético para igualar la expresión del sexo heterogamético o, 2) si este último, es quien debe alcanzar la dosis en el sexo homogamético (Mank, 2013). Por ejemplo, las aves no demuestran signos de una selección a favor de los mecanismos de compensación de dosis en los estratos más jóvenes ni en los más antiguos, por el contrario, los niveles de expresión en el sexo homogamético (machos) aumenta en los estratos más antiguos (Wright et al., 2012).

Pasar de un GSD degenerado a un nuevo GSD puede ser favorable cuando el sistema de determinación ancestral que está altamente degenerado - como sería el caso de la familia *Corytophanidae* (Acosta y Cortez et al., 2019) -- ya que lo que en un inicio es una ventaja evolutiva, el tener cromosomas

sexuales en ambientes cambiantes, pasa a ser una carga genética, lo que se conoce como la “toxicidad del cromosoma Y”. Esta toxicidad del cromosoma Y, inicia cuando la falta de recombinación homóloga entre los cromosomas sexuales permite la duplicación descontrolada de elementos transponibles, lo cual puede provocar el silenciamiento de genes dentro del cromosoma Y. Dada la aleatoriedad de los mecanismos de multiplicación de los transposones, éstos pueden o no silenciar genes de importancia para la determinación del sexo, adicional a la ausencia de los mecanismos para corregir las mutaciones ocasionadas por los transposones. Dentro del cromosoma Y, los transposones se convierten en un riesgo constante, además de acumular muchas secuencias repetidas con el paso del tiempo, provocan un silenciamiento masivo de los genes funcionales del cromosoma Y (Bachtrog et al., 2020).

En análisis preliminares de transcriptómica dentro de nuestro laboratorio con *Urusaaurus bicarinatus* (lagartija de árbol del Pacífico) y *Gambelia wislizenii* (lagartija leopardo de nariz larga), pude identificar en *Urusaaurus* ocho transcritos específicos del macho contra 20 de las hembras, mientras que para *Gambelia* encontré un total de tres transcritos específicos de machos contra 12 de la hembra. Estos resultados podrían indicar la presencia de un sistema ZW en ambas especies y, por lo tanto, una transición de sistema XY ancestral de Iguania al igual que los *Corytophanidae*. Cabe destacar que es necesario aplicar la metodología completa empleada en *Corytophanidae* (Acosta y Cortez et al., 2019a) y *Eulamprus* (Acosta y Cortez et al., 2020), en donde la secuenciación de genoma de ambas especies nos permitirá tener una visión más amplia a través de la reconstrucción del genoma, el análisis de cobertura de los cromosomas reconstruidos y aplicar el método de sustracción de transcriptoma para identificar los genes propios del sexo heterogamético, así como análisis de expresión del nuevo sistema que nos brindará más información sobre el sistema de compensación de dosis de un posible sistema ZW. El estudio de éstas y otras especies, nos dará más detalles sobre el destino evolutivo de los cromosomas sexuales altamente degenerados, no sólo en el infraorden Iguania, sino también en diversos grupos de vertebrados como mamíferos, aves y anfibios quienes presentan cromosomas sexuales ancestrales altamente degenerados.

Caracterización del sistema de determinación sexual en el género *Eulamprus*

Recientes estudios basados en evidencia citogenética y molecular demostraron que especies de camaleones (Giovannotti et al., 2017), varanidos (Iannucci et al., 2019), lacértidos (Rovatsos et al., 2016) y scincidos (Acosta y Cortez et al., 2020) que se aseguraba tenían TSD, realmente presentan cromosomas sexuales. Es aquí cuando las herramientas moleculares, citogenéticas, transcriptómicas y genómicas actuales pueden permitir la caracterización de sistemas de determinación sexual con cromosomas crípticos difíciles de detectar, ya sea por la presencia de cromosomas sexuales homomórficos o de microcromosomas.

Hasta el presente trabajo, diversos estudios trataron caracterizar el sistema de determinación sexual del género *Eulamprus* mediante el uso de cariotipos e incubación de huevos (Ota y Lue, 1994; O' Connor et al., 2003; Shine, 2004). Ambos resultados parecían apuntar a la ausencia de cromosomas sexuales y una marcada presencia de TSD bajo temperaturas de incubación superiores a 32°C (Robert y Thompson, 2001). Debido a que las especies pertenecientes este género viven en climas fríos (12 – 15°C) es difícil pensar que TSD fuese el único tipo de determinación sexual en estos organismos. Por lo anterior decidimos realizar la caracterización del sistema de determinación sexual del género *Eulamprus* siguiendo la metodología empleada previamente en *B. vittatus* (Acosta y Cortez et al., 2019a).

El primer esfuerzo hacía la caracterización del sistema de determinación sexual en *Eulamprus* consistió en el uso del genoma de *A. carolinensis* como referencia y mediante el uso de análisis de cobertura identifique la presencia cromosomas sexuales heteromórficos, a diferencia de los resultados obtenidos con *B. vittatus* (Acosta y Cortez et al., 2019a), en donde los machos presentan la mitad de cobertura con respecto a las hembras en el cromosoma 5, esta diferencia de coberturas es propia de un sistema XY. Lo anterior puede significar que, a diferencia de los *Corytophanidae*, en *Eulamprus* los equivalentes cromosomales al cromosoma X en su sistema de determinación actual siguen manteniendo una alta sintenia en bloques. Adicionalmente, pudimos ubicar los ortólogos de los genes Y en *G. gallus* con ayuda de la base de datos Ensembl

(Yates et al., 2020) los cuales demostraron una alta sintenia en bloques con el cromosoma 1 de esta especie.

Aplicando el método de sustracción de transcriptoma desarrollados por Marin y Cortez et al. (2017), mismo que fue utilizado previamente *Corytophanidae* (Acosta y Cortez et al., 2019a), pudimos corroborar la presencia de 14 genes específicos del macho propios de un nuevo sistema XY y mediante el uso de la técnica de PCR genómica pudimos elucidar que estos genes sólo están presentes en machos (Acosta y Cortez et al., 2020).

Lo anterior puede significar que los cromosomas sexuales en *Eulamprus* son jóvenes o simplemente no han tenido una pérdida de genes lo suficientemente considerable para que éstos pasen a ser cromosomas heteromórficos, aún cuando las regiones donde se encuentran los genes determinantes del sexo en *Eulamprus* están bien diferenciadas (Acosta y Cortez et al., 2020), lo cual explicaría la falta de detección de este tipo de cromosomas en los cariotipos (Ota y Lue, 1994; O' Connor et al., 2003).

Como he propuesto anteriormente, el uso de técnicas como BAC-FISH podrían ser empleadas en un futuro para identificar y corroborar la exacta ubicación de los genes que determinan el sexo y los cromosomas sexuales en *Eulamprus*, ayudándonos a dilucidar si estos realmente pertenecen a cromosoma sexuales homomórficos.

Mediante el alineamiento con las secuencias ortólogas de los genes del nuevo cromosoma Y de *Eulamprus* y las bases de datos del NCBI Gene Bank los genes ortólogos en vertebrados, y la función reportada para éstos en la base de datos de Genecards. Los resultados apuntan a *PPP1R12A*, un gen codificante para un complejo proteico esencial para la fertilidad en ratones (Silva et al., 2015), como el principal candidato a un gen regulador maestro. Sin embargo, es necesario confirmar mediante métodos experimentales alternativos si este gen realmente es un gen regulador maestro.

La transición de oviparidad a viviparidad ha ocurrido a través de diversos linajes como peces (Goodwin et al., 2002; Reynolds et al., 2002; Reznick et al., 2002), anfibios (Duellman y Trueb, 1986), reptiles (Fitch, 1970; Shine, 1985; de Fraipont et al., 1996; Blackburn, 2000) y mamíferos (Hodges, 2004). En reptiles,

en Squamata (serpientes y lagartos) ha evolucionado al menos 95 veces (Shine, 1985; Sities, 2011; Pyron y Burbrink, 2014) en eventos independientes. Las causas y factores que han llevado a la evolución de la viviparidad en reptiles aún se desconocen (Hodges, 2004). Sin embargo, la teoría más aceptada es el modelo del clima frío (Tinkle y Gibbons, 1977), que establece que la viviparidad evolucionó como una respuesta adaptativa a los climas fríos, que se correlacionan con las latitudes y altitudes elevadas.

La hipótesis del clima frío se basa en tres principios: 1) que las especies vivíparas comprenden una mayor proporción de todas las especies registradas a grandes altitudes, 2) que los orígenes de la viviparidad puede haber surgido como una respuesta adaptativa de especies que comenzaron a invadir regiones cada vez más elevadas, y 3) que entre mayor latitud y altitud las temperaturas se vuelven cada vez más frías (Tinkle y Gibbons, 1977; Shine y Bull, 1979; Blackburn, 1982; Shine, 1985; Andrews, 2000).

Como propone Robert (2003), las especies vivíparas, al presentar temperaturas relativamente estables durante la gestación, incluso viviendo en climas templados, no se espera que presenten TSD ya que pueden presentar sesgos en las proporciones de sexos. Por lo que *Eulamprus* había sido documentada como la única especie vivípara ectoterma con TSD viviendo en climas fríos, con latitudes y altitudes grandes (Shine, 2004). Sin embargo, en nuestro trabajo (Acosta y Cortez et al., 2020) demostramos que *Eulamprus* tiene TSD y un sistema GSD con cromosomas sexuales XY, mismo que le permite vivir en condiciones climáticas extremas sin que se vea afectada su proporción de sexo.

Nuestro estudio (Acosta y Cortez et al., 2020) corresponde con la hipótesis del clima frío, en donde la viviparidad en *Eulamprus* pudo surgir en respuesta adaptativa de la especie a invadir regiones de climas fríos, y como adición a esta teoría en especies ectotermicas como los reptiles la transición de un TSD a GSD es la respuesta para evitar la aparición de sesgos en las proporciones de sexos. Por lo tanto, la temperatura, latitud y altitud a la que viven los reptiles puede servir como indicador para determinar si las especies poseen un sistema de determinación por cromosomas sexuales o TSD, así como si son o no vivíparas.

La familia de los genes *Dmrt*, genes involucrados en las vías de determinación sexual se mantiene ampliamente conservada en vertebrados e invertebrados de todo el reino animal (Kopp, 2012; Wexler et al., 2014; Picard et al., 2015, 2021). Los miembros de la familia *Dmrt* fueron descubiertos por primera vez en *C. elegans* y *D. melanogaster*, y posteriormente se encontró en diversas especies de Cnidaria (medusas), lo cual sugiere que esta familia de genes se originó en el ancestro en común de los Eumetazoa, y más tarde se diversificó independientemente en animales bilaterales y no bilaterales (Wexler et al., 2014). Adicionalmente, un homólogo del gen *Dmrt1* en humanos ha sido descrito en la esponja *Corticium candelabrum*, como el gen más antiguo de la familia *Dmrt* (Riesgo et al., 2014). Los miembros de esta familia no solo se han descrito como genes específicos del sexo en vertebrados, si no también, en diversas especies de metazoos (Kopp, 2012; Picard et al., 2015). En crustáceos como *Daphnia magna*, han sido descritos como un gen regulador maestro, e incluso en especies hermafroditas como los platelmintos *Schmidtea mediterranea* forman parte del desarrollo de la gónada masculina (Chong et al., 2013).

Aunque menos estudiados, los genes de la familia *Sox*, *fem-1* y *Amh/Amhr2*, genes involucrados en las cascadas de determinación sexual, se han encontrado en diferentes especies de vertebrados (Picard et al., 2021). La mayor parte de los trabajos con estas familias de genes están enfocados en organismos modelos como *C. elegans* y algunos insectos (Herpin y Schartl, 2015).

Se ha documentado que en algunas especies de reptiles con GSD, incluyendo especies del género *Eulamprus*, cuando los embriones son sometidos a temperaturas extremas (>30°C), genes determinantes del sexo termosensibles se activan cambiando el destino genético marcado por lo cromosomas sexuales, generando sesgos hacia solo machos o hembras (Quinn et al., 2007; Holleley et al., 2015; Shine et al., 2002; Radder et al., 2008; Robert y Thompson, 2001; Hill et al., 2018).

Es posible que los genes involucrados en la determinación del sexo en los sistemas TSD, al igual que las familias *Dmrt*, *Sox*, *fem-1* y *Amh/Amhr2*, estén bien conservados dentro de las especies de reptiles y sólo mediante la

incubación de los huevos a temperaturas extremas se active la expresión de estos genes; es posible que más de un sistema TSD/GSD falte por ser reportado. Estudios futuros enfocados en especies del género *Eulamprus* u otras especies con sistemas TSD y GSD compartidos, así como la incubación de huevos en especies cercanas a las mismas, podrían darnos más información sobre la evolución de los sistemas de determinación sexual en reptiles. Un primer esfuerzo para tratar de detectar la presencia de los sistemas TSD compartidos con GSD, está siendo llevado a cabo con ejemplares de embriones de *B. vittatus*, en colaboración con el Dr. Oswaldo Hernández del laboratorio de herpetología de la Facultad de Ciencias de La UNAM. Sin embargo, los resultados preliminares no son conclusivos como para ser incluidos en el presente trabajo de tesis.

Esta bien documentado que los genes reguladores maestros una vez que aparecen suelen conservarse a través de las especies, por ejemplo, el gen *Sry* es común a casi todos los mamíferos placentarios y marsupiales (Sinclair et al., 1990), en monotremas es el gen *AMHY* (Cortez et al., 2014), en aves es el gen *Dmrt1* (Sinclair et al., 1990) y en reptiles el mejor candidato es el gene *PPP1CCY* que se encuentra en los Pleurodontes (Martin y Cortez et al., 2017). Otro buen candidato es *PPP1R12A* que se encuentra en los scincidos (Acosta y Cortez et al., 2020; Thépot, 2021). Futuros trabajos enfocados en CRISPR-Cas9 podrían dilucidar si *PPP1CCY* o *PPP1R12A* son genes reguladores maestros del sexo.

¿Cuáles son los factores que pueden estar involucrados en la transición de un sistema de determinación sexual a otro?

Existen diversas fuerzas y mecanismos evolutivos que se piensa pueden estar involucrados en las transiciones de determinación sexual. Por ejemplo, en poblaciones con tamaños efectivos pequeños, es posible que un nuevo par de cromosomas sexuales se fije por deriva genética (Saunders et al., 2018). En poblaciones con sesgos entre los sexos, la selección natural favorecerá el establecimiento de cromosomas sexuales que incrementen la producción del

sexo en menor cantidad dentro de las poblaciones (Veller et al., 2017). O una mutación de cambio de sexo que surja en los cromosomas autosomales cerca de un locus bajo selección sexual antagonista puede llevar a que se forme un neo-cromosoma sexual y provocar el reemplazo del sistema de determinación sexual vigente (van Doorn et al., 2010). Sin embargo, cuál de estas fuerzas es la que influye realmente o tiene mayor peso durante las transiciones es todavía un tema de discusión (Saunders et al., 2018).

Dado a que sólo podemos ver una pequeña fracción en el tiempo evolutivo en los sistemas de determinación sexual y sus dinámicas a través del tiempo, hay muchos detalles de estos procesos que aún no conocemos (Roberts et al., 2009). Saunders et al. (2018) propuso el análisis de especies poligenéticas para tratar de dilucidar esta problemática, ya que son especies que tienen dos sistemas de determinación sexual dentro de sus poblaciones, y que pueden brindar información de cómo los sistemas de determinación sexual se fijan en las poblaciones durante el proceso de transición. Sin embargo, la poca información y entendimiento de los estos sistemas poligénicos, además del reducido número de especies que los presentan, dificulta el uso de este modelo.

Cálculo de la edad de los cromosomas sexuales

La existencia de múltiples mecanismos de determinación sexual a lo largo del árbol de la vida implica que estos sistemas no son estables y pueden sufrir transiciones. En los sistemas de determinación sexual genotípicos, la edad de los cromosomas X y Y se pueden estimar comparando las tasas de sustitución sinónimas entre los cromosomas sexuales, ya que alguna vez fueron homólogos. Sin embargo, cuando hay eventos de transición de determinación sexual puede ser difícil estimar el tiempo de los cromosomas sexuales jóvenes (McGrath, 2019).

En muchos vertebrados, los gametos masculinos experimentan más ciclos de replicación que los gametos femeninos, lo que lleva a una tasa de mutación más alta en el cromosoma Y. Mientras que, en hembras la tasa de mutación de los cromosomas X es más baja (Hurst y Ellegren, 1998; Makova y Li, 2002). Por lo que la tasa de mutación de los cromosomas sexuales

ancestrales puede permitirnos fechar la pérdida y aparición de los cromosomas sexuales (Acosta y Crotez et al., 2019b).

Al comparar las tasas de sustitución neutras de los genes autosómicos de los que antes eran cromosomas sexuales ancestrales, debería ser más baja en comparación con los cromosomas autosómicos que nunca han sido cromosomas sexuales. Para comprobar nuestra hipótesis, utilizamos el modelo en mamíferos placentarios (que tienen un sistema XY) usando como grupo externo a los monotremas (que tiene un sistema X_5Y_5). Los resultados demostraron que las tasas de sustitución sinónimas eran significativamente más bajas en los genes ligados al cromosoma X que los genes ortólogos a éste en el ornitorrinco y el resto de las especies ajenas a los mamíferos. Nuestras simulaciones son consistentes con los estudios previos basados en otros métodos (Cortez et al., 2014), en donde se demuestra que los ornitorrincos nunca compartieron el mismo sistema XY de los placentarios y que este sistema es de origen independiente (Acosta y Cortez et al., 2019b).

Usando tres especies de pleurodontes y los ortólogos autosómicos de tres especies de acrodontes, los resultados demostramos que las tasas de mutación de los genes del cromosoma X de los pleurodontes son más baja que los cromosomas autosómicos del grupo externo (especies de serpientes que nunca han compartido el sistema XY de pleurodontes), lo cual concuerda con los supuestos del sesgo de mutación masculina. En cambio, los acrodontes presentan tasas de mutación intermedias entre los genes ligados a los cromosomas X de los pleurodontes y los genes autosómicos del grupo externo. Estos resultados sugieren que los acrodontes compartieron el sistema XY de los pleurodontes durante algún tiempo antes pasar por una transición de determinación sexual (Acosta y Cortez et al., 2019b). Es importante destacar que aún cuando nuestros resultados son sólidos y nos permiten conocer si dos grupos compartieron el mismo sistema de determinación sexual y/o pasaron por transiciones, la falta de datos de secuenciación no nos permite estimar de forma más precisa la fuerza del sesgo de mutación masculina, por lo que las estimaciones en los tiempos en que surgieron dichos procesos evolutivos pueden ser poco precisas. Sin embargo, obteniendo más datos de secuenciación de estos grupos poco documentados puede aumentar la resolución de las

estimaciones de nuestro modelo, haciendo cada vez más precisa la estimación de las transiciones.

A pesar de estas limitaciones, es importante destacar que este método ofrece una gran promesa para los análisis futuros de los sistemas de determinación sexual. Este novedoso método puede ser muy útil en linajes que presentan sesgo de mutación masculina, donde se sospecha han ocurrido una transición de terminación sexual. Los resultados obtenidos pueden ayudar a reconstruir la historia evolutiva de los sistemas de determinación sexual y la velocidad a la que los cromosomas sexuales aparecen o desaparecen. Adicionalmente, mediante el uso de este método en otras especies podría conducir en última instancia a respuestas sobre cuánto duran los cromosomas sexuales y si estos tienen una fecha de vencimiento, proporcionando así nuevos conocimientos sobre los procesos evolutivos que impulsan a las transiciones de determinación sexual.

9. CONCLUSIONES

1. Los estudios de linajes con variabilidad en los sistemas de determinación sexual ofrecen una excelente oportunidad para el estudio de las transiciones y merecen especial atención en los estudios evolutivos referentes a los sistemas de determinación sexual.

2. Los *Corytophanidae* poseen cromosomas sexuales XY, que se originaron después de una transición del sistema de determinación sexual ancestral altamente degenerado de Iguania. Este estudio empírico va acorde con los supuestos de la “hipótesis de la fragilidad del cromosoma Y” propuesta por Blackmon y Demuth (2015). Estudios parciales en *Urusaurus bicarinatus* y *Gambelia wislizenii* indican puede haber más transiciones que aún no han sido reportadas.

3. Los sistemas de determinación sexual jóvenes, como los de los *Corytophanidae*, suelen presentar sistemas de compensación de dosis incompletos, mientras que los sistemas más viejos han evolucionado a sistemas de compensación completos.

4. El sistema de determinación sexual en *Corytophanidae* surgió hace aproximadamente 62 millones de años y se mantiene en al menos dos de los tres géneros actuales de esta familia: *Basiliscus* y *Coritophanes*.

5. Los reptiles vivíparos del género *Eulamprus* cuenta con un par de cromosomas sexuales XY compartido con un sistema TSD. Este sistema de cromosomas sexuales surgió hace aproximadamente 93 a 116 millones de años. Este estudio realizado en *Eulamprus* (Acosta y Cortez et al., 2019b) afirma la idea de que las especies vivíparas ectotérmicas necesitan la presencia de un sistema GSD para la determinación del sexo en ambientes con climas fríos.

6. Los acrodontes compartieron el mismo sistema de determinación sexual que los pleurodontes (Iguania) pero éstos sufrieron una transición de GSD

a TSD y actualmente la comparten este sistema de determinación sexual con un sistema GSD.

7. Con el uso de las tasas de sustitución sinónimas, el sesgo de mutación masculina y el modelo desarrollado en el presente proyecto (Acosta y Cortez et al., 2019b) podemos estimar el tiempo en el que surgieron y se perdieron cromosomas sexuales. Adicionalmente, podemos identificar transiciones a través de la historia evolutiva de las especies.

10. PERSPECTIVAS

- Comprobar mediante incubaciones a diferentes temperaturas, la presencia o ausencia de determinación sexual por temperatura compartida con cromosomas sexuales en las diferentes especies del infraorden Iguania.
- Determinar los factores que participan en la compensación de dosis incompleta de los cromosomas sexuales en *B. vittatus* mediante el uso de Hi-C.
- Hacer uso de BAC-FISH para identificar los cromosomas sexuales de *Corytophanidae* y *Eulamprus* para dilucidar si pertenecen a microcromosomas o macrocromosomas homomórficos.
- Implementar el método de cálculo de edad usando el sesgo de mutación masculina en diferentes especies o vertebrados para examinar potenciales transiciones entre sistemas de cromosomas sexuales.
- Secuenciar los genomas de *U. bicarinatus* y *G. wislizenii* para poder realizar la caracterización e identificar si los resultados corresponden a la aparente transición de sistema de determinación sexual a cromosomas del tipo ZW.
- Ampliar los estudios en el infraorden Iguania a través de la caracterización de los sistemas de determinación sexual de diferentes especies que, al igual que en *Corytophanidae*, podrían haber seguido transiciones.

11. REFERENCIAS

- Acosta, A., Martínez-Pacheco, M. L., Díaz-Barba, K., Porras, N., Gutiérrez-Mariscal, M., & Cortez, D. (2019b). Deciphering ancestral sex chromosome turnovers based on analysis of male mutation bias. *Genome biology and evolution*, 11(11), 3054-3067.
- Acosta, A., Suárez-Varón, G., Rodríguez-Miranda, L. A., Lira-Noriega, A., Aguilar-Gómez, D., Gutiérrez-Mariscal, M., ... & Cortez, D. (2019a). Corytophanids replaced the pleurodont XY system with a new pair of XY chromosomes. *Genome biology and evolution*, 11(9), 2666-2677.
- Agulnik, A. I., Bishop, C. E., Lerner, J. L., Agulnik, S. I., & Solovyev, V. V. (1997). Analysis of mutation rates in the SMCY/SMCX genes shows that mammalian evolution is male driven. *Mammalian genome*, 8(2), 134-138.
- Aitken, R.J. & Graves, J.A.M. (2002.) The future of sex. *Nature* 415: 963.
- Akagi, T., Henry, I.M., Tao, R. y Comai L. (2014). Plant genetics. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* 346(6209): 646-650.
- Akimori, D. G., Dalessandro, E. J., Nolan, T. J., Stieha, C. R., Lok, J. B., & Stoltzfus, J. D. (2021). Transcriptional profiles in *Strongyloides stercoralis* males reveal deviations from the *Caenorhabditis* sex determination model. *Scientific reports*, 11(1), 1-16.
- Alam, S. M. I., Altmanová, M., Prasongmaneerut, T., Georges, A., Sarre, S. D., Nielsen, S. V., ... & Ezaz, T. (2020). Cross-species BAC mapping highlights conservation of chromosome synteny across dragon lizards (Squamata: Agamidae). *Genes*, 11(6), 698.
- Alexander, H. J., Richardson, J. M. L., Edmands, S., & Anholt, B. R. (2015). Sex without sex chromosomes: genetic architecture of multiple loci independently segregating to determine sex ratios in the copepod *Tigriopus californicus*. *Journal of evolutionary biology*, 28(12), 2196-2207.
- Alföldi, J., Di Palma, F., Grabherr, M., Williams, C., Kong, L., Mauceli, E., ... & Lindblad-Toh, K. (2011). The genome of the green anole lizard and a

- comparative analysis with birds and mammals. *Nature*, 477(7366), 587-591.
- Alföldi, J., Di Palma, F., Grabherr, M., Williams, C., Kong, L., Mauceli, E., ... & Lindblad-Toh, K. (2011). The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature*, 477(7366), 587-591.
 - Alonso-Alvarez, C. (2006). Manipulation of primary sex-ratio: an updated review. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 17(1), 1.
 - 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(3), 618-633.
 - Altmanová, M., Rovatsos, M., Pokorná, M. J., Veselý, M., Wagner, F., & Kratochvíl, L. (2018). All iguana families with the exception of basilisks share sex chromosomes. *Zoology*, 126, 98-102.
 - Alves, C., Carvalho, F., Cremades, N., Sousa, M., & Barros, A. (2002). Unique (Y; 13) translocation in a male with oligozoospermia: cytogenetic and molecular studies. *European Journal of Human Genetics*, 10(8), 467-474.
 - Anderson, J. L., Rodríguez Marí, A., Braasch, I., Amores, A., Hohenlohe, P., Batzel, P., & Postlethwait, J. H. (2012). Multiple sex-associated regions and a putative sex chromosome in zebrafish revealed by RAD mapping and population genomics. *PloS one*, 7(7), e40701.
 - Anderson, N. W., Hjelman, C. E., & Blackmon, H. (2020). The probability of fusions joining sex chromosomes and autosomes. *Biology letters*, 16(11), 20200648.
 - Andrade, P., Pinho, C., i de Lanuza, G. P., Afonso, S., Brejcha, J., Rubin, C. J., ... & Carneiro, M. (2019). Regulatory changes in pterin and carotenoid genes underlie balanced color polymorphisms in the wall lizard. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(12), 5633-5642.
 - Arakawa, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Sutou, S., & Suzuki, H. (2002). X-chromosomal localization of mammalian Y-linked genes in two

- XO species of the Ryukyu spiny rat. *Cytogenetic and genome research*, 99(1-4), 303-309.
- Arakawa, Y., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y., Sutou, S., & Suzuki, H. (2002). X-chromosomal localization of mammalian Y-linked genes in two XO species of the Ryukyu spiny rat. *Cytogenetic and genome research*, 99(1-4), 303-309.
 - Ardlie, K. G., & Silver, L. M. (1998). Low frequency of t haplotypes in natural populations of house mice (*Mus musculus domesticus*). *Evolution*, 52(4), 1185-1196.
 - Arnold, A. P., Itoh, Y., & Melamed, E. (2008). A bird's-eye view of sex chromosome dosage compensation. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 109-127.
 - Arunkumar, K. P., Mita, K., & Nagaraju, J. (2009). The silkworm Z chromosome is enriched in testis-specific genes. *Genetics*, 182(2), 493-501.
 - Arunkumar, K. P., Tomar, A., Daimon, T., Shimada, T., & Nagaraju, J. (2008). WildSilkbase: an EST database of wild silkmoths. *BMC genomics*, 9(1), 1-9.
 - Augstenová, B., Mazzoleni, S., Kratochvíl, L., & Rovatsos, M. (2018). Evolutionary dynamics of the W chromosome in caenophidian snakes. *Genes*, 9(1), 5.
 - Austin, B. U. R. T., Trivers, R., & Burt, A. (2009). *Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements*. Harvard University Press.
 - AVIBASE (2020). <https://avibase.bsc-eoc.org/avibase.jsp?lang=EN>.
 - Axelsson, E., Webster, M. T., Smith, N. G., Burt, D. W., & Ellegren, H. (2005). Comparison of the chicken and turkey genomes reveals a higher rate of nucleotide divergence on microchromosomes than macrochromosomes. *Genome research*, 15(1), 120-125.
 - Bachtrog, D. (2013). Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nat. Rev. Genet.* 14, 113-124.
 - Bachtrog, D., & Charlesworth, B. (2002). Reduced adaptation of a non-recombining neo-Y chromosome. *Nature*, 416(6878), 323-326.

- Bachtrog, D., Hom, E., Wong, K. M., Maside, X., & de Jong, P. (2008). Genomic degradation of a young Y chromosome in *Drosophila miranda*. *Genome biology*, 9(2), 1-10.
- Bachtrog, D., Mank, J. E., Peichel, C. L., Kirkpatrick, M., Otto, S. P., Ashman, T. L., ... & Tree of Sex Consortium. (2014). Sex determination: why so many ways of doing it?. *PLoS biology*, 12(7), e1001899.
- Badyaev, A. V., Schwabl, H., Young, R. L., Duckworth, R. A., Navara, K. J., & Parlow, A. F. (2005). Adaptive sex differences in growth of pre-ovulation oocytes in a passerine bird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1577), 2165-2172.
- Baker, B. S., Gorman, M., & Marin, I. (1994). Dosage compensation in *Drosophila*. *Annual review of genetics*, 28(1), 491-521.
- Baker, D. A., Nolan, T., Fischer, B., Pinder, A., Crisanti, A., & Russell, S. (2011). A comprehensive gene expression atlas of sex-and tissue-specificity in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *BMC genomics*, 12(1), 1-12.
- Bakloushinskaya, I., & Matveevsky, S. (2018). Unusual ways to lose a Y chromosome and survive with changed autosomes: A story of mole voles *Ellobius* (Mammalia, Rodentia). *OBM Genetics*, 2(3), 1-1.
- Baroiller, J. F., Chourrout, D., Fostier, A., & Jalabert, B. (1995). Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Journal of experimental zoology*, 273(3), 216-223.
- Baroiller, J. F., D'Cotta, H., & Saillant, E. (2009). Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sexual development*, 3(2-3), 118-135.
- Barton, N. H. (2000). Genetic hitchhiking. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1403), 1553-1562.
- Bateman, A. W., & Anholt, B. R. (2017). Maintenance of polygenic sex determination in a fluctuating environment: an individual-based model. *Journal of evolutionary biology*, 30(5), 915-925.

- Beatty, J. (1992). *Random drift: Keywords in evolutionary biology*. Cambridge (MA).
- Bell, G. (1982). *The Masterpiece of Nature: the Evolution and Genetics of Sexuality* CroomHelm. *London and Canberra*.
- Bellott, D. W., Hughes, J. F., Skaletsky, H., Brown, L. G., Pyntikova, T., Cho, T. J., ... & Page, D. C. (2014). Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature*, *508*(7497), 494-499.
- Belton, J. M., McCord, R. P., Gibcus, J. H., Naumova, N., Zhan, Y., & Dekker, J. (2012). Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes. *Methods*, *58*(3), 268-276.
- Berec, L., Schembri, P. J., & Boukal, D. S. (2005). Sex determination in *Bonellia viridis* (Echiura: Bonelliidae): population dynamics and evolution. *Oikos*, *108*(3), 473-484.
- Bergero, R., & Charlesworth, D. (2009). The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends in ecology & evolution*, *24*(2), 94-102.
- Bergero, R., Charlesworth, D., Filatov, D. A., & Moore, R. C. (2008). Defining regions and rearrangements of the *Silene latifolia* Y chromosome. *Genetics*, *178*(4), 2045-2053.
- Berlin, S., & Ellegren, H. (2006). Fast accumulation of nonsynonymous mutations on the female-specific W chromosome in birds. *Journal of molecular evolution*, *62*(1), 66.
- Berlin, S., Tomaras, D., & Charlesworth, B. (2007). Low mitochondrial variability in birds may indicate Hill–Robertson effects on the W chromosome. *Heredity*, *99*(4), 389-396.
- Bernstein, H., Bernstein, C., & Michod, R. E. (2011). Meiosis as an evolutionary adaptation for DNA repair. *DNA repair*, 357-382.
- Betancur-R, R., Broughton, R. E., Wiley, E. O., Carpenter, K., López, J. A., Li, C., ... & Ortí, G. (2013). The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLoS currents*, *5*.
- Beukeboom, L. W., & Perrin, N. (2014). *The evolution of sex determination*. Oxford University Press, USA.

- Bewick, A. J., Anderson, D. W., & Evans, B. J. (2011). Evolution of the closely related, sex-related genes DM-W and Dmrt1 in African clawed frogs (*Xenopus*). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 65(3), 698-712.
- Blackburn, D. G., & Evans, H. E. (1986). Why are there no viviparous birds?. *The American Naturalist*, 128(2), 165-190.
- Blackmon, H., & Demuth, J. P. (2014). Estimating tempo and mode of Y chromosome turnover: explaining Y chromosome loss with the fragile Y hypothesis. *Genetics*, 197(2), 561-572.
- Blackmon, H., & Demuth, J. P. (2015). The fragile Y hypothesis: Y chromosome aneuploidy as a selective pressure in sex chromosome and meiotic mechanism evolution. *BioEssays*, 37(9), 942-950.
- Blackmon, H., Ross, L., & Bachtrog, D. (2017). Sex determination, sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. *Journal of Heredity*, 108(1), 78-93.
- Blaser, O., Neuenschwander, S., & Perrin, N. (2014). Sex-chromosome turnovers: The hot-potato model. *The American Naturalist*, 183(1), 140–146.
- Blaser, O., Grossen, C., Neuenschwander, S., & Perrin, N. (2013). Sex-chromosome turnovers induced by deleterious mutation load. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 67(3), 635–645.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Borodin, P. M., Basheva, E. A., Torgasheva, A. A., Dashkevich, O. A., Golenishchev, F. N., Kartavtseva, I. V., ... & Dumont, B. L. (2012). Multiple independent evolutionary losses of XY pairing at meiosis in the grey voles. *Chromosome research*, 20(2), 259-268.
- Britton-Davidian, J., Robinson, T. J., & Veyrunes, F. (2012). Systematics and evolution of the African pygmy mice, subgenus *Nannomys*: a review. *Acta Oecologica*, 42, 41-49.
- Bull, J. J. (1983). *Evolution of sex determining mechanisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc..

- Burgin, C.J., Colella, J.P., Kahn, P.L. & Upham, N.S. (2018). How many species of mammals are there? *J. Mammal.* 99, 1-11
- Burt, A. & Trivers, R. (2006). *Genes in conflict*. The Bleknap Press of Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts/London, England.
- Burt, D. W. (2002). Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenetic and genome research*, 96(1-4), 97-112.
- Cameron, R., & Wyatt, R. (1990). Spatial Patterns and Sex Ratios in Dioecious and Monoecious Mosses of the Genus *Splachnum*. *The Bryologist*, 93(2), 161-166. doi:10.2307/3243620
- Carabajal Paladino, L. Z., Provazníková, I., Berger, M., Bass, C., Aratchige, N. S., López, S. N., ... & Nguyen, P. (2019). Sex chromosome turnover in moths of the diverse superfamily Gelechioidea. *Genome biology and evolution*, 11(4), 1307-1319.
- Carey, S. B., Jenkins, J., Lovell, J. T., Maumus, F., Sreedasyam, A., Payton, A. C., ... & McDaniel, S. F. (2021). Gene-rich UV sex chromosomes harbor conserved regulators of sexual development. *Science advances*, 7(27), eabh2488.
- Carrel, L., & Willard, H. F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 434(7031), 400-404.
- Carroll, L. S., Meagher, S., Morrison, L., Penn, D. J., & Potts, W. K. (2004). Fitness effects of a selfish gene (the *Mus t* complex) are revealed in an ecological context. *Evolution*, 58(6), 1318-1328.
- Carson, H. L. (1956). A female-producing strain of *Drosophila borealis*. *Patterson. Drosoph. Infect. Serv.*, 30, 109-110.
- Carvalho, A. B. (2002). Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. *Current opinion in genetics & development*, 12(6), 664-668.
- Cavalcanti, A. G. L., Falcao, D. N., & Castro, L. E. (1958). The interaction of nuclear and cytoplasmic factors in the inheritance of the "sex-ratio" character in *Drosophila prosaltans*. *Publicações da Faculdade Nacional de Filosofia Série Científica*, 1, 1-54.

- Charlesworth, B. (1978). Model for evolution of Y chromosomes and dosage compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(11), 5618-5622.
- Charlesworth, B. (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current biology*, 6(2), 149-162.
- Charlesworth, B., & Charlesworth, D. (2000). The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1403), 1563-1572.
- Charlesworth, B., Morgan, M. T., & Charlesworth, D. (1993). The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics*, 134(4), 1289-1303.
- Charlesworth, D., & Mank, J. E. (2010). The birds and the bees and the flowers and the trees: lessons from genetic mapping of sex determination in plants and animals. *Genetics*, 186(1), 9-31.
- Charlesworth, D., & Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature reviews genetics*, 10(11), 783-796.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., & Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95(2), 118-128.
- Chong, T., Collins, J. J., Brubacher, J. L., Zarkower, D., & Newmark, P. A. (2013). A sex-specific transcription factor controls male identity in a simultaneous hermaphrodite. *Nature communications*, 4(1), 1-12.
- Christidis, L., Aves, I.N., John, B., Kayano, H. & Levan, A. (1990). *Animal cytogenetics, vol. 4: chordata 3*. Gebrüder Borntraeger
- Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., ... & Lovell-Badge, R. (1996). A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development*, 122(2), 509-520.
- Comeron, J. M., & Kreitman, M. (2002). Population, evolutionary and genomic consequences of interference selection. *Genetics*, 161(1), 389-410.
- Conover, D. O., & Heins, S. W. (1987). Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. *Nature*, 326(6112), 496-498.

- Cornejo-Páramo, P., Dissanayake, D. S., Lira-Noriega, A., Martínez-Pacheco, M. L., Acosta, A., Ramírez-Suástegui, C., ... & Cortez, D. (2020). Viviparous reptile regarded to have temperature-dependent sex determination has old XY chromosomes. *Genome biology and evolution*, 12(6), 924-930.
- Cortez, D., Marin, R., Toledo-Flores, D., Froidevaux, L., Liechti, A., Waters, P. D., ... & Kaessmann, H. (2014). Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. *Nature*, 508(7497), 488-493.
- Craig, J. K., Foote, C. J., & Wood, C. C. (1996). Evidence for temperature-dependent sex determination in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(1), 141-147.
- Cree, A., Thompson, M. B., & Daugherty, C. H. (1995). Tuatara sex determination. *Nature*, 375(6532), 543-543.
- De la Fuente, R., Parra, M. T., Viera, A., Calvente, A., Gómez, R., Suja, J. Á., ... & Page, J. (2007). Meiotic pairing and segregation of achiasmate sex chromosomes in eutherian mammals: the role of SYCP3 protein. *PLoS genetics*, 3(11), e198.
- Deakin, J. E., & Ezaz, T. (2019). Understanding the evolution of reptile chromosomes through applications of combined cytogenetics and genomics approaches. *Cytogenetic and Genome Research*, 157(1-2), 7-20.
- Disteche, C. M. (2006). High expression of the mammalian X chromosome in brain. *Brain research*, 1126(1), 46-49.
- Docker, M.F., Beamish, F.W.H., Yasmin, T., Bryan, M.B. & Khan, A. (2019). Chapter 1: the lamprey gonad. In Lampreys: biology, conservation and control (ed. Docker MF) Dordrecht, *The Netherlands: Springer*, pp. 1-186.
- Dod, B., Litel, C., Makoundou, P., Orth, A., & Boursot, P. (2003). Identification and characterization of t haplotypes in wild mice populations using molecular markers. *Genetics Research*, 81(2), 103-114.

- Donahue CSC, W. H. (1974). A karyotypic study of three species of Rajiformes (Chondrichthyes, Pisces). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 16(1), 203-211.
- Duploux, A., & Hornett, E. A. (2018). Uncovering the hidden players in Lepidoptera biology: the heritable microbial endosymbionts. *PeerJ*, 6, e4629.
- Duret, L. (2008). Neutral theory: the null hypothesis of molecular evolution. *Nature education*, 1, 803-806.
- Ekblom, R., & Wolf, J. B. (2014). A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evolutionary applications*, 7(9), 1026-1042.
- Elena, S. F., & Lenski, R. E. (2003). Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 4(6), 457-469.
- Ellegren, H. (2007). Characteristics, causes and evolutionary consequences of male-biased mutation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1606), 1-10.
- Ellegren, H. (2014). Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. *Trends in ecology & evolution*, 29(1), 51-63.
- Ellegren, H. (2014). Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. *Trends in ecology & evolution*, 29(1), 51-63.
- Ellegren, H., Smeds, L., Burri, R., Olason, P. I., Backström, N., Kawakami, T., ... & Wolf, J. B. (2012). The genomic landscape of species divergence in Ficedula flycatchers. *Nature*, 491(7426), 756-760.
- El-Mogharbel, N., Wakefield, M., Deakin, J.E., Tsend-Ayush, E., Grützner, F., Alsop, A., Ezaz, T. & Marshall Graves, J.A. (2007). *Dmrt* gene cluster analysis in the platypus: new insights into genomic organization and regulatory regions. *Genomics* 89, 10-21.
- Engelstädter, J., & Hurst, G. D. (2007). The impact of male-killing bacteria on host evolutionary processes. *Genetics*, 175(1), 245-254.
- Ercan, S., Giresi, P. G., Whittle, C. M., Zhang, X., Green, R. D., & Lieb, J. D. (2007). X chromosome repression by localization of the *C. elegans*

- dosage compensation machinery to sites of transcription initiation. *Nature genetics*, 39(3), 403-408.
- Ercan, S., Giresi, P. G., Whittle, C. M., Zhang, X., Green, R. D., & Lieb, J. D. (2007). X chromosome repression by localization of the *C. elegans* dosage compensation machinery to sites of transcription initiation. *Nature genetics*, 39(3), 403-408.
 - Evans, B. J., Pyron, R. A., & Wiens, J. J. (2012). Polyploidization and sex chromosome evolution in amphibians. In *Polyploidy and genome evolution* (pp. 385-410). Springer, Berlin, Heidelberg.
 - Evans, B.J., Upham, N.S., Golding, G.B., Ojeda, R.A. & Ojeda, A.A. (2017). Evolution of the largest mammalian genome. *Genome Biol. Evol.* 9, 1711-1724.
 - Ezaz, T., Moritz, B., Waters, P., Graves, J. A. M., Georges, A., & Sarre, S. D. (2009). The ZW sex microchromosomes of an Australian dragon lizard share no homology with those of other reptiles or birds. *Chromosome Research*, 17(8), 965-973.
 - Ezaz, T., Quinn, A. E., Miura, I., Sarre, S. D., Georges, A., & Graves, J. A. M. (2005). The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Research*, 13(8), 763-776.
 - Ezaz, T., Quinn, A. E., Sarre, S. D., O'Meally, D., Georges, A., & Graves, J. A. M. (2009). Molecular marker suggests rapid changes of sex-determining mechanisms in Australian dragon lizards. *Chromosome Research*, 17(1), 91-98.
 - Ezaz, T., Quinn, A. E., Sarre, S. D., O'Meally, D., Georges, A., & Graves, J. A. M. (2009). Molecular marker suggests rapid changes of sex-determining mechanisms in Australian dragon lizards. *Chromosome Research*, 17(1), 91-98.
 - Ezaz, T., Sarre, S. D., O'Meally, D., Graves, J. M., & Georges, A. (2009). Sex chromosome evolution in lizards: independent origins and rapid transitions. *Cytogenetic and genome research*, 127(2-4), 249-260.
 - Ezaz, T., Srikulnath, K., & Graves, J. A. M. (2017). Origin of amniote sex chromosomes: an ancestral super-sex chromosome, or common requirements?. *Journal of Heredity*, 108(1), 94-105.

- Fang, H., Disteche, C. M., & Berletch, J. B. (2019). X inactivation and escape: epigenetic and structural features. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 219.
- Feng, S., Stiller, J., Deng, Y., Armstrong, J., Fang, Q., Reeve, A. H., ... & Zhang, G. (2020). Dense sampling of bird diversity increases power of comparative genomics. *Nature*, 587(7833), 252-257.
- Filatov, D. A., & Charlesworth, D. (2002). Substitution rates in the X-and Y-linked genes of the plants, *Silene latifolia* and *S. dioica*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(6), 898-907.
- Fisher, R. A. (1930). The genetical theory of natural selection. *Oxford University Press*.
- Forsberg, L. A., Rasi, C., Malmqvist, N., Davies, H., Pasupulati, S., Pakalapati, G., ... & Dumanski, J. P. (2014). Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood is associated with shorter survival and higher risk of cancer. *Nature genetics*, 46(6), 624-628.
- Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., ... & Slatko, B. (2005). The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS biology*, 3(4), e121.
- Fraïsse, C., Picard, M. A., & Vicoso, B. (2017). The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. *Nature communications*, 8(1), 1-9.
- Franke, A., & Baker, B. S. (1999). The rox1 and rox2 RNAs are essential components of the compensasome, which mediates dosage compensation in *Drosophila*. *Molecular cell*, 4(1), 117-122.
- Fricke, H., & Fricke, S. (1977). Monogamy and sex change by aggressive dominance in coral reef fish. *Nature*, 266(5605), 830-832.
- Fridolfsson, A. K., & Ellegren, H. (2000). Molecular evolution of the avian CHD1 genes on the Z and W sex chromosomes. *Genetics*, 155(4), 1903-1912.
- Furman, B. L., & Evans, B. J. (2016). Sequential turnovers of sex chromosomes in African clawed frogs (*Xenopus*) suggest some genomic

- regions are good at sex determination. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(11), 3625-3633.
- Furman, B. L., & Evans, B. J. (2018). Divergent evolutionary trajectories of two young, homomorphic, and closely related sex chromosome systems. *Genome biology and evolution*, 10(3), 742-755.
 - Gamble, T., Castoe, T. A., Nielsen, S. V., Banks, J. L., Card, D. C., Schield, D. R., ... & Booth, W. (2017). The discovery of XY sex chromosomes in a Boa and Python. *Current Biology*, 27(14), 2148-2153.
 - Gamble, T., Coryell, J., Ezaz, T., Lynch, J., Scantlebury, D. P., & 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(5), 1296-1309.
 - Garcia, R. N., Garcia-Fernandez, C., Garcia, S. M. L., & Valente, V. L. S. (2002). Mitotic and meiotic chromosomes of a southern Brazilian population of *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae). *Iheringia. Série Zoologia*, 92, 51-57.
 - Gardner, A., Ross, L. (2014). Mating ecology explains patterns of genome elimination. *Ecology Letters*, 17 pp. 1602-1612
 - Gelbart, M. E., & Kuroda, M. I. (2009). *Drosophila* dosage compensation: a complex voyage to the X chromosome.
 - Gemmell, N. J., Rutherford, K., Prost, S., Tollis, M., Winter, D., Macey, J. R., ... & Board, N. T. (2019). The tuatara genome: insights into vertebrate evolution from the sole survivor of an ancient reptilian order. *bioRxiv*, 867069.
 - Georges, A., Li, Q., Lian, J., O'Meally, D., Deakin, J., Wang, Z., ... & Zhang, G. (2015). High-coverage sequencing and annotated assembly of the genome of the Australian dragon lizard *Pogona vitticeps*. *Gigascience*, 4(1), s13742-015.
 - Gersen, S. L., & Keagle, M. B. (2013). *The principles of clinical cytogenetics*. Springer.
 - Gil-Fernández, A., Saunders, P. A., Martín-Ruiz, M., Ribagorda, M., López-Jiménez, P., Jeffries, D. L., ... & Page, J. (2020). Meiosis reveals

- the early steps in the evolution of a neo-XY sex chromosome pair in the African pygmy mouse *Mus minutoides*. *PLoS genetics*, 16(11), e1008959.
- Gillespie, J. H. (2000). Genetic drift in an infinite population: the pseudohitchhiking model. *Genetics*, 155(2), 909-919.
 - Goodnoe, T. T., Hill, J. P., & Aho, K. (2016). Effects of variation in carbon, nitrogen, and phosphorus molarity and stoichiometry on sex determination in the fern *Ceratopteris richardii*. *Botany*, 94(4), 249-259.
 - Gorbman A. (1990). Sex differentiation in the hagfish *Eptatretus stouti*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77, 309-323.
 - Gordo, I., & Charlesworth, B. (2001). Genetic linkage and molecular evolution. *Current Biology*, 11(17), R684-R686.
 - Gorman, G. C., & Atkins, L. (1966). Chromosomal heteromorphism in some male lizards of the genus *Anolis*. *The American Naturalist*, 100(916), 579-583.
 - Gorman, G. C., & Stamm, B. (1975). The *Anolis* lizards of Mona, Redonda, and La Blanquilla: chromosomes, relationships, and natural history notes. *Journal of Herpetology*, 197-205.
 - Gorman, G. C., Atkins, L., & Holzinger, T. (1967). New karyotypic data on 15 genera of lizards in the family Iguanidae, with a discussion of axonomic and cytological implications. *Cytogenetic and Genome Research*, 6(3-4), 286-299.
 - Graves, J. A. M. (1995). The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes—an evolving understanding. *Bioessays*, 17(4), 311-320.
 - Graves, J. A. M. (2008). Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annual review of genetics*, 42, 565-586.
 - Graves, J. A. M., & Peichel, C. L. (2010). Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options?. *Genome biology*, 11(4), 1-12.
 - Graves, J. A., Wakefield, M. J., & Toder, R. (1998). The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Human molecular genetics*, 7(13), 1991-1996.

- Green, D. M. (1988). Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. *Chromosoma*, 97(1), 55-70.
- Green, P., Ewing, B., Miller, W., Thomas, P. J., & Green, E. D. (2003). Transcription-associated mutational asymmetry in mammalian evolution. *Nature genetics*, 33(4), 514-517.
- Green, R. E., Braun, E. L., Armstrong, J., Earl, D., Nguyen, N., Hickey, G., ... & Ray, D. A. (2014). Three crocodylian genomes reveal ancestral patterns of evolution among archosaurs. *Science*, 346(6215).
- Grützner F., Rens, W., Tsend-Ayush, E., El-Mogharbel, N., O'Brien, P.C.M., Jones, R.C., Ferguson-Smith, M.A. & Graves, J.A.M. (2004). In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature* 432, 913-917.
- Gupta, V., Parisi, M., Sturgill, D., Nuttall, R., Doctolero, M., Dudko, O. K., ... & Oliver, B. (2006). Global analysis of X-chromosome dosage compensation. *Journal of biology*, 5(1), 1-22.
- Hackett, K. J., Lynn, D. E., Williamson, D. L., Ginsberg, A. S., & Whitcomb, R. F. (1986). Cultivation of the *Drosophila* sex-ratio spiroplasma. *Science*, 232(4755), 1253-1255.
- Hahn, M. W., & Lanzaro, G. C. (2005). Female-biased gene expression in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Current Biology*, 15(6), R192-R193.
- Halary, S., Malik, S.B., Lildhar, L., Slamovits, C.H. *et al.* (2011). Conserved meiotic machinery in *Glomus* spp., a putatively ancient asexual fungal lineage. *Genome Biol Evol* 3: 950–958.
- Hamilton, W. D. (1967). Extraordinary sex ratios. *Science*, 156(3774), 477-488.
- Hara, Y., Yamaguchi, K., Onimaru, K., Kadota, M., Koyanagi, M., Keeley, S. D., ... & Kuraku, S. (2018). Shark genomes provide insights into elasmobranch evolution and the origin of vertebrates. *Nature ecology & evolution*, 2(11), 1761-1771.

- Harrison, P. W., Mank, J. E., & Wedell, N. (2012). Incomplete sex chromosome dosage compensation in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*, based on de novo transcriptome assembly. *Genome Biology and Evolution*, 4(11), 1118-1126.
- Harrison, P. W., Mank, J. E., & Wedell, N. (2012). Incomplete sex chromosome dosage compensation in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*, based on de novo transcriptome assembly. *Genome Biology and Evolution*, 4(11), 1118-1126.
- Hattori, R. S., Gould, R. J., Fujioka, T., Saito, T., Kurita, J., Strüssmann, C. A., ... & Watanabe, S. (2007). Temperature-dependent sex determination in Hd-rR medaka *Oryzias latipes*: gender sensitivity, thermal threshold, critical period, and DMRT1 expression profile. *Sexual Development*, 1(2), 138-146.
- Hawley, R. S. (2003). The human Y chromosome: rumors of its death have been greatly exaggerated. *Cell*, 113(7), 825-828.
- Hayes, T. B., Anderson, L. L., Beasley, V. R., De Solla, S. R., Iguchi, T., Ingraham, H., ... & Willingham, E. (2011). Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(1-2), 64-73.
- Hedges, S. B., & Kumar, S. (Eds.). (2009). *The timetree of life*. OUP Oxford.
- Hegreness, M., Shoresh, N., Hartl, D., & Kishony, R. (2006). An equivalence principle for the incorporation of favorable mutations in asexual populations. *Science*, 311(5767), 1615-1617.
- Helleu, Q., Gérard, P. R., & Montchamp-Moreau, C. (2015). Sex chromosome drive. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(2), a017616.
- Herpin, A., & Schartl, M. (2015). Plasticity of gene-regulatory networks controlling sex determination: of masters, slaves, usual suspects, newcomers, and usurpators. *EMBO reports*, 16(10), 1260-1274.
- Hill, W. G., & Robertson, A. (1966). The effect of linkage on limits to artificial selection. *Genetics Research*, 8(3), 269-294.

- Hillis, D. M., & Green, D. M. (1990). Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. *Journal of evolutionary Biology*, 3(1-2), 49-64.
- Holmquist, G.P. (1989). Evolution of chromosome bands: molecular ecology of noncoding DNA. *J Mol Evol* 28:469-486 (1989).
- Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., ... & Flicek, P. (2021). Ensembl 2021. *Nucleic acids research*, 49(D1), D884-D891.
- Hughes, J. F. *et al.* Strict evolutionary conservation followed rapid gene loss on human and rhesus y chromosomes. *Nature* 483, 82–86 (2012).
- Huigens, M. E., De Almeida, R. P., Boons, P. A. H., Luck, R. F., & Stouthamer, R. (2004). Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing Wolbachia in Trichogramma wasps. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1538), 509-515.
- Hurst, G. D., & Jiggins, F. M. (2000). Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. *Emerging infectious diseases*, 6(4), 329.
- Hurst, L. D., Ghanbarian, A. T., Forrest, A. R., FANTOM consortium, & Huminiecki, L. (2015). The constrained maximal expression level owing to haploidy shapes gene content on the mammalian X chromosome. *PLoS biology*, 13(12), e1002315.
- Iannucci, A., Altmanová, M., Ciofi, C., Ferguson-Smith, M., Milan, M., Pereira, J. C., ... & Pokorná, M. J. (2019). Conserved sex chromosomes and karyotype evolution in monitor lizards (Varanidae). *Heredity*, 123(2), 215-227.
- Imaimatsu, K., Fujii, W., Hiramatsu, R., Miura, K., Kurohmaru, M., & Kanai, Y. (2018). CRISPR/Cas9-mediated knock-in of the murine Y chromosomal Sry gene. *Journal of Reproduction and Development*, 2017-161.
- Immler, S., & Otto, S. P. (2015). The evolution of sex chromosomes in organisms with separate haploid sexes. *Evolution*, 69(3), 694-708.
- Innocenti, P., & Morrow, E. H. (2010). The sexually antagonistic genes of *Drosophila melanogaster*. *PLoS biology*, 8(3), e1000335.

- International Chicken Genome Sequencing Consortium. (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432(7018), 695-716.
- International Chicken Genome Sequencing Consortium. (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432(7018), 695-716.
- Ito, M. (2018). Sex determination and differentiation in frogs. *Reproductive and Developmental Strategies* (pp. 349-366). Springer, Tokyo.
- Itoh, Y., Melamed, E., Yang, X., Kampf, K., Wang, S., Yehya, N., ... & Arnold, A. P. (2007). Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. *Journal of biology*, 6(1), 1-15.
- Jaenike, J. (2001). Sex chromosome meiotic drive. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32(1), 25-49.
- Jarne, P., & Auld, J. R. (2006). Animals mix it up too: the distribution of self-fertilization among hermaphroditic animals. *Evolution*, 60(9), 1816-1824.
- Javaux, E.J., Knoll, A.H. & Walter, M.R. (2001). Morphological and ecological complexity in early eukaryotic ecosystems. *Nature* 412: 66–69.
- Jeffries, D. L., Lavanchy, G., Sermier, R., Sredl, M. J., Miura, I., Borzée, A., ... & Perrin, N. (2018). A rapid rate of sex-chromosome turnover and non-random transitions in true frogs. *Nature Communications*, 9(1), 1-11.
- Jiang, T., Hou, C. C., She, Z. Y., & Yang, W. X. (2013). The SOX gene family: function and regulation in testis determination and male fertility maintenance. *Molecular biology reports*, 40(3), 2187-2194.
- Jiang, J. C., Rothnagel, J. A., & Upton, K. R. (2021). Integrated transcription factor profiling with transcriptome analysis identifies L1PA2 transposons as global regulatory modulators in a breast cancer model. *Scientific reports*, 11(1), 1-18.
- Johnson, N. A., & Lachance, J. (2012). The genetics of sex chromosomes: evolution and implications for hybrid incompatibility. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1256, E1.
- Julien, P., Brawand, D., Soumillon, M., Necsulea, A., Liechti, A., Schütz, F., ... & Kaessmann, H. (2012). Mechanisms and evolutionary patterns of

- mammalian and avian dosage compensation. *PLoS biology*, 10(5), e1001328.
- Just, W., Rau, W., Vogel, W., Akhverdian, M., Fredga, K., Graves, J. A. M., & Lyapunova, E. (1995). Absence of Sry in species of the vole *Ellobius*. *Nature genetics*, 11(2), 117-118.
 - Kaiser, V. B. (2010). Gene loss on Y chromosomes: a consequence of purifying selection?. *Fly*, 4(4), 270-272.
 - Kaiser, V. B., & Charlesworth, B. (2010). Muller's ratchet and the degeneration of the *Drosophila miranda* neo-Y chromosome. *Genetics*, 185(1), 339-348.
 - Kallman, K. D. (1973). The sex-determining mechanism of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. In *Genetics and Mutagenesis of Fish* (pp. 19-28). Springer, Berlin, Heidelberg.
 - Kato, Y., Kobayashi, K., Watanabe, H., & Iguchi, T. (2011). Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a Doublesex gene in the sex-determining pathway. *PLoS Genetics*, 7(3), e1001345.
 - 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(2), 125-131.
 - Kawagoshi, T., Uno, Y., Nishida, C., & Matsuda, Y. (2014). The *Staurotypus* turtles and aves share the same origin of sex chromosomes but evolved different types of heterogametic sex determination. *PLoS One*, 9(8), e105315.
 - Kawai, A., Ishijima, J., Nishida, C., Kosaka, A., Ota, H., Kohno, S. I., & Matsuda, Y. (2009). The ZW sex chromosomes of *Gekko hokouensis* (Gekkonidae, Squamata) represent highly conserved homology with those of avian species. *Chromosoma*, 118(1), 43-51.
 - Kim, Y., & Stephan, W. (2000). Joint effects of genetic hitchhiking and background selection on neutral variation. *Genetics*, 155(3), 1415-1427.

- Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217(5129), 624-626.
- Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press.
- Kimura, M. (1991). The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *The Japanese Journal of Genetics*, 66(4), 367-386.
- King, B. L., Gillis, J. A., Carlisle, H. R., & Dahn, R. D. (2011). A natural deletion of the HoxC cluster in elasmobranch fishes. *Science*, 334(6062), 1517-1517.
- Kirkpatrick, M. (2010). How and why chromosome inversions evolve. *PLoS biology*, 8(9), e1000501.
- Kirkpatrick, M., & Hall, D. W. (2004). Male-biased mutation, sex linkage, and the rate of adaptive evolution. *Evolution*, 58(2), 437-440.
- Kitano, J., Ross, J. A., Mori, S., Kume, M., Jones, F. C., Chan, Y. F., ... & Peichel, C. L. (2009). A role for a neo-sex chromosome in stickleback speciation. *Nature*, 461(7267), 1079-1083.
- Kondo, M., Nanda, I., Hornung, U., Schmid, M., & Schartl, M. (2004). Evolutionary origin of the medaka Y chromosome. *Current Biology*, 14(18), 1664-1669.
- Kopp, A. (2012). Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism. *Trends in Genetics*, 28(4), 175-184.
- Kostmann, A., Kratochvíl, L., & Rovatsos, M. (2021). Poorly differentiated XX/XY sex chromosomes are widely shared across skink radiation. *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1943), 20202139.
- Koyano, S., Ito, M., Takamatsu, N., Takiguchi, S., & Shiba, T. (1997). The Xenopus Sox3 gene expressed in oocytes of early stages. *Gene*, 188(1), 101-107.
- Kozielska, M., Weissing, F. J., Beukeboom, L. W., & Pen, I. (2010). Segregation distortion and the evolution of sex-determining mechanisms. *Heredity*, 104(1), 100-112.
- Krackow, S. (1995). Potential mechanisms for sex ratio adjustment in mammals and birds. *Biological Reviews*, 70(2), 225-241.

- Kremer, N., Charif, D., Henri, H., Bataille, M., Prevost, G., Kraaijeveld, K., & Vavre, F. (2009). A new case of Wolbachia dependence in the genus *Asobara*: evidence for parthenogenesis induction in *Asobara japonica*. *Heredity*, *103*(3), 248-256.
- Krishan, A. (1964). Microchromosomes in the spermatogenesis of the domestic turkey. *Exp Cell Res* *33*:1-7.
- Kuroiwa, A., Ishiguchi, Y., Yamada, F., Shintaro, A., & Matsuda, Y. (2010). The process of a Y-loss event in an XO/XO mammal, the Ryukyu spiny rat. *Chromosoma*, *119*(5), 519-526.
- Lahr, D. J., Parfrey, L. W., Mitchell, E. A., Katz, L. A., & Lara, E. (2011). The chastity of amoebae: re-evaluating evidence for sex in amoeboid organisms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *278*(1715), 2081-2090.
- Landergott, U., Schneller, J. J., Holderegger, R., & Thompson, J. D. (2009). Sex-ratio variation and spatial distribution of nuclear and cytoplasmic sex-determining genes in gynodioecious *Thymus praecox* across altitudinal gradients. *Evolutionary Ecology Research*, *11*(1), 23-42.
- Landmann, F., Orsi, G. A., Loppin, B., & Sullivan, W. (2009). Wolbachia-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus. *PLoS pathogens*, *5*(3), e1000343.
- Langkilde, T., & Shine, R. (2005). Different optimal offspring sizes for sons versus daughters may favor the evolution of temperature-dependent sex determination in viviparous lizards. *Evolution*, *59*(10), 2275-2280.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, *9*(4), 357-359.
- Leaché, A. D., & Sites Jr, J. W. (2009). Chromosome evolution and diversification in North American spiny lizards (genus *Sceloporus*). *Cytogenetic and genome research*, *127*(2-4), 166-181.
- Leder, E. H., Cano, J. M., Leinonen, T., O'Hara, R. B., Nikinmaa, M., Primmer, C. R., & Merilä, J. (2010). Female-biased expression on the X chromosome as a key step in sex chromosome evolution in threespine sticklebacks. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(7), 1495-1503.

- Lee, L. S., Navarro-Domínguez, B. M., Wu, Z., Montiel, E. E., Badenhorst, D., Bista, B., ... & Valenzuela, N. (2020). Karyotypic Evolution of Sauropsid Vertebrates Illuminated by Optical and Physical Mapping of the Painted Turtle and Slider Turtle Genomes. *Genes*, *11*(8), 928.
- Liedtke, H. C., Gower, D. J., Wilkinson, M., & Gomez-Mestre, I. (2018). Macroevolutionary shift in the size of amphibian genomes and the role of life history and climate. *Nature Ecology & Evolution*, *2*(11), 1792-1799.
- Lin, F., Xing, K., Zhang, J., & He, X. (2012). Expression reduction in mammalian X chromosome evolution refutes Ohno's hypothesis of dosage compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(29), 11752-11757.
- Livernois, A. M., Graves, J. A. M., & Waters, P. D. (2012). The origin and evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. *Heredity*, *108*(1), 50-58.
- Lobry, J. R. (1996). Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria. *Molecular biology and evolution*, *13*(5), 660-665.
- Lyon, M. (1991). The Genetic Basis of Transmission-Ratio Distortion and Male Sterility Due to the t Complex. *The American Naturalist*, *137*(3), 349-358.
- Lyon, M. F. (2003). Transmission ratio distortion in mice. *Annual review of genetics*, *37*(1), 393-408.
- Lyttle, T. W. (1991). Segregation distorters. *Annual review of genetics*, *25*(1), 511-581.
- Maddock, M. B., & Schwartz, F. J. (1996). Elasmobranch cytogenetics: methods and sex chromosomes. *Bulletin of marine science*, *58*(1), 147-155.
- Magni, G. E. (1953). 'Sex-ratio': a non-Mendelian character in *Drosophila bifasciata*. *Nature*, *172*(4367), 81-81.
- Magurran, A. E. (2005). Evolutionary ecology: the Trinidadian guppy. *Oxford University Press on Demand*.
- Makałowski, W., & Boguski, M. S. (1998). Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome: an analysis of 2,820 orthologous rodent

- and human sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9407-9412.
- Makino, T., & McLysaght, A. (2010). Ohnologs in the human genome are dosage balanced and frequently associated with disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9270-9274.
 - Malcom, C. M., Wyckoff, G. J., & Lahn, B. T. (2003). Genic mutation rates in mammals: local similarity, chromosomal heterogeneity, and X-versus-autosome disparity. *Molecular Biology and Evolution*, 20(10), 1633-1641.
 - Malik, S., Pightling, A.W., Stefaniak, L.M., Schurko, A.M. *et al.* (2008) An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. *PLoS One* 3: e2879.
 - Mank, J. E. (2013). Sex chromosome dosage compensation: definitely not for everyone. *Trends in genetics*, 29(12), 677-683.
 - Marin, R., Cortez, D., Lamanna, F., Pradeepa, M. M., Leushkin, E., Julien, P., ... & Kaessmann, H. (2017). Convergent origination of a Drosophila-like dosage compensation mechanism in a reptile lineage. *Genome research*, 27(12), 1974-1987.
 - Martínez-Pacheco, M., Tenorio, M., Almonte, L., Fajardo, V., Godínez, A., Fernández, D., ... & Cortez, D. (2020). Expression evolution of ancestral XY gametologs across all major groups of placental mammals. *Genome biology and evolution*, 12(11), 2015-2028.
 - Masel, J. (2011). Genetic drift. *Current Biology*, 21(20), R837-R838.
 - 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(48), 18190-18195.
 - McQueen, H.A., Siriaco, G. & Bird, A.P. (1998). Chicken microchromosomes are hyperacetylated, early replicating, and gene rich. *Genome Res* 8:621-630.
 - McVean, G. A., & Charlesworth, B. (2000). The effects of Hill-Robertson interference between weakly selected mutations on patterns of molecular evolution and variation. *Genetics*, 155(2), 929-944.

- Meller, V. H., & Kuroda, M. I. (2002). Sex and the single chromosome. *Advances in genetics*, 46, 1-24.
- Merchant-Larios, H., & Diaz-Hernandez, V. (2013). Environmental sex determination mechanisms in reptiles. *Sexual Development*, 7(1-3), 95-103.
- Meunier, J., Khelifi, A., Navratil, V., & Duret, L. (2005). Homology-dependent methylation in primate repetitive DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(15), 5471-5476.
- Millstein, R. L. (2002). Are random drift and natural selection conceptually distinct?. *Biology and Philosophy*, 17(1), 33-53.
- Millstein, R. L. (2021). Genetic drift. *The Stanford Encyclopedia of Philosophy*.
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., ... & Zhou, X. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346(6210), 763-767.
- Miura, I. (2007). An evolutionary witness: the frog *rana rugosa* underwent change of heterogametic sex from XY male to ZW female. *Sex Dev* 1:323–331
- Miura, I. (2017). Sex determination and sex chromosomes in Amphibia. *Sexual Development*, 11(5-6), 298-306.
- Moghadam, H. K., Harrison, P. W., Zachar, G., Székely, T., & Mank, J. E. (2013). The plover neurotranscriptome assembly: transcriptomic analysis in an ecological model species without a reference genome. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 696-705.
- Montenegro, H., Souza, W. N., Leite, D. D. S., & Klaczko, L. B. (2000). Male-killing selfish cytoplasmic element causes sex-ratio distortion in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 85(5), 465-470.
- Montiel, E. E., Badenhorst, D., Lee, L. S., 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(4), 292-304.

- Moore, E. C., & Roberts, R. B. (2013). Polygenic sex determination. *Current Biology*, 23(12), R510-R512.
- Morescalchi, A., Odierna, G., & Olmo, E. (1977). Karyological relationships between the Cryptobranchid salamanders. *Experientia*, 33(12), 1579-1581.
- Morescalchi, A., Odierna, G., & Olmo, E. (1979). Karyology of the primitive salamanders, family hynobiidae. *Experientia*, 35(11), 1434-1436.
- Morescalchi, A., Olmo, E., & Stingo, V. (1977). Trends of karyological evolution in Pelobatoid frogs. *Experientia*, 33(12), 1577-1578.
- Muller, H. J. (1918). Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. *Genetics*, 3(5), 422.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1(1), 2-9.
- Murata, C., Yamada, F., Kawachi, N., Matsuda, Y., & Kuroiwa, A. (2012). The Y chromosome of the Okinawa spiny rat, *Tokudaia muenninki*, was rescued through fusion with an autosome. *Chromosome research*, 20(1), 111-125.
- Muyle, A., Zemp, N., Deschamps, C., Mousset, S., Widmer, A., & Marais, G. A. (2012). Rapid de novo evolution of X chromosome dosage compensation in *Silene latifolia*, a plant with young sex chromosomes. *PLoS biology*, 10(4), e1001308.
- Muyle, A., Zemp, N., Deschamps, C., Mousset, S., Widmer, A., & Marais, G. A. (2012). Rapid de novo evolution of X chromosome dosage compensation in *Silene latifolia*, a plant with young sex chromosomes. *PLoS biology*, 10(4), e1001308.
- Nakamura, M. (2009, May). Sex determination in amphibians. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 20, No. 3, pp. 271-282). Academic Press.
- Nakamura, M. (2010). The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key-factor?. *Journal of experimental zoology part A: Ecological genetics and physiology*, 313(7), 381-398.

- Naurin, S., Hansson, B., Hasselquist, D., Kim, Y. H., & Bensch, S. (2011). The sex-biased brain: sexual dimorphism in gene expression in two species of songbirds. *BMC genomics*, 12(1), 1-11.
- Nei, M. (1970). Accumulation of nonfunctional genes on sheltered chromosomes. *The American Naturalist*, 104(938), 311-322.
- Nguyen, A. H., & Bachtrog, D. (2021). Toxic Y chromosome: Increased repeat expression and age-associated heterochromatin loss in male *Drosophila* with a young Y chromosome. *PLoS genetics*, 17(4), e1009438.
- Nguyen, P., & Paladino, L. C. (2016). On the neo-sex chromosomes of Lepidoptera. In *Evolutionary biology* (pp. 171-185). Springer, Cham.
- Nielsen, S. V., Banks, J. L., Diaz Jr, R. E., Trainor, P. A., & Gamble, T. (2018). Dynamic sex chromosomes in old world chameleons (Squamata: Chamaeleonidae). *Journal of evolutionary biology*, 31(4), 484-490.
- Nielsen, S. V., Daza, J. D., Pinto, B. J., & Gamble, T. (2019). ZZ/ZW sex chromosomes in the endemic Puerto Rican leaf-toed gecko (*Phyllodactylus wirshingi*). *Cytogenetic and genome research*, 157(1-2), 89-97.
- Normark, B.B. (2003). The evolution of alternative genetic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 48, pp. 397-423
- O'Connor, D., & Moritz, C. (2003). A molecular phylogeny of the Australian skink genera *Eulamprus*, *Gnypetoscincus* and *Nangura*. *Australian Journal of Zoology*, 51(4), 317-330.
- Ogata, M., Suzuki, K., Yuasa, Y., & Miura, I. (2021). Sex chromosome evolution from a heteromorphic to a homomorphic system by inter-population hybridization in a frog. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1833), 20200105.
- Ohno, S. Sex Chromosomes and the Sex Linked Genes, 1967.
- Ohno, S., Muramoto, J., Stenius, C., Christian, L., Kittrell, W. A., & Atkin, N. B. (1969). Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holostean fishes. *Chromosoma*, 26(1), 35-40.
- Ohta, T., & Gillespie, J. H. (1996). Development of neutral and nearly neutral theories. *Theoretical population biology*, 49(2), 128-142.

- Olsen, M.V., (1975). Avian parthenogenesis, *Agricultural Research Service USDA, ARS-NE 65, 1-82*.
- Organ, C. L., Moreno, R. G., & Edwards, S. V. (2008). Three tiers of genome evolution in reptiles. *Integrative and Comparative Biology, 48*(4), 494-504.
- Ota, H., & Lue, K. Y. (1994). Karyotypes of two lygosomine skinks of the genus *Sphenomorphus* from Taiwan. *Journal of herpetology, 28*(2), 253-255.
- Otto, S. P. (2009). The evolutionary enigma of sex. *the american naturalist, 174*(S1), S1-S14.
- Pal, A., & Vicoso, B. (2015). The X chromosome of hemipteran insects: conservation, dosage compensation and sex-biased expression. *Genome biology and evolution, 7*(12), 3259-3268.
- Palmer, D. H., Rogers, T. F., Dean, R., & Wright, A. E. (2019). How to identify sex chromosomes and their turnover. *Molecular ecology, 28*(21), 4709-4724.
- Patiño, R., Davis, K. B., Schoore, J. E., Uguz, C., Strüssmann, C. A., Parker, N. C., ... & Goudie, C. A. (1996). Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. *Journal of Experimental Zoology, 276*(3), 209-218.
- Pennell, M. W., Kirkpatrick, M., Otto, S. P., Vamosi, J. C., Peichel, C. L., Valenzuela, N., & Kitano, J. (2015). Y fuse? Sex chromosome fusions in fishes and reptiles. *PLoS genetics, 11*(5), e1005237.
- Pennell, M. W., Mank, J. E., & Peichel, C. L. (2018). Transitions in sex determination and sex chromosomes across vertebrate species. *Molecular Ecology, 27*(19), 3950-3963.
- Perrin, N. (2009). Sex reversal: a fountain of youth for sex chromosomes?. *Evolution: International Journal of Organic Evolution, 63*(12), 3043-3049.
- Pessia, E., Makino, T., Bailly-Bechet, M., McLysaght, A., & Marais, G. A. (2012). Mammalian X chromosome inactivation evolved as a dosage-compensation mechanism for dosage-sensitive genes on the X

- chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5346-5351.
- Petronczki, M., Siomos, M. F., & Nasmyth, K. (2003). Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, 112(4), 423-440.
 - Picard, M. A. L., Cosseau, C., Mouahid, G., Duval, D., Grunau, C., Toulza, E., ... & Boissier, J. (2015). The roles of Dmrt (Double sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) genes in sex determination and differentiation mechanisms: Ubiquity and diversity across the animal kingdom. *Comptes rendus biologiques*, 338(7), 451-462.
 - Picard, M. A. L., Vicoso, B., Bertrand, S., & Escriva, H. (2021). Diversity of Modes of Reproduction and Sex Determination Systems in Invertebrates, and the Putative Contribution of Genetic Conflict. *Genes*, 12(8), 1136.
 - Pichugin, A. M., Galkina, S. A., Potekhin, A. A., Punina, E. O., Rautian, M. S., & Rodionov, A. V. (2001). Estimation of the Minimal Size of Chicken *Gallus gallus domesticus* Microchromosomes via Pulsed-Field Electrophoresis. *Russian Journal of Genetics*, 37(5), 535-538.
 - Plath, K., Mlynarczyk-Evans, S., Nusinow, D. A., & Panning, B. (2002). Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annual review of genetics*, 36(1), 233-278.
 - 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(1), 168-183.
 - Presgraves, D. C. (2005). Recombination enhances protein adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, 15(18), 1651-1656.
 - Prince, E. G., Kirkland, D., & Demuth, J. P. (2010). Hyperexpression of the X chromosome in both sexes results in extensive female bias of X-linked genes in the flour beetle. *Genome Biology and Evolution*, 2, 336-346.
 - Pucholt, P., Rönnerberg-Wästljung, A. C., & Berlin, S. (2015). Single locus sex determination and female heterogamety in the basket willow (*Salix viminalis* L.). *Heredity*, 114(6), 575-583.

- Pucholt, P., Wright, A. E., Conze, L. L., Mank, J. E., & Berlin, S. (2017). Recent sex chromosome divergence despite ancient dioecy in the willow *Salix viminalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), 1991-2001.
- Pyron, R. A. (2011). Divergence time estimation using fossils as terminal taxa and the origins of Lissamphibia. *Systematic biology*, 60(4), 466-481.
- Pyron, R. A., & Wiens, J. J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular phylogenetics and evolution*, 61(2), 543-583.
- Quinn, A. E., Georges, A., Sarre, S. D., Guarino, F., Ezaz, T., & Graves, J. A. M. (2007). Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science*, 316(5823), 411-411.
- Rafati, N., Chen, J., Herpin, A., Pettersson, M. E., Han, F., Feng, C., ... & Andersson, L. (2020). Reconstruction of the birth of a male sex chromosome present in Atlantic herring. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(39), 24359-24368.
- Ramachandran, R., & McDaniel, C. D. (2018). Parthenogenesis in birds: a review. *Reproduction*, 155(6), R245-R257.
- Ramesh, M.A., Malik, S., Logsdon & Jr., J.M. (2005). A phylogenomic inventory of meiotic genes: Evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr Biol* 15: 185–191
- Raudsepp, T., Das, P. J., Avila, F., & Chowdhary, B. P. (2012). The pseudoautosomal region and sex chromosome aneuploidies in domestic species. *Sexual Development*, 6(1-3), 72-83.
- Raverot, G., Weiss, J., Park, S. Y., Hurley, L., & Jameson, J. L. (2005). Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Developmental biology*, 283(1), 215-225.
- Redia, C.A. & Capanna, E. (2012). Genome size evolution: sizing mammalian genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 137, 97-112.
- Reinke, V., Gil, I. S., Ward, S., & Kazmer, K. (2004). Genome-wide germline-enriched and sex-biased expression profiles in *Caenorhabditis elegans*.

- Renner, S. S., & Ricklefs, R. E. (1995). Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American journal of botany*, 82(5), 596-606.
- Rens Wet al.. (2007). The multiple sex chromosomes of platypus and echidna are not completely identical and several share homology with the avian Z. *Genome Biol.* 8, R243.
- Rice, W. R. (1987). Genetic hitchhiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. *Genetics*, 116(1), 161-167.
- Riesgo, A., Farrar, N., Windsor, P. J., Giribet, G., & Leys, S. P. (2014). The analysis of eight transcriptomes from all poriferan classes reveals surprising genetic complexity in sponges. *Molecular biology and evolution*, 31(5), 1102-1120.
- Robert, K. A. (2003). Temperature-dependent Sex Determination in the Viviparous lizard *Eulamprus tympanum*.
- Roberts, R. B., Ser, J. R., & Kocher, T. D. (2009). Sexual conflict resolved by invasion of a novel sex determiner in Lake Malawi cichlid fishes. *Science*, 326(5955), 998-1001.
- Roco, Á. S., Olmstead, A. W., Degitz, S. J., Amano, T., Zimmerman, L. B., & Bullejos, M. (2015). Coexistence of Y, W, and Z sex chromosomes in *Xenopus tropicalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), E4752-E4761.
- Romanov, M. N., Tuttle, E. M., Houck, M. L., Modi, W. S., Chemnick, L. G., Korody, M. L., ... & Ryder, O. A. (2009, July). The value of avian genomics to the conservation of wildlife. In *BMC genomics* (Vol. 10, No. 2, pp. 1-19). BioMed Central.
- Ross, J. A., Urton, J. R., Boland, J., Shapiro, M. D., & Peichel, C. L. (2009). Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (Gasterosteidae). *PLoS Genetics*, 5(2), e1000391.
- Ross, L. & Blackmon H. (2016). Sex determination. *Encyclopedia of Evolutionary Biology* 81-88
- 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*, 8(8), 902-906.

- Rovatsos, M., Altmanová, M., Pokorná, M., & Kratochvíl, L. (2014b). Conserved sex chromosomes across adaptively radiated *Anolis* lizards. *Evolution*, *68*(7), 2079-2085.
- Rovatsos, M., Farkačová, K., Altmanová, M., Johnson Pokorná, M., & Kratochvíl, L. (2019). The rise and fall of differentiated sex chromosomes in geckos. *Molecular Ecology*, *28*(12), 3042-3052.
- Rovatsos, M., Pokorná, M., Altmanová, M., & Kratochvíl, L. (2014a). Cretaceous park of sex determination: sex chromosomes are conserved across iguanas. *Biology Letters*, *10*(3), 20131093.
- Rovatsos, M., Praschag, P., Fritz, U., & Kratochvíl, L. (2017). Stable Cretaceous sex chromosomes enable molecular sexing in softshell turtles (Testudines: Trionychidae). *Scientific reports*, *7*(1), 1-6.
- Rovatsos, M., Reháček, I., Velenský, P., & Kratochvíl, L. (2019). Shared ancient sex chromosomes in varanids, beaded lizards, and alligator lizards. *Molecular biology and evolution*, *36*(6), 1113-1120.
- Rovatsos, M., Vukić, J., & Kratochvíl, L. (2016). Mammalian X homolog acts as sex chromosome in lacertid lizards. *Heredity*, *117*(1), 8-13.
- Rovatsos, M., Vukić, J., Altmanová, M., Johnson Pokorná, M., Moravec, J., & Kratochvíl, L. (2016). Conservation of sex chromosomes in lacertid lizards. *Molecular ecology*, *25*(13), 3120-3126.
- Rutkowska, J., & Badyaev, A. V. (2008). Meiotic drive and sex determination: molecular and cytological mechanisms of sex ratio adjustment in birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1497), 1675-1686.
- Sabath, N., Itescu, Y., Feldman, A., Meiri, S., Mayrose, I., & Valenzuela, N. (2016). Sex determination, longevity, and the birth and death of reptilian species. *Ecology and evolution*, *6*(15), 5207-5220.
- Sado, T. (2017). What makes the maternal X chromosome resistant to undergoing imprinted X inactivation?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *372*(1733), 20160365.
- Saunders, P. A. (2019) Sex chromosome turnovers in evolution. *eLS*, 1-8.

- Saunders, P. A., Neuenschwander, S., & Perrin, N. (2018). Sex chromosome turnovers and genetic drift: a simulation study. *Journal of evolutionary biology*, 31(9), 1413-1419.
- Schartl, M. (2004). Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Current opinion in genetics & development*, 14(6), 634-641.
- Schartl, M. (2015). Sex determination by multiple sex chromosomes in *Xenopus tropicalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10575-10576.
- Schield, D. R., Card, D. C., Hales, N. R., Perry, B. W., Pasquesi, G. M., Blackmon, H., ... & Castoe, T. A. (2019). The origins and evolution of chromosomes, dosage compensation, and mechanisms underlying venom regulation in snakes. *Genome research*, 29(4), 590-601.
- Schultz, R. J. (1993). Genetic regulation of temperature-mediated sex ratios in the livebearing fish *Poeciliopsis lucida*. *Copeia*, 1993(4), 1148-1151.
- Schurko, A.M., Neiman, M., Logsdon & Jr., J.M. (2009). Signs of sex: what we know and how we know it. *Trends Ecol Evol* 24: 208–217.
- Schwenk, K., Sessions, S. K., & Seale, D. M. P. (1982). Karyotypes of the basiliscine lizards *Corytophanes cristatus* and *Corytophanes hernandesii*, with comments on the relationship between chromosomal and morphological evolution in lizards. *Herpetologica*, 493-501.
- Scott, M. F., Osmond, M. M., & Otto, S. P. (2018). Haploid selection, sex ratio bias, and transitions between sex-determining systems. *PLoS biology*, 16(6), e2005609.
- Sember, A., Nguyen, P., Perez, M. F., Altmanová, M., Ráb, P., & Cioffi, M. D. B. (2021). Multiple sex chromosomes in teleost fishes from a cytogenetic perspective: state of the art and future challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1833), 20200098.
- Ser, J. R., Roberts, R. B., & Kocher, T. D. (2010). Multiple interacting loci control sex determination in lake Malawi cichlid fish. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 64(2), 486-501.

- Sessions, S. K. (2013). The Chromosomes of Terraranan Frogs: Insights into Vertebrate Cytogenetics. *Cytogenet Genome Research* 130-131(1-8):1-14
- Shine, R. (2004). Incubation regimes of cold-climate reptiles: the thermal consequences of nest-site choice, viviparity and maternal basking. *Biological Journal of the Linnean Society*, 83(2), 145-155.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., ... & Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240-244.
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., ... & Page, D. C. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 423(6942), 825-837.
- Slancarova, V., Zdanska, J., Janousek, B., Talianova, M., Zschach, C., Zluvova, J., ... & Vyskot, B. (2013). Evolution of sex determination systems with heterogametic males and females in *Silene*. *Evolution*, 67(12), 3669-3677.
- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Ohnesorg, T., Cummins, D. M., Farlie, P. G., Doran, T. J., & Sinclair, A. H. (2009). The avian Z-linked gene *Dmrt1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461(7261), 267-271.
- Smith, J. J., Kuraku, S., Holt, C., Sauka-Spengler, T., Jiang, N., Campbell, M. S., ... & Li, W. (2013). Sequencing of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) genome provides insights into vertebrate evolution. *Nature genetics*, 45(4), 415-421.
- Smith, J. J., Timoshevskaya, N., Ye, C., Holt, C., Keinath, M. C., Parker, H. J., ... & Amemiya, C. T. (2018). The sea lamprey germline genome provides insights into programmed genome rearrangement and vertebrate evolution. *Nature genetics*, 50(2), 270-277.
- Smith, J. J., Timoshevskiy, V. A., & Saraceno, C. (2021). Programmed DNA Elimination in Vertebrates. *Annual review of animal biosciences*, 9, 173-201.

- Smith, J., Bruley, C.K., Paton, I.R., Dunn, I., Jones, C.T., Windsor, D., Morrice, D.R., Law, A.S., Masabanda, J., Sazanov, A., Waddington, D., Fries, R. & Burt, D.W. (2000). Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes. *Anim Genet* 31:96-103.
- Solari, A. J., & Rahn, M. I. (2005). Fine structure and meiotic behaviour of the male multiple sex chromosomes in the genus *Alouatta*. *Cytogenetic and Genome Research*, 108(1-3), 262-267.
- Solovei, I., Gaginskaya, E.R. & Macgregor, H.C. (1994) The arrangement and transcription of telomere DNA sequences at the ends of lampbrush chromosomes of birds. *Chrom Res* 2:460-470.
- Song, Y., Xu, Y., Liang, M., Zhang, Y., Chen, M., Deng, J., & Li, Z. (2018). CRISPR/Cas9-mediated mosaic mutation of SRY gene induces hermaphroditism in rabbits. *Bioscience reports*, 38(2), BSR20171490.
- Sousa, A., Fuchs, J., & Renner, S. S. (2017). Cytogenetic comparison of heteromorphic and homomorphic sex chromosomes in *Coccinia* (Cucurbitaceae) points to sex chromosome turnover. *Chromosome Research*, 25(2), 191-200.
- Srikulnath, K., Matsubara, K., Uno, Y., Nishida, C., Olsson, M., & Matsuda, Y. (2014). Identification of the linkage group of the Z sex chromosomes of the sand lizard (*Lacerta agilis*, Lacertidae) and elucidation of karyotype evolution in lacertid lizards. *Chromosoma*, 123(6), 563-575.
- Srikulnath, K., Nishida, C., Matsubara, K., Uno, Y., Thongpan, A., Suputtitada, S., ... & Matsuda, Y. (2009). 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 quadrigata*, Colubridae, Serpentes). *Chromosome research*, 17(8), 975-986.
- 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(8), 805-819.

- Steinemann, S. & Steinemann, M. (2005). Y chromosomes: born to be destroyed. *Bioessays* 27: 1076–1083.
- Stiglec, R., Ezaz, T., & Graves, J. M. (2007). A new look at the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenetic and genome research*, 117(1-4), 103-109.
- Stöck, M., Horn, A., Grossen, C., Lindtke, D., Sermier, R., Betto-Colliard, C., ... & Perrin, N. (2011). Ever-young sex chromosomes in European tree frogs. *PLoS biology*, 9(5), e1001062.
- Stöck, M., Kratochvíl, L., Kuhl, H., Rovatsos, M., Evans, B. J., Suh, A., ... & Guiguen, Y. (2021). A brief review of vertebrate sex evolution with a pledge for integrative research: towards 'sexomics'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1832), 20200426.
- Straková, B., Rovatsos, M., Kubička, L., & Kratochvíl, L. (2020). Evolution of sex determination in amniotes: Did stress and sequential hermaphroditism produce environmental determination?. *BioEssays*, 42(10), 2000050.
- Straub, T., & Becker, P. B. (2007). Dosage compensation: the beginning and end of generalization. *Nature Reviews Genetics*, 8(1), 47-57.
- Sun, S., & Heitman, J. (2012). Should Y stay or should Y go: The evolution of non-recombining sex chromosomes. *BioEssays*, 34(11), 938-942.
- Suryamohan, K., Krishnankutty, S. P., Guillory, J., Jevit, M., Schröder, M. S., Wu, M., ... & Seshagiri, S. (2020). The Indian cobra reference genome and transcriptome enables comprehensive identification of venom toxins. *Nature genetics*, 52(1), 106-117.
- Szabad, J., Bellen, H. J., & Venken, K. J. (2012). An assay to detect in vivo Y chromosome loss in *Drosophila* wing disc cells. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 2(9), 1095-1102.
- Takagi, N., & Sasaki, M. (1974). A phylogenetic study of bird karyotypes. *Chromosoma*, 46(1), 91-120.
- Takehana, Y., Demiyah, D., Naruse, K., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2007). Evolution of different Y chromosomes in two medaka species, *Oryzias dancena* and *O. latipes*. *Genetics*, 175(3), 1335-1340.

- Takehana, Y., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2008). Different origins of ZZ/ZW sex chromosomes in closely related medaka fishes, *Oryzias javanicus* and *O. hubbsi*. *Chromosome Research*, 16(5), 801-811.
- Takehana, Y., Naruse, K., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2007). Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. *Chromosoma*, 116(5), 463-470.
- Tanaka, K., Takehana, Y., Naruse, K., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2007). Evidence for different origins of sex chromosomes in closely related *Oryzias* fishes: substitution of the master sex-determining gene. *Genetics*, 177(4), 2075-2081.
- Tandonnet, S., Koutsovoulos, G. D., Adams, S., Cloarec, D., Parihar, M., Blaxter, M. L., & Pires-daSilva, A. (2019). Chromosome-wide evolution and sex determination in the three-sexed nematode *Auanema rhodensis*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(4), 1211-1230.
- Tennessen, J. A., Govindarajulu, R., Liston, A., & Ashman, T. L. (2016). Homomorphic ZW chromosomes in a wild strawberry show distinctive recombination heterogeneity but a small sex-determining region. *New Phytologist*, 211(4), 1412-1423.
- Thépot D. (2021) Sex chromosomes and master sex-determination genes in tortles and other reptiles. *Genes*.
- The Tree of Sex Consortium (2014). Tree of Sex: A database of sexual systems. *Scientific Data*, 1.
- Tinsley, M. C., & Majerus, M. E. N. (2006). A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Parasitology*, 132(6), 757-765.
- Traut, W., Sahara, K. & Marec, F. (2007). Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex Dev* 1(6):332-46.
- Tree of Sex Consortium. (2014). Tree of Sex: A database of sexual systems. *Scientific Data*, 1.

- Tucker, P. K., Adkins, R. M., & Rest, J. S. (2003). Differential rates of evolution for the ZFY-related zinc finger genes, Zfy, Zfx, and Zfa in the mouse genus *Mus*. *Molecular biology and evolution*, 20(6), 999-1005.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., & Iguchi, T. (2004). An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(1), 11-20.
- Uebbing, S., Künstner, A., Mäkinen, H., & Ellegren, H. (2013). Transcriptome sequencing reveals the character of incomplete dosage compensation across multiple tissues in flycatchers. *Genome biology and evolution*, 5(8), 1555-1566.
- Uetz, P. (2020). The reptile database.
- Valenzuela, N., & Lance, V. (Eds.). (2004). *Temperature-dependent sex determination in vertebrates* (pp. 1-194). Washington, DC: Smithsonian Books.
- Van Doorn, G. S., & Kirkpatrick, M. (2007). Turnover of sex chromosomes induced by sexual conflict. *Nature*, 449(7164), 909-912.
- van Doorn, G. S., & Kirkpatrick, M. (2010). Transitions between male and female heterogamety caused by sex-antagonistic selection. *Genetics*, 186(2), 629-645.
- Vaz, S. C., Vibranovski, M. D., & Carvalho, A. B. (1998). Sex-ratio citoplasmático em *Drosophila roehrae*. *Genet. Mol. Biol*, 21, 260.
- Venkatesh, B., Lee, A. P., Ravi, V., Maurya, A. K., Lian, M. M., Swann, J. B., ... & Warren, W. C. (2014). Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature*, 505(7482), 174-179.
- Veyrunes, F., Chevret, P., Catalan, J., Castiglia, R., Watson, J., Dobigny, G., ... & Britton-Davidian, J. (2010). A novel sex determination system in a close relative of the house mouse. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1684), 1049-1056.
- Veyrunes, F., Waters, P. D., Miethke, P., Rens, W., McMillan, D., Alsop, A. E., ... & Graves, J. A. M. (2008). Bird-like sex chromosomes of platypus

- imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome research*, 18(6), 965-973.
- Vicoso, B., & Bachtrog, D. (2011). Lack of global dosage compensation in *Schistosoma mansoni*, a female-heterogametic parasite. *Genome Biology and Evolution*, 3, 230-235.
 - Vicoso, B., & Bachtrog, D. (2015). Numerous transitions of sex chromosomes in Diptera. *PLoS biology*, 13(4), e1002078.
 - Vicoso, B., & Charlesworth, B. (2006). Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. *Nature Reviews Genetics*, 7(8), 645-653.
 - Vicoso, B., Kaiser, V. B., & Bachtrog, D. (2013). Sex-biased gene expression at homomorphic sex chromosomes in emus and its implication for sex chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6453-6458.
 - Viets, B. E., Ewert, M. A., Talent, L. G., & Nelson, C. E. (1994). Sex-determining mechanisms in squamate reptiles. *Journal of Experimental Zoology*, 270(1), 45-56.
 - Volff, J. N., Nanda, I., Schmid, M., & Schartl, M. (2007). Governing sex determination in fish: regulatory putsches and ephemeral dictators. *Sexual Development*, 1(2), 85-99.
 - Walters, J. R., Hardcastle, T. J., & Jiggins, C. D. (2015). Sex chromosome dosage compensation in *Heliconius* butterflies: global yet still incomplete?. *Genome biology and evolution*, 7(9), 2545-2559.
 - Wan, Q. H., Pan, S. K., Hu, L., Zhu, Y., Xu, P. W., Xia, J. Q., ... & Fang, S. G. (2013). Genome analysis and signature discovery for diving and sensory properties of the endangered Chinese alligator. *Cell research*, 23(9), 1091-1105.
 - Wang, D., Chen, R., Kong, S., Pan, Q. Y., Zheng, Y. H., Qiu, W. J., ... & Sun, X. F. (2017). Cytogenic and molecular studies of male infertility in cases of Y chromosome balanced reciprocal translocation. *Molecular medicine reports*, 16(2), 2051-2054.

- Washio, K., Mizushima, S., Jogahara, T., & Kuroiwa, A. (2019). Regulation of the Sox3 Gene in an X0/X0 Mammal without Sry, the Amami Spiny Rat, Tokudaia osimensis. *Cytogenetic and genome research*, 159(3), 143-150.
- Werren, J. H. & Beukeboom, L.W. (1998). Sex determination, sex ratios, and genetic conflict. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29:233–261.
- Westergaard, M. (1958). The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Advances in Genetics*, 9 pp. 217-281
- Wexler, J. R., Plachetzki, D. C., & Kopp, A. (2014). Pan-metazoan phylogeny of the DMRT gene family: a framework for functional studies. *Development genes and evolution*, 224(3), 175-181.
- Wilkinson, G. S., Johns, P. M., Metheny, J. D., & Baker, R. H. (2013). Sex-biased gene expression during head development in a sexually dimorphic stalk-eyed fly. *PLoS One*, 8(3), e59826.
- Williamson, D. L., & Poulson, D. F. (1979). Sex ratio organisms (spiroplasmas) of Drosophila. In *The mycoplasmas* (pp. 175-208). Academic press.
- Wilson Sayres, M. A., & Makova, K. D. (2011). Genome analyses substantiate male mutation bias in many species. *Bioessays*, 33(12), 938-945.
- Wilson, C. A., High, S. K., McCluskey, B. M., Amores, A., Yan, Y. L., Titus, T. A., ... & Postlethwait, J. H. (2014). Wild sex in zebrafish: loss of the natural sex determinant in domesticated strains. *Genetics*, 198(3), 1291-1308.
- Wilson, J., Staley, J. M., & Wyckoff, G. J. (2020). Extinction of chromosomes due to specialization is a universal occurrence. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
- Wolf, J. B., & Bryk, J. (2011). General lack of global dosage compensation in ZZ/ZW systems? Broadening the perspective with RNA-seq. *BMC genomics*, 12(1), 1-10.
- Wright, A. E., Moghadam, H. K., & Mank, J. E. (2012). Trade-off between selection for dosage compensation and masculinization on the avian Z chromosome. *Genetics*, 192(4), 1433-1445.
- Wright, S. (1986). *Evolution: selected papers*. University of Chicago Press.

- Wright, S. (1988). Surfaces of selective value revisited. *The American Naturalist*, 131(1), 115-123.
- Wyckoff, G. J., Li, J., & Wu, C. I. (2002). Molecular evolution of functional genes on the mammalian Y chromosome. *Molecular biology and evolution*, 19(9), 1633-1636.
- Yamada, R., Floate, K. D., Riegler, M., & O'Neill, S. L. (2007). Male development time influences the strength of Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 177(2), 801-808.
- Yamaguchi, K., Hara, Y., Kaori, T., Nishimura, O., Smith, J., Kadota, M., & Kuraku, S. (2020). Inference of a genome-wide protein-coding gene set of the inshore hagfish *Eptatretus burgeri*. *bioRxiv*.
- Yamamoto, Y., Zhang, Y., Sarida, M., Hattori, R. S., & Strüssmann, C. A. (2014). Coexistence of genotypic and temperature-dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *PLoS One*, 9(7), e102574.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., ... & Guiguen, Y. (2012). An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22(15), 1423-1428.
- Yao, B., Zhou, L., Wang, Y., Xia, W., & Gui, J. F. (2007). Differential expression and dynamic changes of Sox3 during gametogenesis and sex reversal in protogynous hermaphroditic fish. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 307(4), 207-219.
- Yates, A. D., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., ... & Flicek, P. (2020). Ensembl 2020. *Nucleic acids research*, 48(D1), D682-D688.
- Yoshida, K., & Kitano, J. (2012). The contribution of female meiotic drive to the evolution of neo-sex chromosomes. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 66(10), 3198-3208.
- Yoshimoto, S., Okada, E., Umemoto, H., Tamura, K., Uno, Y., N-U.C., Matsuda, Y., Takamatsu, N., Shiba, T. & Ito, M. (2008). A W-linked DM-

- domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus Laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2469–2474
- Yusa, Y. (2007). Nuclear sex-determining genes cause large sex-ratio variation in the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Genetics*, 175(1), 179-184.
 - Zha, X., Xia, Q., Duan, J., Wang, C., He, N., & Xiang, Z. (2009). Dosage analysis of Z chromosome genes using microarray in silkworm, *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39(5-6), 315-321.
 - Zhang, G. (2018). The bird's-eye view on chromosome evolution. *Genome biology*, 19(1), 1-3.
 - Zheng, D., Frankish, A., Baertsch, R., Kapranov, P., Reymond, A., Choo, S. W., ... & Gerstein, M. B. (2007). Pseudogenes in the ENCODE regions: consensus annotation, analysis of transcription, and evolution. *Genome research*, 17(6), 839-851.
 - Zheng, Y., & Wiens, J. J. (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). Sex-specific adaptation drives early sex chromosome evolution in *Drosophila*. *Science*, 337(6092), 341-345.
 - Zimmerman, J. K. (1991). Ecological Correlates of Labile Sex Expression in the Orchid *Catasetum Viridiflavum*: Ecological Archives E072-001. *Ecology*, 72(2), 597-608.