

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Alexandr Sember

**Cytogenetika vybraných skupin paprskoploutvých ryb (Actinopterygii): Evolučně-ekologické aspekty spjaté s dynamikou repetitivních sekvencí a s výskytem polyploidie**

**Cytogenetics of selected groups of ray-finned fishes (Actinopterygii): Evolutionary-ecological questions associated with the dynamics of repetitive sequences and the occurrence of polyploidy**

Dizertační práce

Vedoucí práce: Prof. Ing. Petr Ráb, DrSc.

Konzultanti: Mgr. Radka Symonová, Ph.D.

Dr. Jörg Bohlen, Ph.D.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

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

V Praze, 16. 3. 2016

Podpis.....



## **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svým kolegům, přátelům a všem, kteří jakýmkoliv způsobem přispěli ke vzniku této práce. Především bych rád poděkoval Dr. Jörgovi Bohlenovi, Ph.D. za uvedení do taxonomie, systematiky a fylogenie (nejen) sekavcovitých ryb, Mgr. Radce Symonové, Ph.D. za uvedení do sofistikovaných metod molekulární cytogenetiky a svému školiteli Prof. Ing. Petru Rábovi, DrSc. za všestrannou podporu a další vedení. Dále bych rád poděkoval všem dalším spoluautorům publikací uvedených v této dizertační práci a z nich jmenovitě Mgr. Vendule Bohlen Šlechtové, Ph.D., RNDr. Vlastimilu Šlechtovi, CSc., Ing. Věře Šlechtové, CSc., Mgr. Marii Altmanové, Ing. Marii Rábové, CSc., Mgr. Zuzaně Majtánové a Mgr. Tereze Kořínkové, Ph.D. za jejich úsilí, bez něhož by tato práce nemohla vzniknout v aktuální podobě. Marušce Altmanové bych dále chtěl velmi poděkovat za její nedocenitelnou podporu a rady zejména v oblasti grafického zpracování cytogenetických výsledků. Dále bych moc rád poděkoval RNDr. Martině Johnson Pokorné, Ph.D. a Chrisovi Johnsonovi za pomoc s psaním anglického textu. Mé díky patří i dalším členům Laboratoře genetiky ryb či jiných pracovních týmů ÚŽFG AV ČR v Liběchově – jmenovitě Janičce Čechové, Šárce Pelikánové a Petře Šejnohové za šikovné ruce a milý úsměv a dále pak Mgr. Marii Doležálkové, RNDr. Petru Kotlíkovi, Ph.D., RNDr. Silvii Markové, Ph.D., RNDr. Lukáši Cholevovi, Ph.D. za jejich užitečné rady, pomocnou ruku a kamarádský přístup. Všem dalším současným i bývalým kolegům z laboratoře včetně zahraničních stážistů, na něž se jmenovitě nedostalo, i když by si to určitě zasloužili, děkuji za cenné rady a dobrou atmosféru v laboratoři. Velice si také vážím rad a pomoci od kolegů z jiných českých i zahraničních laboratoří a institucí, jmenovitě: Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi a MSc. Cassia Fernanda Yano (University Federal of Sao Carlos, Brazílie), Dr. Sc. Konrad Ocalewicz (University of Gdansk, Polsko), Mgr. Martina Koubová, Mgr. Věra Opatová, Ph.D., RNDr. Jiří Král, CSc., RNDr. Olga Rothová, Ph.D.,

RNDr. Marie Kočová, CSc., Doc. Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D., a Dr. Michail Rovatsos Ph.D. (PřF UK v Praze), Prof. RNDr. František Marec, CSc., Mgr. Martina Dalíková Ph.D. a další členové Laboratoře molekulární cytogenetiky ENTÚ AVČR, České Budějovice. Ohromné díky patří také mojí přítelkyni Veronice Perutkové za svatou trpělivost a podporu a všem mým přátelům, které není možné zde všechny vyjmenovat, ale jsem si jistý, že vědí, jak moc pro mě znamenají.

Tato práce vznikla za finanční podpory následujících grantů: GAČR, projekty č. 206/08/0637, 523/08/0824, P506/11/P596, 13-37277S, 14-02940S, GAUK 43-251468 a RVO: 67985904.



4.1. Použitý biologický materiál .....	66
4.2. Výčet použitých metod .....	66
5. Výsledky .....	67
5.1. Souhrnný komentář k publikacím zahrnutým do dizertace .....	67
5.2. Publikace zahrnuté do dizertace .....	71
5.2.1. Publikace 1 (Sember et al. 2015) .....	74
5.2.2. Publikace 2 (Symonová et al. 2013b) .....	115
5.2.3. Publikace 3 (Symonová et al. 2013a).....	127
5.2.4. Publikace 4 (Symonová et al. 2015) .....	139
5.2.5. Publikace 5 (Bohlen et al., in rev.).....	155
6. Souhrnná diskuze .....	191
7. Závěr .....	210
8. Seznam literatury .....	211

## Seznam zkratek

<b>AT</b>	pár bází <u>a</u> denin- <u>t</u> hymín
<b>BAC</b>	<u>b</u> acterial <u>a</u> rtificial <u>c</u> hromosome – vektor pro klonování DNA, využívaný mj. pro účely mapování unikátních (tj. nerepetitivních) sekvencí metodou FISH
<b>CGH</b>	<u>c</u> omparative genome <u>h</u> ybridization – metoda používaná pro odhalení rozdílů mezi dvěma genomy, sondou jsou dvě celogenomové DNA
<b>CMA<sub>3</sub></b>	<u>C</u> hromomycin <u>A</u> <sub>3</sub> – fluorescenční barvivo se specifickou vazbou na GC-bohaté úseky DNA
<b>DAPI</b>	4',6- <u>d</u> iamidino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndol – fluorescenční barvivo se specifickou vazbou na AT-bohaté úseky DNA
<b>DTEs</b>	<u>D</u> NA <u>t</u> ransposable <u>e</u> lements – transponovatelné element, podtřída DNA transpozóny
<b>ETS</b>	<u>e</u> xternal <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pacer – vnější přepisovaný mezerník v transkripční jednotce 45S rDNA
<b>FISH</b>	<u>f</u> luorescence <i>in situ</i> <u>h</u> ybridization – fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<b>GC</b>	pár bází <u>g</u> uanin- <u>c</u> ytosin
<b>GISH</b>	genomic <i>in situ</i> <u>h</u> ybridization – metoda používaná pro odhalení rozdílů mezi dvěma genomy, sondou je jedna celogenomová DNA
<b>het-ITs</b>	<u>h</u> eterochromatin <u>i</u> nterstitial <u>t</u> elomeric <u>s</u> equences/ <u>s</u> ites – rozsáhlé vnitřní telomerické sekvence asociované s heterochromatinem
<b>IGS</b>	<u>i</u> ntergenic <u>s</u> pacer – mezerník v transkripční jednotce 45S rDNA obsahující různé regulační oblasti
<b>ITS</b>	<u>i</u> nternal <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pacer – vnitřní přepisovaný mezerník v transkripční jednotce 45S rDNA
<b>ITs</b>	<u>i</u> nterstitial <u>t</u> elomeric <u>s</u> equences/ <u>s</u> ites – vnitřní telomerické sekvence
<b>LTR</b>	<u>l</u> ong <u>t</u> erminal <u>r</u> epet – dlouhé koncové přímé repetice, charakteristické pro jednu ze dvou hlavních podtříd retrotranspozónů a pro retroviry
<b>MYA</b>	<u>m</u> illion <u>y</u> ears <u>a</u> go – milióny let v čase bazpět
<b>NF</b>	<u>n</u> ombre <u>f</u> ondamental – celkový počet chromozómových ramének v karyotypu
<b>NGS</b>	<u>n</u> ext <u>g</u> eneration <u>s</u> equencing – metody sekvenování nové generace

<b>NOR</b>	<u>n</u> ucleolar <u>o</u> rganizer <u>r</u> egion – organizátor jadérka, oblast na jednom až více párech chromozómů, kde se nachází geny pro 45S rRNA (kromě genů pro 5S rRNA) (nucleolus organizer region)
<b>NTS</b>	<u>n</u> on- <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pacer – nepřepisovaný mezerník v transkripční jednotce 5S rDNA
<b>PCR</b>	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction – polymerázová řetězová reakce
<b>PNA</b>	<u>p</u> eptid <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid – peptidová nukleová kyselina, modifikace využívaná pro specifitější analýzu metodou FISH
<b>qPCR</b>	<u>q</u> uantitative <u>r</u> eal-time <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction – kvantitativní polymerázová řetězová reakce
<b>rDNA</b>	<u>r</u> ibosomal <u>D</u> NA – oblast na jednom až více párech chromozómů kódující geny pro ribozomální RNA
<b>RTEs</b>	<u>r</u> etro <u>t</u> ransposable <u>e</u> lements – retrotranspozóny
<b>satDNA</b>	<u>s</u> atellite <u>D</u> NA – satelitní DNA
<b>snRNA</b>	<u>s</u> mall <u>n</u> uclear <u>R</u> NA – malé jaderné RNA
<b>TEs</b>	<u>t</u> ransposable <u>e</u> lements – transponovatelné elementy
<b>WCP</b>	<u>w</u> hole <u>c</u> hromosome <u>p</u> ainting – varianta FISH využívající celý chromozóm nebo jeho část jako malovací sondu
<b>TOR</b>	<u>t</u> arget <u>o</u> f <u>r</u> apamycin – serin/threoninová proteinkináza hrající mj. úlohu v kontrole buněčného růstu v závislosti na obsahu živin; má vliv na expresi rDNA
<b>TSA</b>	<u>t</u> yramid <u>s</u> ignal <u>a</u> mplification – amplifikace signálu pomocí tyramidu, metoda zesílení signálu při detekci sond metody FISH
<b>TSGD</b>	<u>t</u> eleost-specific <u>w</u> hole-genome <u>d</u> uplication – celogenomová duplikace specifická pro kostnaté ryby
<b>WGD</b>	<u>w</u> hole <u>g</u> enome <u>d</u> uplication – celogenomová duplikace, polyploidie
<b>2n</b>	diploidní počet chromozómů

## Abstrakt

Paprskoploutvé ryby (Actinopterygii) jsou druhově nejpočetnější skupinou obratlovců na zemi. Většinu jejich druhové diverzity tvoří ryby kostnaté (Teleostei), jejichž evoluční úspěch bývá spojován s celogenomovou duplikací, která nastala u vzniku této skupiny, tj. po jejich divergenci od ostatních paprskoploutvých ryb. I přes vzrůstající počet genomických a transkriptomických studií je dosud nejvíce informací o genomech ryb známo na úrovni měření obsahů DNA a analýzy karyotypů. Genomy paprskoploutvých a zejména kostnatých ryb jsou značně dynamické a obsahují pestrou škálu repetitivních sekvencí, jejichž variabilita stojí za pozoruhodným rozpětím ve velikostech jejich genomů a má vliv i na diferenciaci karyotypů. Paprskoploutvé ryby jsou proto vhodným modelem pro řadu studií, jejichž cílem je objasnit úlohu genomové variability v procesu evoluce, morfologické a ekologické diverzifikace a adaptace. Zejména mapování repetitivních sekvencí metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) přineslo v posledních dvou desetiletích poznatky velice užitečné při utváření představ o architektuře rybích genomů a při řešení nejrůznějších evolučních, taxonomických a ekologických otázek. Tato práce se zabývá studiem dynamiky karyotypů, repetitivních sekvencí a polyploidizace u vybraných druhů Teleostei a Chondrostei, jejichž ekologicko-evoluční charakteristiky nabízejí možnost konfrontovat tyto výsledky s komplexnější problematikou. Vedle metod konvenční cytogenetiky bylo zahrnuto mapování genů pro ribozomální RNA, retrotranspozónů a telomerických (TTAGGG)<sub>n</sub> repetitivních sekvencí metodou FISH a mezidruhové srovnávací analýzy metodou komparativní genomové hybridizace (CGH) a genomové *in situ* hybridizace (GISH). Naše výsledky ukazují, že dynamika a variabilita repetitivních sekvencí mohou hrát podstatnou úlohu v ekologické adaptaci, speciaci a evoluci polyploidních genomů a to i v kontrastu s relativně stabilní makrostrukturou karyotypů (především diploidního počtu chromozómů, 2n). Výsledky této práce prokazují, že molekulárně-cytogenetický přístup je stále plodnou disciplínou, která je schopná vnést světlo do řady dosud neobjasněných témat na úrovni vztahu genomu a evoluce/ekologie rybích druhů a ukazuje na důležitost integrace cytogenetických/cytogenomických dat s výsledky jiných vědeckých přístupů.

**Klíčová slova:** autopolyploidie vs. allopolyploidie, dynamika genomu, GISH/CGH, FISH, heterochromatin, chromozómové přestavby, karyotypová diferenciaci, ribozomální RNA, Teleostei, transponovatelné elementy

## Abstract

Ray-finned fishes (Actinopterygii) exhibit the greatest biodiversity among vertebrates. The vast majority of extant actinopterygian fish species belong to clade Teleostei - a lineage whose significant evolutionary success might have resulted from a teleost specific whole-genome duplication (TSGD) that occurred at the onset of this group, subsequent to its divergence from the rest of actinopterygian lineages. Despite the growing body of sequenced fish genomes and analyses of their transcriptomes, the largest contribution to understanding fish genomes comes from analyses of DNA content and from cytogenetics. Genomes of ray-finned fishes and especially those of Teleostei exhibit vast diversity and rapid dynamics of repetitive DNA sequences whose variability is reflected in a wide range of fish genome sizes and in the dynamics behind karyotype differentiation. Therefore, ray-finned fishes offer a unique opportunity to study genome variability as a driving force underlying morphological and ecological diversification, evolution and adaptation. Particularly, the mapping of repetitive DNA sequences by means of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) has proven to be a very useful and informative approach during the last two decades and contributed greatly to our understanding of the fish genome architecture together with new insights into a large amount of evolutionary, ecological and taxonomic matters and questions. The present study is focused on karyotype differentiation, specifically on the distribution of repetitive sequences and polyploidy events in selected species of Teleostei and Chondrostei with the aim to integrate cytogenetic and taxonomic approaches in order to provide a more complex view of particular evolutionary and ecological features of the respective fish groups. Together with conventional cytogenetic analysis, we employed FISH with probes complementary to tandem repetitive sequences such as ribosomal rRNA genes (rDNA), retrotransposable elements and telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences. Additionally, we performed comparative genome hybridization (CGH) and genomic *in situ* hybridization (GISH) in order to compare the genomes of hybrid specimens or closely-related species. Our data clearly show that the dynamics and variability of repetitive sequences may play a significant role in ecological adaptation and speciation, as well as in polyploid genome evolution and that this can be traced even in species groups with generally conserved karyotype macrostructure (particularly for the level of diploid chromosome number, 2n). Our results have demonstrated the importance of integrating cytogenetic/cytogenomic approaches with other biological disciplines and that molecular cytogenetics has an enormous potential in the post-genomic era, hence offering new insights



towards extending the knowledge on different kinds of unsolved evolutionary-ecological questions related to the evolution of the fish genome.

**Key words:** autopolyploidy vs. allopolyploidy, genome dynamics, GISH/CGH, FISH, heterochromatin, chromosome rearrangements, karyotype differentiation, ribosomal RNA, Teleostei, transposable elements

## 1. Úvod

Paprskoplovtvé ryby (Actinopterygii) jsou monofyletickou skupinou, která tvoří více než 95% druhové diverzity všech ryb na zemi (Volf 2005, Nelson 2006). Zahrnují přes 30 000 dosud popsáných druhů<sup>1</sup> (Sallan 2014, Plíštil 2016, Eschmeyer et al. 2016) a představují tedy více než polovinu žijících obratlovců na této planetě (55 000). Jedná se o extrémně diverzifikovanou skupinu, jejíž zástupci osídlili téměř všechny vodní habitaty na Zemi (Nelson 2006). Některé druhy paprskoplovtvých ryb se staly vhodným modelem pro studium funkce genů a vývoje obratlovců – typicky např. dánío pruhované *Danio rerio* a medaka japonská *Oryzias latipes* (Furutani-Seiki a Wittbrodt 2004, Mayden et al. 2007, Takeda a Shimada 2010, McCluskey a Postlewait 2015). Kromě toho se zde najdou vhodné modelové druhy a skupiny využívané pro studium populační genetiky, ekologie a evoluce (Sallan 2014, Braasch et al. 2015). Nejznámějším příkladem je studium ohromné adaptivní radiace u cichlid z afrických jezer (např. Kocher 2004). V neposlední řadě se různé aspekty biologie ryb studují ve zvýšené míře u hospodářsky významných rybích druhů, např. u jeseterů a lososovitých (např. Porto-Foresti et al. 2007, Havelka et al. 2011).

Recentní paprskoplovtvé ryby zahrnují celkem pět fylogenetických linií (kterým je v různých systémech přiznáván různý taxonomický status) a z nichž čtyři představují druhově chudé relikty dřívě rozšířených skupin – bichři (Polypteriformes – dva rody), jeseteři, lopatonosi a veslonosi (Acipenseriformes – šest rodů, z nichž dva jsou ale parafyletické), kostlíni (Lepisosteiformes - dva rody) a kaprouni (Amiiformes – jeden rod s jediným druhem) (Obr. 1). Poslední linii paprskoplovtvých představují ryby kostnaté (Teleostei) zahrnující naprostou většinu dnes existující biodiverzity ryb vůbec (přes 4500 rodů) (Nelson 2006). Zatímco na fylogenetické postavení bichřů a jeseterů v rámci paprskoplovtvých ryb panuje víceméně názorová shoda, u ostatních tří linií tomu tak není. Od chvíle, kdy byla rozeznána jejich evoluční odlišnost, tedy více než 150 let, se diskutuje o jejich vzájemném vztahu. Zatímco práce založené na znacích morfologických, paleontologických a jejich kombinacích považují kostlíny a kaprouny za monofyletickou skupinu (Holostei) (Obr. 1), která je sesterská Teleostei, práce založené více na nemorfologických (tj. molekulárních, biochemických apod.) znacích považují kaprouny a Teleostei za monofyletickou skupinu (Halecostomi), která je sesterská kostlínům. Tento tzv. Holostei – Halecostomi problém a jeho historii a nejnovější vývoj v poslední době podrobně

---

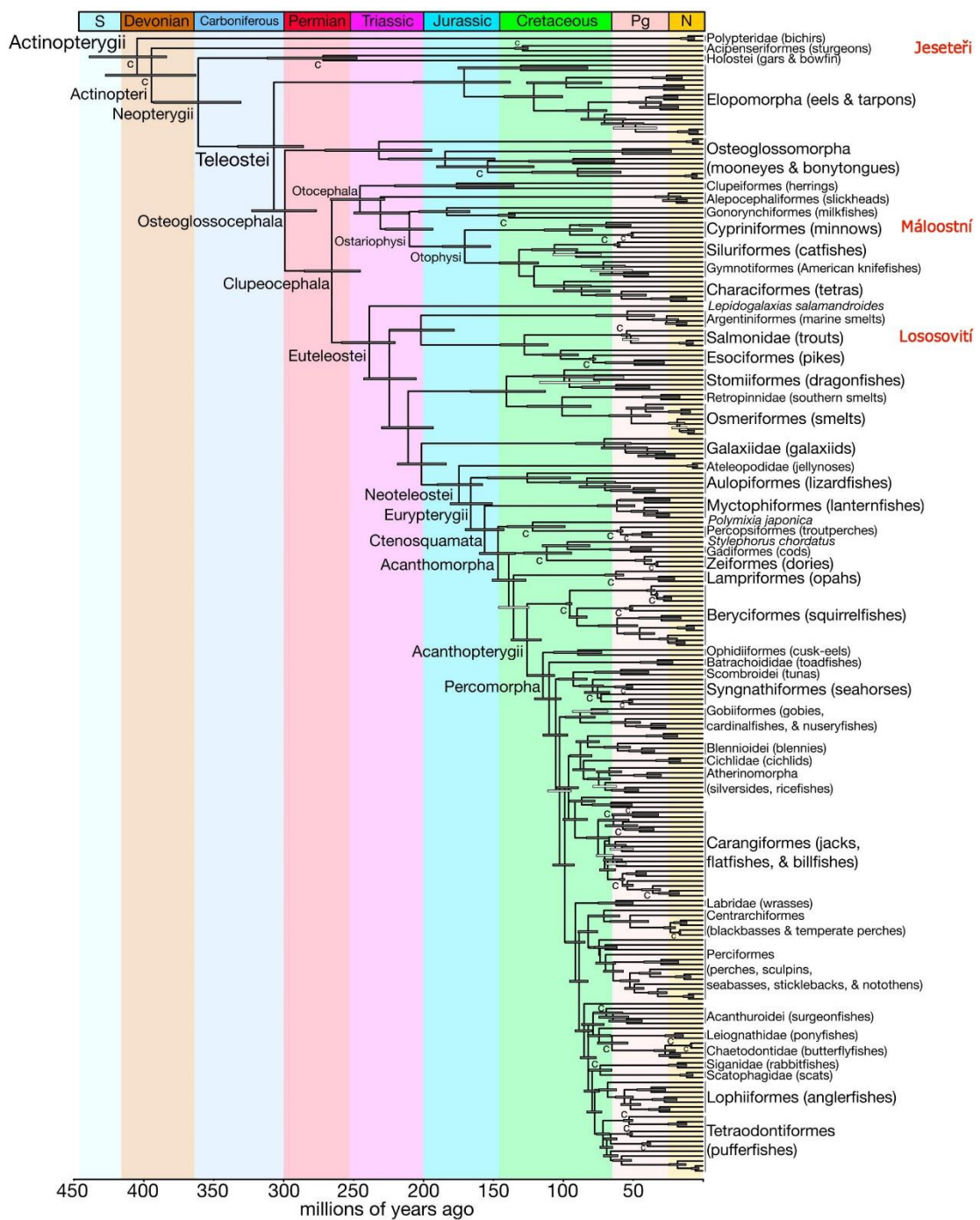
<sup>1</sup> Česká druhová jména ryb v této práci jsou uváděna podle: [www.aquatab.net](http://www.aquatab.net) (Plíštil 2016).

shrnuje Sallan (2014). Je také pozoruhodné, že rovněž cytogenetická data podporují konstrukce Halecostomi (Majtánová et al. 2015).

Vedou se četné debaty, jak moc k ohromné diverzifikaci kostnatých ryb přispěla celogenomová duplikace (TSGD – teleost-specific whole-genome duplication), která proběhla u předka této skupiny přibližně před 226-316 miliony lety (Hurley et al. 2007). Je však zcela zřejmé, že TSGD poskytla nový genetický materiál pro evoluci variant genů a pro re-strukturalizaci rybích genomů (Braasch & Postlethwait 2012). Značná rybí diverzita může být dále pozitivně ovlivněna faktem, že ryby jsou oproti ostatním skupinám obratlovců více tolerantní k nejrůznějším změnám na genomové, chromozómové i genetické úrovni (Venkatesh 2003, Ravi & Venkatesh 2008) a vykazují značnou senzitivitu ve smyslu akumulace repetitivních sekvencí (Kidwell 2002, Biémont & Vieira 2006). Tyto charakteristiky se odrážejí mj. v rozsahu diploidních počtů chromozómů ( $2n = 12 - 446$ ) (Arai 2011), ale hlavně ve značném rozpětí ve velikostech rybích genomů (0,35 – 9,32 pg DNA/haploidní genom) (Gregory 2016). Pozoruhodná je např. analýza kompaktních genomů čtverzubců *Tetraodon nigroviridis* a *Takifugu rubripes*, kteří mají jedny z nejmenších genomů mezi obratlovcy vůbec, a to zejména v důsledku značně redukovaného obsahu repetitivních sekvencí (Roest Crollius et al. 2000, Aparicio et al. 2002, Fischer et al. 2004, Jaillon et al. 2004).

Zatímco genom čtverzubce rudoploutvého *Takifugu rubripes* byl v roce 2002 prvním plně osekvenovaným genomem u ryb (a v pořadí druhým u obratlovců) (Aparicio et al. 2002), v současné době jsou již k dispozici první verze (drafty) genomových sekvencí celkem u 60 druhů paprskoploutvých ryb (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Drtivou většinu tvoří zástupci kostnatých ryb, ale několik genomů už je známo i u jiných rybích skupin (např. kostlín *Lepisosteus oculatus*). V brzké době se očekává publikace prvních genomů u jeseterů – *Acipenser sinensis* (Bernardi et al. 2012), *A. naccari* (<http://compgen.bio.unipd.it/anaccariibase/>), *A. ruthenus* (Havelka M., osobní sdělení) a také u příčnoústé ryby *Calorhynchus milli* (<http://esharkgenome.imcb.a-star.edu.sg/>), která následně může posloužit jako užitečný outgroup pro Actinopterygii. Souběžně se sekvenačními projekty (a z velké části i na podporu jejich správného poskládání) se u ryb začínají stále více objevovat studie zabývající se rybí transkriptomikou, konstrukcí nejrůznějších typů genetických map a analýzami konzervované syntenie (tedy analýzy lokusů, které se nacházejí spolu na jednom vlákně DNA u jednoho organismu a hledá se, zda-li je toto uspořádání stejné u dvou či více srovnávaných druhů; Ehrlich et al. 1997) (přehled viz Braasch et al. 2015). Podobné analýzy však komplikuje přítomnost paralogů (tj.

homologů genů odvozených genovou duplikací) po jedné či více polyploidizačních událostech (Braasch et al. 2015). Navíc kvůli problémům s finálním umístěním repetitivních sekvencí bývají tyto sekvence často z poskládaného genomu vyřazeny (přestože mnohdy tvoří jeho podstatnou část) (Van Oeveren et al. 2011). Proto se ví stále relativně málo o struktuře a organizaci rybích genomů. Dosud bylo v tomto ohledu nejvíce informací získáno na základě analýz velikostí genomů pomocí měření obsahů DNA a dále prostřednictvím (molekulárně) cytogenetických studií, kde se ukázalo být mimořádně cenným zdrojem informací mapování různých typů repetitivních sekvencí (např. Fischer et al. 2004, Martins 2007, Cabral-de-Mello & Martins 2010, Arai 2011, Cioffi & Bertollo 2012). Úloha molekulární cytogenetiky je i v dnešní (tj. postgenomové) době nezpochybnitelná, mj. s ohledem na nutnost tvorby fyzických map pro účely správného poskládání osekvenovaných genomů (Lewin et al. 2009, Van Oeveren et al. 2011). Navíc díky značným pokrokům v molekulární genetice, mikroskopii a bioinformatice se i vědní disciplína zabývající se chromozómy neustále vyvíjí a posouvá metodologicky kupředu a je schopná nadále poskytnout odpovědi na celé spektrum systematických, taxonomických, evolučních a ekologických otázek. Tím spíše, pokud se získaná data integrují a interpretují v kontextu s výsledky jiných, zejména fylogenetických, genomických, populačních či morfometrických analýz (Jaillon et al. 2004, Robinson et al. 2008, Oliveira et al. 2009, Mazzuchelli et al. 2012, Sotero-Caio et al. 2015, Valente et al. 2016). Tato práce se o takový přístup snaží a pokouší se poskytnout vhled do dynamiky genomů vybraných skupin paprskoploutvých ryb na chromozómové a sub-chromozómové úrovni pro objasnění konkrétních otázek spjatých s evolucí, ekologií a speciací u těchto skupin.



**Obř. 1:** Systematické členění ryb s časovou osou datující divergence jednotlivých skupin. Taxonomické skupiny zahrnující ryby analyzované v této práci jsou zvýrazněny červeným textem. Upraveno podle Near et al. 2012.

## 2. Cíle práce

Jelikož paprskoploutvé ryby zahrnují polovinu diverzity všech obratlovců, byla by hloubková analýza na úrovni zástupců všech jednotlivých skupin obsahově nad rámec této práce i nad možnosti jedné laboratoře. Svůj cytogenetický výzkum jsem proto soustředil na vybrané skupiny, které svými ojedinělými vlastnostmi nabízejí vhodnou příležitost pro analýzu dynamiky repetitivních sekvencí za účelem lepšího porozumění procesům karyotypové diferenciaci a genomové evoluce u paprskoploutvých ryb a kde zároveň mohou získané výsledky přispět k zodpovězení komplexnějších, zejména evolučně-ekologických otázek. Vedle zástupců dvou velkých skupin kostnatých ryb (Cobitoidea a Salmonidae) byli analyzováni také jeseteři (Acipenseridae) jakožto zástupci bazálních skupin paprskoploutvých ryb nepatřících mezi kostnaté.

Hlavní cíle předkládané dizertační práce lze definovat v následujících bodech:

- Ověřit potenciál karyotypových změn jako evoluční síly v pozadí enormní systematické a odtud taxonomické a ekologické diverzifikace mřenek čeledi Nemacheilidae (Teleostei: Cobitoidea).
- Prostudovat vliv repetitivních sekvencí na proces sympatrické speciace u dvou druhů síhů (Teleostei: Salmoniformes) ze severoněmeckého jezera Stechlin – široce rozšířeného síha malého *Coregonus albula* a endemického síha stechlinského *C. fontanae*.
- Popsat možnosti využití metod GISH a CGH v cytogenetické analýze ryb a optimalizovat je pro analýzu vybraných skupin paprskoploutvých ryb
- Pomocí metod GISH a CGH analyzovat genomovou kompozici u mezidruhových hybridů jeseterů (Chondrostei: Acipenseriformes), vyprodukovaných v akvakultuře z druhů jeseter malý *Acipenser ruthenus*, jeseter ruský *A. gueldenstaedtii* a jeseter sibiřský *A. baerii*, ve snaze objasnit cytogenetické pozadí přetrvávající fertility u jeseteřích hybridů, často vysoce polyploidních.
- Analyzovat původ endemické sekavky '*Botia*' *zebra* (Teleostei: Cobitoidea), potenciálního hybrida druhů *Leptobotia guilinensis* (2n) a *Sinibotia pulchra* (4n).

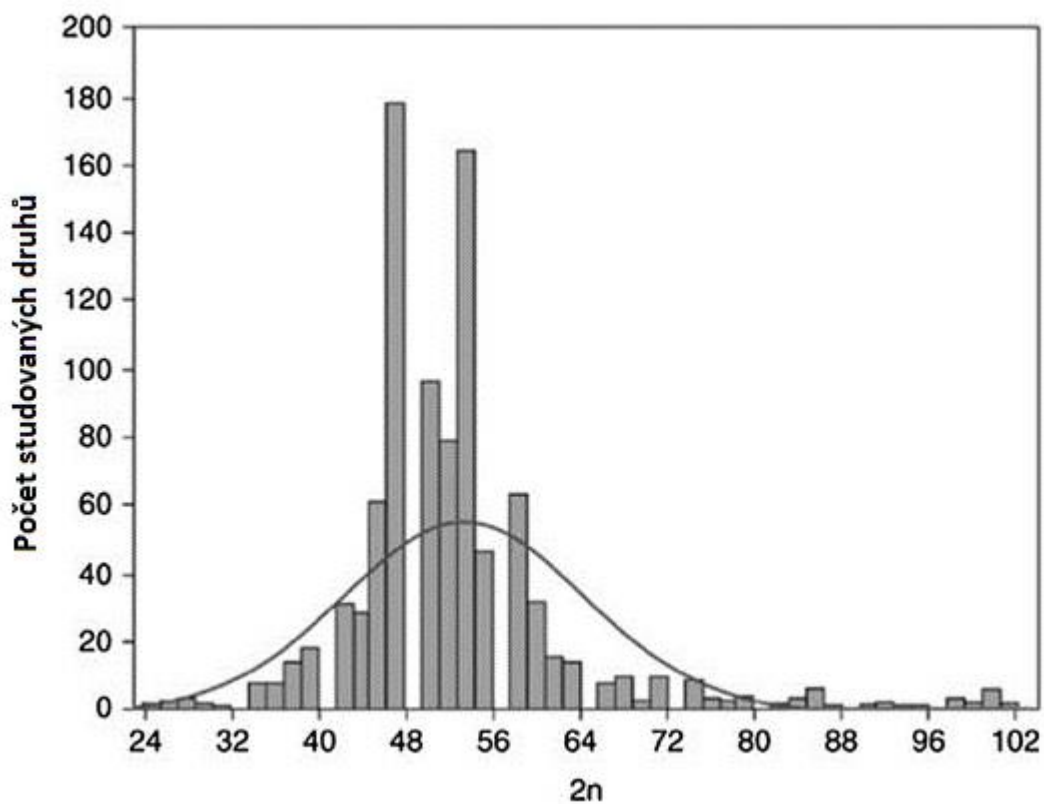
### 3. Literární přehled

#### 3.1. Základní charakteristiky karyotypů ryb

Cytogenetika se stala v řadě případů důležitým přístupem pro studium evoluční biodiverzity ryb (Molina 2007, Oliveira et al. 2009, Artoni et al. 2015). Vzhledem k tomu, že ryby celkově tvoří více než polovinu všech druhů dnešních obratlovců, přispívají cytogenetické analýzy této skupiny zároveň i k objasnění procesů v pozadí evoluce a organizace genomů obratlovců obecně (Martins & Cabral-de-Mello 2010). Poslední dosud publikovaný přehled (Arai 2011) zahrnuje přes 3 400 karyotypovaných rybích druhů, což představuje jen nepatrný zlomek z celkové rybí biodiverzity. Přestože se počet karyotypovaných druhů každým rokem navyšuje, tak s ohledem na každoroční exponenciální nárůst nových popsáných rybích druhů (Eschmeyer et al. 2016) se procentuelně podíl známých karyotypovaných druhů spíše paradoxně snižuje. Abychom získali nějakou ucelenější představu o karyotypové diferenciaci/evoluci ryb, zbývá do celkové mozaiky poskládat ještě většina dílků. Nicméně již nyní z dostupných údajů je zřejmé, že ohromná rybí biodiverzita je odrazem dynamických procesů na genomové úrovni, které i s ohledem na proběhlé celogenomové duplikace mají poněkud volnější manipulační prostor a činí tak rybí genom plastickým (Robinson-Rechavi et al. 2001, Venkatesh 2003, Volff 2005, Ravi & Venkatesh 2008). To se nepochybně odráží jak v morfologické a ekologické variabilitě (Nelson 2006), tak i v karyotypové diferenciaci a evoluci (Kohn et al. 2006, Molina 2007, Mank & Avise 2006, Arai 2011, Molina et al. 2014).

Zatímco teplokrevní obratlovci obvykle bývají velice citliví na různé cytogenetické změny, jež ve svém důsledku mohou vést k letalitě nebo k infertilitě (Otto & Whitton 2000), studenokrevní obratlovci tolerují změny na chromozómové úrovni daleko lépe (Mable et al. 2011). Proto se mohou tyto změny daleko efektivněji projevit jako faktor v pozadí evolučních procesů u dané skupiny živočichů, zejména tedy u plazů a ryb (Comai 2005, Otto 2007, Mable et al. 2011). Zejména některé skupiny ryb vykazují značnou plasticitu genomu projevující se zvýšenou náchylností k opakovaným procesům polyploidizace (např. máloostní – Cypriniformes) (Benfey 1989, Amores et al. 1998, Pandian a Koteeswaran 1998, Leggatt & Iwama 2003, Taylor et al. 2003, Mank & Avise 2006, Yang et al. 2015) a k produkci mezidruhových hybridů (Schultz 1969, Dawley & Bogart 1989, Schwartz 2001, Saitoh et al. 2010 a další). Pravděpodobně jsou tyto jevy u paprskoploutvých ryb podporovány krom výše zmiňované flexibility genomu rovněž vysokou frekvencí výskytu neredukovaných gamet a sklony k hybridizaci (Mable et al. 2011, Mason & Pires 2015).

Uvedené změny spolu s rozdílnou afinitou k akumulaci různých typů repetitivních sekvencí vedou k výrazným změnám ve složení a velikostech rybích genomů, které mohou být patrné i mezi blízce příbuznými druhy (Hinegardner & Rosen 1972, Hardie & Hebert 2004, Pie et al. 2007, Smith & Gregory 2009, Gregory 2016). Značná variabilita je u ryb patrná i co se týče rozpětí diploidních počtů chromozómů – od  $2n = 12$  u *Gonostoma bathyphilum* (Gonostomatidae) (Post 1974) do  $2n = 446$  u *Ptychobarbus dipogon* (Cyprinidae) (Yu & Yu 1990). Avšak u většiny druhů ryb se diploidní počty pohybují v rozmezí od 44 do 52 chromozómů (Obr. 2), přičemž téměř 50 % kostnatých ryb má karyotyp sestávající ze 48 nebo 50 chromozómů (Galetti et al. 2000, Leggatt & Iwama 2003, Mank & Avise 2006), včetně většiny zástupců Cypriniformes (Arai 2011). Tento poměr je do jisté míry ovlivněný velkým počtem analyzovaných druhů ze skupiny ostnoploutvých ryb (Perciformes), která představuje nejdiverzifikovanější rybí skupinu a kde se u zástupců některých čeledí udržuje značně konzervované  $2n = 48$  (Mank & Avise 2006, Molina 2007, Molina et al. 2014). V rámci Teleostei je diploidní počet  $2n = 48$  považován za původní, přičemž ancestrální karyotyp byl pravděpodobně sestaven výhradně z jednoramenných chromozómů (Ohno 1970, Kohn et al 2006).



**Obr. 2:** Distribuce diploidních počtů chromozómů ( $2n$ ) u dosud studovaných skupin paprskoploutvých ryb. Osa x –  $2n$ ; osa y – počty studovaných druhů. Upraveno podle Molina et al. 2014.



Zatímco některé skupiny ryb jsou značně konzervativní i ve smyslu neměnného poměru jednotlivých chromozómových kategorií jako např. někteří zástupci již zmiňovaných Perciformes (Molina 2007, Motta-Neto et al. 2011a, b, Calado et al. 2014), u jiných skupin je mezidruhově patrná výrazná variabilita v zastoupení jednoramenných a dvouramenných chromozómů - např. u lososovitých (Salmoniformes) (Phillips & Ráb 2001). U řady skupin ryb (typicky u máloostných, Cypriniformes) chromozómy vykazují plynulý přechod mezi jednotlivými chromozómovými kategoriemi z důvodu graduálně se měnící pozice centromery (např. Ráb & Collares-Pereira 1995, Sola & Gornung 2001). Nemalý počet rybích druhů navíc ve svých karyotypech udržuje různé typy polymorfizmů, které mohou zahrnovat např. jedince heterozygotní pro centrické fúze nebo rozpady, což je typické například pro některé lososovité (Salmonidae; Thorgaard 1976, Phillips & Kapucinski 1987, Phillips & Ráb 2001) a hlaváčovité (Gobiidae; Ene et al. 2003) nebo pro některé halančíky (Notobranchiidae; Völker et al. 2008). Někdy se taková variabilita odhalí až po analýze velkého souboru jedinců – objeví se tzv. kryptické karyotypy (např. Oliveira et al. 2009). V určitých případech takové objevy mohou být známkou právě probíhajícího procesu speciace. Např. u halančíka druhu *Chromaphyosemion bivittatum* byl pozorován malý stupeň haplotypové a morfologické diverzity, zatímco karyotypová variabilita na úrovni vnitropopulační a mezi populacemi je značná, což indikuje rychlou chromozómovou evoluci (Völker et al. 2007, 2008). Více než dvě karyotypové formy (tzv. karyomorfy) byly popsány např. u trahirů druhů *Hoplias malabaricus* (Bertollo et al. 2000) a *Erythrinus erythrinus* (Bertollo et al. 2004) (Erythrinidae), mezipopulační rozdíly byly zaznamenány u hadohlavcovitých (Channidae) (Tanomtong et al. 2014). V případě *H. malabaricus* bylo však zjištěno, že se jedná o komplex několika kryptických druhů, s dobře definovanými rozdíly mezi populacemi a absencí hybridních jedinců z oblastí, kde se nositelé různých karyomorf vyskytují sympatricky (Bertollo et al. 2000, 2007, Cioffi et al. 2012b). Tento druh a pravděpodobně i *E. erythrinus* budou jistě potřebovat taxonomickou revizi. *H. malabaricus* patří společně např. s tilápií nilskou *Oreochromis niloticus* (Martins et al. 2004), tetrou drsnoploutvou *Astyanax scabripinnis* (Piscor et al. 2015), pstruhem duhovým *Oncorhynchus mykiss* (Phillips et al. 2001, Porto-Foresti et al. 2007), lososem obecným *Salmo salar* (Abuín et al. 1996, Phillips et al. 2001), kaprem obecným *Cyprinus carpio* a karasem stříbřitým *Carassius carassius* (Ráb et al. 2007, Knytl et al. 2013b) k cytogeneticky nejprozkoumanějším rybím druhům současnosti. Na úrovni větších taxonomických celků pak můžeme zařadit mezi cytogeneticky nejvíce prostudované skupiny ryby lososovité (Salmonidae) (Phillips & Ráb 2001), kaprovité (Cyprinidae) (Arai 2011), štikotvárné

(Esociformes) (Ráb 2004), cichlidy (Cichlidae) (Poletto et al. 2010a), jesetery (Acipenseriformes) (Fontana 2001, 2007, 2016) a ostnoploutvé ryby (Perciformes) jednak z Neotropické oblasti (Molina 2007, Artoni et al. 2015) a dále pak z oblastí za Antarktickou konvergencí oceánského výměníku (Notothenioidei) (Pisano & Ozouf-Costaz 2000, Pisano & Ghigliotti 2009).

Jednou ze základních charakteristik sledovaných při karyotypové analýze je distribuce (konstitutivního) heterochromatinu. Oblasti na chromozómech vykazující zvýšenou akumulaci heterochromatinu mohou být důležitým zdrojem karyotypové variability a to zejména proto, že v jejich blízkosti často dochází ke dvouvláknovým zlomům vedoucím k následným chromozómovým přestavbám (Raskina et al. 2008). Množství a distribuce heterochromatinu je i u ryb vysoce relevantním cytogenetickým znakem, který vykazuje variabilitu mezi druhy, populacemi stejného druhu (např. Molina et al. 2008) nebo mezi jedinci stejné populace (např. Mantovani et al. 2000, 2005) a tato variabilita hrála v karyotypové diferenciaci některých skupin ryb důležitou roli (Ojima & Ueda 1978, Mayr et al. 1985, Souza et al. 1996, Caputo et al. 1997, Margarido & Galetti 2000, Völker et al. 2008, Baumgärtner et al. 2014). Korelace mezi heterogenitou heterochromatinu a značnými změnami ve struktuře karyotypu byla dokumentována u řady rybích skupin (např. Caputo et al. 1997, Cioffi et al. 2009b, 2010b, Blanco et al. 2010a, 2011). Byly popsány i vnitropopulační polymorfizmy spočívající v rozdílné velikosti ramének homologických chromozómů po amplifikaci heterochromatinu (např. Völker et al. 2007, Baumgärtner et al. 2014). Naopak výrazně redukovaný obsah heterochromatinu u některých Perciformes bývá dáván do kontextu se stabilitou jejich karyotypů (Molina 2007). Akumulace heterochromatinu zároveň u některých ryb souvisela s evolucí pohlavních chromozómů (Centofante et al. 2002, Rosa et al. 2006, Molina et al. 2008, Cioffi et al. 2010b). Typickou vlastností heterochromatinu je jeho komplexní složení z různých typů tandemových repetitivních a transponovatelných elementů (TEs) (Lippman et al. 2004, Sharma & Raina 2005). Primárně se jedná o vysoce repetitivní sekvence lokalizované většinou v centromerách a telomerách, ale v genomech se zvýšeným obsahem heterochromatinu se bloky heterochromatinu nacházejí i jinde, jak bylo ukázáno např. u některých Neotropických ryb (Margarido & Galetti 2000).

V genomech celé řady druhů kostnatých ryb byl konstitutivní heterochromatin charakterizován jak na úrovni chromozómové distribuce, tak na úrovni sekvence DNA (zejména u vysoce repetitivních sekvencí) (Uno et al. 2013 a citace zde uvedené). Tyto informace pomohly v některých případech ověřit fylogenetické vztahy u blízce příbuzných

druhů. Konstitutivní heterochromatin je u ryb studován pomocí C-pruhování a za pomoci barvení AT- a GC-specifickými fluorochromy (Mayr et al. 1985, Sumner 1990). Oblasti barvitelné bázově-specifickými fluorochromy však nemusejí nutně odpovídat pouze úsekům konstitutivního heterochromatinu. GC- specifické fluorochromy u ryb až na výjimky (u jeseterů; Fontana et al. 1998b) vizualizují (často výhradně) oblasti nukleolárních organizátorů (NOR; nucleolar organizer region) (Schmid & Guttenbach 1988, Ráb et al. 1999, Galetti 2001). Mohou však vizualizovat i oblasti 5S rDNA (Deiana et al. 2000, Affonso & Galetti 2005, Morescalchi et al. 2007, Lima-Filho et al. 2014b). Existují i pozoruhodné případy vnitrodruhové variability ve velikosti a pozicích GC-bohatých úseků, jako např. u sivena amerického *Salvelinus fontinalis* (Śliwińska-Jewsiewicka et al. 2015 a citace zde uvedené).

Karyotypovou analýzu ryb někdy komplikuje výskyt mikrochromozómů a B chromozómů. Mikrochromozómy jsou na první pohled velmi drobné elementy, často genově a GC-bohaté, vykazující vyšší četnost rekombinace (zejména u ptáků; Burt 2002, Axelsson et al. 2005). Velikostní hranice vymezující mikrochromozómy od ostatních chromozómů v karyotypu není přesně stanovená (resp. různé definice se často rozcházejí), ale většinou se takto označují elementy menší než 20 Mbp (např. Rodionov 1996). Mikrochromozómy lze nalézt například u jeseterů (Acipenseridae) (Fontana 1994, 2001, Fontana et al. 2007) nebo některých cichlid (Cichlidae) (Poletto et al. 2010a) a svojí velikostí se k nim často blíží i elementy z druhé zmiňované kategorie – B chromozómy. Ty byly dosud popsány u zhruba 60 druhů ryb, často zástupců trnobříchých (Characiformes) a sumcovitých (Siluriformes) (Carvalho et al. 2008, Martins et al. 2014, Barbosa et al. 2015), ale i u cichlid (Cichlidae) (Poletto et al. 2010a, b, Fantinatti et al. 2011), kaprovitých (Cyprinidae) (Ziegler et al. 2003) a lososovitých (Salmonidae; zejména u rodu *Coregonus*; Jankun et al. 1991, 1995, Phillips & Ráb 2001). Narozdíl o mikrochromozómů bývají B chromozómy v populaci početně variabilní a obvykle jsou tvořeny vysoce a středně repetitivní DNA (např. rDNA, satelitní DNA – satDNA; transponovatelné elementy – TEs, aj.) (Camacho 2005). Masivní akumulace repetitivních sekvencí může z B chromozómu v některých případech učinit dokonce naopak největší chromozóm v karyotypu (u ryb např.: Ziegler et al. 2003, Poletto et al. 2010b). Poslední dobou se ukazuje, že B chromozómy mohou obsahovat i celou řadu aktivně přepisovaných genů kódujících proteiny nebo rRNA (Makunin et al. 2014) včetně případů u ryb (Yoshida et al. 2011, Pansonato-Alves et al. 2014 a citace v něm uvedené).

Z hlediska mechanismu určení pohlaví jsou ryby velice atraktivní skupinou pro výzkum, protože disponují značnou diverzitou od hermafroditizmu po gonochorismus a od

environmentální determinace pohlaví po genetickou (na úrovni genové či chromozómové) (Devlin & Nagahama 2002, Schartl 2004, Volff et al. 2007, Kobayashi et al. 2013). Některé skupiny se navíc rozmnožují speciálními způsoby asexuální reprodukce (přehled viz Avise 2008; viz dále). Na rozdíl od teplokrevných živočichů jsou u ryb determinace a diferenciací pohlaví dva různé procesy: přestože je pohlaví u většiny ryb určeno geneticky, proces pohlavní diferenciací může být ještě ovlivněn vnějšími faktory jako je teplota a pH vody anebo hormonální stimulace. Proto lze pomocí specifických manipulací dodatečně pohlaví u ryb změnit (tzv. „sex reversal“) (přehledy viz Devlin & Nagahama 2002, Pifferer et al. 2009).

Z hlediska chromozómového určení pohlaví bylo u ryb popsáno celkem osm různých systémů pohlavních chromozómů od těch základních (XX/XY, XX/X0, ZZ/ZW, ZZ/Z0) až po různé složitější systémy neopohlavní (např. XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>, X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y, ZZ/ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub>, Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>/Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>W) (Devlin & Nagahama 2002). Morfologicky diferencované pohlavní chromozómy byly nalezeny zatím u zhruba 10% analyzovaných druhů (Devlin & Nagahama 2002). Extrémní případ chromozómového určení pohlaví u ryb byl popsán u čtverzubce *Takifugu rubripes*, kde jediná substituce (tj. bodová mutace) v genu determinujícím pohlaví odlišuje chromozómy X a Y (Kamiya et al. 2012). Ukazuje se, že systém a/nebo stádium diferenciací pohlavních chromozómů se mohou u ryb výrazně lišit na úrovni blízké příbuzných druhů (de Oliveira et al. 2008, Henning et al. 2008), různých populací toho samého druhu – např. u pstruha *Onkorhynchus mykiss* (Salmonidae) (Colihueque et al. 2001) a platy *Xiphophorus maculatus* (Kallman 1984) či na úrovni různých karyomorf v rámci druhového komplexu – např. u trahira *H. malabaricus* (Bertollo et al. 2000, Cioffi et al. 2012b). U některých skupin (např. Salmonidae, Cichlidae) bylo zjištěno, že stejné systémy pohlavních chromozómů nejsou stejného původu a že zde tudíž došlo ke konvergentní evoluci (Phillips et al. 2001, Woram et al. 2003, Mank & Avise 2009). Tato pozorování poukazují na opravdu značnou variabilitu, která často nikterak nesouvisí s fylogenetickými vztahy v dané skupině a naznačuje, že u příbuzných druhů nezdědkakdy docházelo k přechodům mezi různými pohlavně-determinačními systémy v průběhu evoluce (Mank et al. 2006, Mank & Avise 2009). Tyto změny mohly zároveň souviset se speciálními událostmi a přispět tak ke značné rybí biodiverzitě (Volff 2005). Datování vzniku pohlavních chromozómů u ryb je vzácné, nicméně dosavadní údaje ukazují, že kromě skutečně evolučně mladých systémů pohlavních chromozómů (např. 0,6 MYA, tj. „million years ago“ neboli milióny let v čase nazpět u rodu *Eigenmannia* z čeledi bezostných Clupeiformes; Henning et al. 2011) mohou být některé další i relativně staré – např. u jazyka druhu *Cynoglossus*

*semilaevis* (Chen et al. 2014), kde je stáří pohlavních chromozómů datováno na 30 MYA, nebo u některých kostnatých ryb, např. teter rodu *Triplotheus* (15-25 MYA; Yano et al., in rev.), medaky *Oryzias latipes* (10 MYA; Kondo et al. 2004) a koljušky tříostné *Gasterosteus aculeatus* (10 MYA; Peichel et al. 2004). Z výše uvedených charakteristik vyplývá, že ryby jsou velice zajímavým modelem pro studium evoluce pohlavních chromozómů (Devlin a Nagahama 2002, Volf 2005).

Evoluce základních i odvozenějších (neopohlavních) systémů pohlavních chromozómů u ryb zahrnuje na cytogenetické úrovni zejména chromozómové přestavby a akumulaci heterochromatinu (např. Almeida-Toledo et al. 2000, Vicente et al. 2003, Oliveira et al. 2009, Ross et al. 2009, Cioffi et al. 2010b, 2012a, b, c). Dosud popsané pohlavní chromozómy ryb se vyznačují různou mírou heterochromatinizace a obsahem nejrůznějších repetitivních sekvencí (např. Cioffi et al. 2010b, 2011a, c, Terencio et al. 2012, Yano et al. 2014, Schmid et al. 2016). Dokonce i v rámci rodu může nepárový pohlavní chromozóm (alozóm) vykazovat různou míru degenerace asociovanou s odlišným složením a mírou akumulace repetitivních sekvencí (Yano et al. in rev.). V některých případech byly rybí gonozómy v časném stádiu evoluce odhaleny právě na základě přítomnosti konkrétních repetitivních sekvencí (Haaf & Schmid 1994, Cioffi & Bertollo 2010).

### **3.2. Specifika studia karyotypové diferenciacce ryb**

Klasické cytogenetické studie poskytly v období před nástupem metod moderní molekulární biologie první informace o organizaci genomů u různých skupin organismů. Kromě konvenčního barvení Giemsou byly používány různé pruhovací techniky a rovněž metoda detekce NOR pomocí dusičnanu stříbrného (Sumner 1990, 2003, Ferguson-Smith 2015). Avšak vzhledem k tomu, že všechny původní cytogenetické metody byly vyvíjeny primárně za účelem analýzy lidských chromozómů, bylo nutné je následně optimalizovat pro ostatní studované organismy a o to tím intenzivněji, čím více se daný taxon evolučně vzdaluje člověku. To platí dvojnásobně u ryb, u nichž ohromná diverzita mnohdy nedovoluje použít s úspěchem jeden obecný standardizovaný protokol. Úskalí představuje u ryb mimo jiné také velmi malá velikost jejich chromozómů, pohybující se často v rozmezí 2-5  $\mu\text{m}$  (Jankun et al. 2004). Ani po optimalizaci ovšem některé metody neposkytly u konkrétních skupin nemodelových organismů reprodukovatelné výsledky a v případě ryb (a dalších studenokrevných obratlovců) představuje obvyklou komplikací nemožnost aplikace klasických technik G-, Q- a R-pruhování (Schmid & Guttenbach 1988, Sumner 1990), tedy až na pár, v současnosti oprávněně zpochybňovaných (Majtanová et al. 2016b), výjimek

(např. Baxhall 1983, Gold et al 1990, Yu et al. 1994, Amaro et al. 1996, Medrano et al. 1988). V pozadí těchto odlišných vlastností v barvení chromatinu stojí skutečnost, že genomy vyšších obratlovců jsou členěny do přibližně 300 kbp dlouhých AT- nebo GC-bohatých úseků zvaných izochory (Bernardi 1993, Fortes et al. 2007), které způsobují, že se na savčích a ptačích chromozómech vytváří charakteristický vzor pruhů. Genomy ryb a většiny obojživelníků a plazů tuto charakteristiku postrádají (Medrano et al. 1988, Schmid a Guttenbach 1988, Bernardi & Bernardi 1990, Schmid et al. 1990, Sumner 1990). Z toho důvodu se cytogenetický výzkum u nižších obratlovců zaměřil kromě určení 2n a celkového počtu chromozómových ramén (Nombre Fundamental, NF) (Matthey 1945) po obarvení Giemsou zejména na analýzu heterochromatinu a později, s nástupem metody FISH, na charakterizaci asociovaných repetitivních sekvencí a studium jejich dynamiky a evoluční role (Cioffi & Bertollo 2012). Z metodologického hlediska využívaly rané cytogenetické studie u ryb techniky pro analýzu konstitutivního heterochromatinu, tedy C-pruhování (Sumner 1972) a fluorescenční pruhování (za použití básově-specifických fluorochromů) (Mayr et al. 1985), dále pak stanovení tzv. fenotypu NOR (tj. počtu a pozice NOR; Amemiya & Gold 1988) pomocí dusičnanu stříbrného (Howell & Black 1980) a v některých spíše výjimečných případech bylo použito replikační pruhování (např. Jankun et al. 1998, Jankun 2000). Při postupné aplikaci výše uvedených metod na tentýž chromozómový preparát (s výjimkou replikačního pruhování) je možné získat soubor vzorů, jejichž kombinací se snažíme kompenzovat informační hodnotu, kterou u vyšších obratlovců zprostředkovávají G-, Q- a R- pruhy. Tento přístup se označuje jako tzv. sekvenční barvení (přehled viz Rábová et al. 2015) a je založen na rozdílných mechanismech působení jednotlivých dílčích metod, kdy každá z nich ovlivňuje (a ve výsledku destruuje) jinou část chromatinu. Soubor vzorů získaný kombinací metod sekvenčního barvení nám může poskytnout významné vodítko při konstrukci karyotypů a při jejich vzájemném srovnávání. Obdobnými postupy byla u ryb odhalena celá řada chromozómových přestaveb, strukturních a numerických polymorfizmů, systémy pohlavních chromozómů a variabilita související s geografickou distribucí (např. Völker et al. 2007, Molina 2007). Na druhou stranu, některé skupiny ryb mají značně konzervativní karyotypy, vzor C-pruhů i fenotyp NOR (Molina 2007, Motta-Neto et al. 2011a, b), a tudíž nejsou v těchto případech uvedené postupy příliš informativní.

Základní metodou molekulární cytogenetiky je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která umožňuje lokalizovat konkrétní sekvence DNA přímo na chromozómech. S nástupem FISH byly možnosti analýzy karyotypu značně rozšířeny jak u ryb (Phillips & Reed 1996, Phillips 2001, Cabral-de-Mello & Martins 2010, Martins et al. 2011), tak i u

dalších nemodelových organizmů (např. Cabrero & Camacho 2008, Raskina et al. 2008, Carvalho et al. 2009, Nguyen et al. 2010, da Silva et al. 2010). Badatelé se zaměřili zpočátku zejména na vizualizaci vysoce a středně repetitivních sekvencí zahrnujících rDNA, histony, telomery, centromery, TEs a satDNA (Martins et al. 2011). Přestože se většinou jednalo o studium menšího souboru jedinců dané skupiny, vyskytly se i práce většího rozsahu, na populační úrovni (Veltsos et al. 2009).

Cytogenetické mapování repetitivních sekvencí metodou FISH ukázalo značný potenciál při analýze karyotypové diferenciaci ryb (Vicari et al. 2010, Cioffi & Bertollo 2012). Tyto klasické molekulárně-cytogenetické markery umožňují dodnes detailnější mezidruhové srovnávací studie, a to díky detekci homeologických chromozómů. Nejvyužívanější je mapování genů pro ribozomální RNA, protože jejich sekvenční konzervativita značně usnadňuje mezidruhovou aplikaci (viz dále). V podobném smyslu lze využít i tandemově uspořádaných repetitivních genů pro histony a klastrů TEs, ale tyto sekvence DNA bývají méně konzervativní, a proto je obvykle vhodné při přípravě odpovídajících sond pomocí PCR využívat degenerované primery a následně navrhnout primery specifitější (Martins et al. 2011).

Pro izolaci a analýzu zcela nových, dosud nepopsaných repetitivních sekvencí (často specifických jen pro daný druh nebo skupinu příbuzných druhů – např. satDNA a TEs) byla (nejen) u ryb aplikována metoda restričního štěpení. Při vhodném výběru restriční endonukleázy (tedy enzymu, který rozeznává jen určitou specifickou zrcadlově-symetrickou sekvenci v rámci genomu a štěpí ji) lze totiž získat fragmenty obsahující konkrétní repetitivní sekvenci a použít je jako sondu pro FISH. Nevýhodou je časová náročnost zahrnující nutnost testování různých restričních endonukleáz, klonování a sekvenování celé řady fragmentů, dokud není nalezena vhodná kandidátní repetitivní sekvence (Cabral-de-Mello & Martins 2010, Vicari et al. 2010, Martins et al. 2011). U ryb se tato strategie osvědčila při zkoumání původu B chromozómů, struktury centromer a evoluce pohlavních chromozómů (Phillips 2001, Caputo et al. 2009, Mazzuchelli & Martins 2009, Vicari et al. 2010). Alternativní strategií pro analýzu dosud neznámých repetitivních sekvencí je použití  $C_{0t-1}$  DNA jako sondy pro FISH. Jedná se o vysoce repetitivní frakci genomu, jejíž izolace z celkové genomové DNA je založena na rychlejší reasociační kinetice oproti zbytku sekvencí v genomu (Britten & Kohne 1968, Zwick et al. 1997). Obvykle se  $C_{0t-1}$  DNA používá jako kompetitivní DNA v různých hybridizačních experimentech (Trifonov et al. 2009), ale lze ji využít i jako sondu pro FISH, která nepřímo reprezentuje zejména satDNA. U ryb byla tato strategie využita např. u některých ostnoploutvých (Perciformes) (Ferreira

& Martins 2008, Fantinatti et al. 2011, Costa et al. 2015, Cioffi et al. 2015). V určitých případech byla použita k mapování na chromozómy i jiná (pozdější) frakce  $C_{ot}$  DNA obsahující širší škálu repetitivních sekvencí, např. u jeseterů (Romanenko et al. 2015). Vedle mapování distribuce repetitivních sekvencí se již u ryb začínají (pomocí imunodetekce) mapovat i konkrétní epigenetické modifikace, které s výskytem repetitivních sekvencí a heterochromatinu souvisí – např. 5-metylcytosin (Almeida-Toledo et al. 1998, Schmid et al. 2016).

S postupem času, přestože základní princip metody FISH zůstal zachován, pokroky v mikroskopii, bioinformatice a molekulární biologii umožnily nové konstrukce experimentů. Z toho důvodu se v posledních letech již i v rámci rybí cytogenetiky objevují práce zaměřené na lokalizaci unikátních sekvencí (zejména genů přítomných pouze v jedné kopii na haploidní genom) nebo sekvencí na pohlavních chromozómech pomocí BAC klonů (bacterial artificial chromosome) (Li et al. 2011, García-Cegarra et al. 2013, Ghigliotti et al. 2013, Nanda et al. 2014, Taboada et al. 2014, Zhao et al. 2014) a na analýzu pohlavních chromozómů či mezidruhové homologie pomocí malovacích celochromozómových sond (WCP, whole chromosome painting) (Phillips et al. 2001, Diniz et al. 2008, Henning et al. 2008, 2011, Ráb et al. 2008, Wang et al. 2009, Nagamachi et al. 2010, 2013, Cioffi et al. 2011d, e, 2013, Machado et al. 2011, Schemberger et al. 2011, Terencio et al. 2012, Pazian et al. 2013, Blanco et al. 2014, Cocca et al. 2015). Nicméně, v případě malovacích sond je u velké řady rybích druhů téměř nemožné vybrat vhodný, tj. morfologicky jednoznačně odlišitelný chromozóm, z důvodu často jen pozvolna klesající velikosti chromozómů v daném karyotypu a jejich malé velikosti (Laudicina & Mühlmann 2015). Proto až na výjimky (Henning et al. 2008, Ráb et al. 2008) se většina studií využívajících WCP u ryb soustředila na analýzu pohlavních nebo B chromozómů. Ve snaze usnadnit výběr vhodného chromozómu pro WCP u ryb někteří autoři doporučují C-pruhování (Vicari et al. 2010) a jiní již s úspěchem použili fluorescenční barvení (Cioffi et al. 2011d). U paúhořovce druhu *Gymnotus carapo* byla dokonce pomocí sortování chromozómů připravena téměř kompletní kolekce chromozómů pro malovací sondy (Nagamachi et al. 2010).

Další modifikací FISH, která zejména v posledních několika letech našla uplatnění v rybí molekulární cytogenetice, je komparativní genomová hybridizace (CGH) či genomová *in situ* hybridizace (GISH) využívající jako sondu celogenomovou DNA. Tento přístup byl zatím u ryb využit zejména pro analýzu genomového složení u mezidruhových hybridů (Zhu & Gui 2007, Valente et al. 2009, Rampin et al. 2012, Knytl et al. 2013a, Pereira et al. 2013, 2014, Yano et al., in rev., Majtánová et al. 2016a).



V poslední době se navíc začíná u ryb zavádět i metoda fibre-FISH, která umožňuje natažení chromozómů ještě před hybridizací a je tedy vhodná pro detailnější mapování (s rozlišovací schopností 1-500 kbp), zejména v případě analýzy sousedících nebo překrývajících se (ko-lokalizujících) mapovaných oblastí (Speicher & Carter 2005, de Barros et al. 2011, Ozouf-Costaz et al. 2015).

V rámci této dizertační práce byly kromě analýzy repetitivních sekvencí metodou FISH použity i výše zmíněné techniky GISH a CGH, o kterých bude podrobněji pojednáno v samostatné kapitole.

### **3.3. Analýza repetitivních sekvencí v genomech ryb**

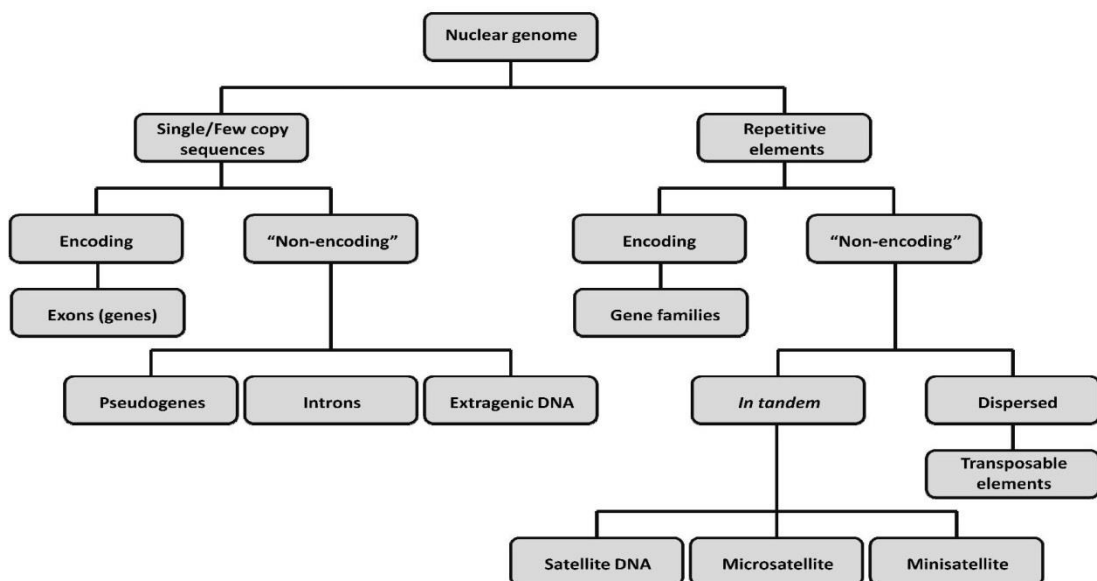
Eukaryotické genomy obsahují celou škálu sekvencí DNA, které se v daném genomu vyskytují ve větším počtu kopií. Tyto tzv. repetitivní sekvence vykazují značnou evoluční dynamiku a variabilitu a v mnoha případech zaujímají významnou část genomu (Charlesworth et al. 1994, Jurka et al. 2005, Biémont & Vieira 2006) – konkrétně např. až 95 % genomu cibule nebo 50 % genomu lidského (přehledy viz Martins 2007, Cabral-de-Mello & Martins 2010, Cioffi & Bertollo 2012, López-Flores & Garrido-Ramos 2012). Vysoký obsah repetitivní DNA (60 %) byl zjištěn rovněž u latimérie podivné *Latimeria chalumnae* (Amemiya et al. 2013). Obecně se jedná o oblasti genomu, kde dochází ve zvýšené míře k nukleotidovým substitucím a dalším změnám na úrovni sekvence DNA, které podporují dynamiku této frakce genomu (Wichman et al. 1991, Henikoff et al. 2001, Cioffi & Bertollo 2012). Opakovaně byla mj. zjištěna korelace mezi akumulací bloků repetitivní DNA a chromozómovými přestavbami (Raskina et al. 2008). Přestože se repetitivní sekvence obvykle shlukují v oblastech genomu s malou četností rekombinace – tedy převážně do centromerického a telomerického heterochromatinu (jak ukazují i studie na rybách; Sola & Gornung 2001, Cabral-de-Mello & Martins 2010), nejsou oproti původním předpokladům omezené pouze na oblasti heterochromatinu (Charlesworth et al. 1994, Kejnovský et al. 2009, Supiwong et al. 2014, Costa et al. 2015 a další).

Repetitivní sekvence lze klasifikovat podle různých kritérií. Základní třídění je založeno na množství dané repetice v genomu (vysoce a středně repetitivní sekvence) a dále na jejím uspořádání – jednotlivé kopie mohou být buď uspořádané v tandemu (za sebou), anebo rozptýlené po genomu (Obr. 3) (Sumner 2003, Cioffi & Bertollo 2012). Tandemově bývají uspořádané satelitní sekvence, mini- a mikrosatelity a středně repetitivní geny (patřící mezi multigenové rodiny), zatímco mezi rozptýlené repetice patří zejména TEs (Jurka et al. 2005). Navíc řada genomů prodělala tzv. segmentální duplikace, při kterých jsou

duplikovány fragmenty DNA delší než 1 kbp, které mohou být následně organizované v tandemu nebo přemístěny do jiné části genomu (Van de Peer & Meyer 2005, López-Flores & Garrido-Ramos 2012).

Zejména tandemové repetice podléhají značné dynamice podpořené amplifikačními procesy a nerovnoměrným crossing-overem a spolu s TEs přispívají značnou měrou k nestabilitě genomu (Dover 1986, Lönning & Saedler 2002, Eickbush & Eickbush 2007, Raskina et al. 2008). Díky uvedeným procesům jsou tandemové repetice značně polymorfni a mohou být tedy použity jako vhodné markery pro genotypování jedinců a populací (Jeffreys 1985), pro studium evoluce konkrétního taxonu, identifikaci specifických (třeba pohlavních) chromozómů, identifikaci homologie chromozómů a chromozómových přestaveb (přehledy viz Martins 2007, Cabral-de-Mello & Martins 2010, Cioffi & Bertollo 2012, Martins et al. 2011).

Dříve se předpokládalo, že většina repetitivních sekvencí nemá v genomu prakticky žádnou funkci a byly tak považovány za přebytečnou část genomu – tzv. „junk DNA“ nebo „selfish DNA“ (Doolittle & Sapienza 1980, Orgel & Crick 1980). Tento názor se ovšem v posledních letech výrazně změnil, zejména s ohledem na odhalení aktivní transkripce v nekódujících oblastech genomu (ENCODE Project Consortium 2004) a na akumulaci nových dat, které změnily úhel pohledu na úlohu repetitivních sekvencí ve strukturní a funkční organizaci genomu (Biémont & Vieira 2006, Martins 2007, Cioffi & Bertollo 2012).



**Obr. 3:** Organizace eukaryotického genomu a členění repetitivních sekvencí podle Cabral-de-Mello & Martins 2010.

Porozumění dynamice repetitivních sekvencí a jejich roli v architektuře genomů a organizaci chromozómů je vzhledem k jejich procentuálnímu zastoupení v genomu velice důležité. V posledních dvou dekadách byla celá řada typů tandemových nebo rozptýlených repetitivních sekvencí analyzována u ryb, zejména metodou FISH a to se ukázalo být jako velice produktivní (a ekonomicky zároveň relativně nenáročný) přístup při odhalování evolučních sil v pozadí ohromné rybí biodiverzity (Vicari et al. 2008, 2010, Cabral-de-Mello & Martins 2010, Cioffi & Bertollo 2012). Repetitivní sekvence posloužily jako vhodné markery pro cytotaxonomické a evoluční studie a doplnily informace, které nebylo možné získat sekvenováním genomů.

Genomy ryb se navzájem co do obsahu repetitivních sekvencí značně liší, a to jak kvantitativně, tak i kvalitativně. Například u čtverzubce zeleného (*Tetraodon nigroviridis*), který má vůbec nejmenší genom mezi obratlovci (Hinegardner 1968, Gregory 2016), je obsah repetitivních sekvencí velmi malý (Roest Crollius et al. 2000), přičemž TEs a pseudogeny se shlukují výhradně do omezené oblasti – do krátkých heterochromatinizovaných ramének subtelocentrických chromozómů (Dasilva et al. 2002).

### **3.3.1. Satelitní sekvence, minisatelity a mikrosatelity**

Satelitní DNA (satDNA) jsou tandemové repetice o délce základní jednotky v rozmezí 100 – 1000 nt a o vysokém počtu opakování (1000 – 100 000) (Charlesworth et al. 1994, López-Flores & Garrido-Ramos 2012). Jedná se o DNA, která při centrifugaci v hustotním gradientu CsCl tvoří oddělený (satelitní) pík (Beridze 1986, Plohl et al. 2008). SatDNA se vyskytuje jen na několika místech v genomu, zejména v centromerách a telomerách, kde napomáhá správné funkci těchto chromozómových domén (Charlesworth et al. 1994, Shapiro & Sternberg 2005, Grewal & Jia 2007). Z důvodů dynamických procesů spjatých s evolucí tandemových repetice obecně (nerovnoměrný crossing-over, genová konverze a transpozice; Dover 1986) vznikají často druhově-specifické sekvence satDNA – např. 5S-*HindIII*-DNA u trahira *H. malabaricus* (Martins et al. 2006, Ferreira et al. 2007). Naopak některé satDNA mohou být společné pro celou čeleď nebo řád – jako např. *PstI* a *HindIII* satDNA u jeseterů (Landfredi et al. 2001, Robles et al. 2004). U ryb byly satelitní sekvence cytogeneticky studovány většinou nepřímo, ve spojitosti s analýzou distribuce konstitutivního heterochromatinu C-pruhováním. Práci zaměřených na popis konkrétní satelitní sekvence na molekulární úrovni a na její zmapování na chromozómy je méně (přehledy viz Phillips et al. 2001, Martins 2007, Cabral-de-Mello & Martins 2010, Vicari et al. 2010, Martins et al. 2011). Řada studií zaměřila pozornost zejména na identifikaci

satDNA sekvencí souvisejících s pohlavními chromozómy a B chromozómy (Martins 2007), např. As51 u tetry drsnoploutvé *Astyanax scabripinnis* (Mestriner et al. 2000).

Minisatelity zahrnují repetice dlouhé přibližně 10 – 100 bp, o počtu několika desítek až stovek kopií v rámci tandemu (Jeffreys 1985). Ačkoliv byly popsány u řady rybích druhů (Goodier & Davidson 1998), na chromozómy byla mapována pouze hrstka z nich – např. u lososa obecného *Salmo salar* (Pérez et al. 1999), nebo u čtverzubce zeleného *Tetraodon nigroviridis* (Fischer et al. 2004). Druhá z uvedených prací ukazuje asociaci minisatelitů s TEs a naznačuje tak jeden z možných procesů zodpovědných za jejich dynamiku.

Mikrosatelity jsou charakteristické jednotkou dlouhou pod 9 nt, která se nejčastěji opakuje 4-40x (ale i více) a vytváří tandemové bloky ne delší než 1 kbp (Tautz & Renz 1984, Chistiakov et al. 2006). Mikrosatelity se z hlediska dynamiky chovají podobně jako minisatelity; uplatňují se zde procesy ektopické (=nealelické) rekombinace, nerovnoměrného crossing-overu, replikační sklouznutí DNA polymerázy a asociace s TEs (Schlötterer 2000, Ellegren 2004, Scacchetti et al. 2015a a práce zde uvedené). Rozdíl oproti minisatelitům spočívá v rozdílné distribuci na chromozómech a jejich potenciální funkci v genomu (López-Flores & Garrido-Ramos 2012). Kromě toho mikrosatelity jsou daleko více polymorfní, a proto se posléze více uplatnily jako markery využívané ve forenzní, populační a evoluční genetice (přehled viz Ellegren 2004). Jejich distribuce na chromozómech byla zatím studována jen u několika druhů ryb, ale v poslední době počet takto zaměřených prací prudce stoupá (viz dále). Ukazuje se, že mikrosatelity mohou být široce zastoupené v euchromatinu i v heterochromatinu a některé mohou být dále preferenčně lokalizovány např. na B chromozómech (Milani & Cabral-de-Mello 2014) nebo pohlavních chromozómech (Kubát et al. 2008, Pokorná et al. 2011, Kejnovský et al. 2013) a to včetně případů publikovaných u ryb (Nanda et al. 1990, Cioffi et al. 2011a,b, c; Schemberger et al. 2011, Xu et al. 2013, Cioffi et al. 2015, Ziemniczak et al. 2015). Nezřídka se mikrosatelity shlukují v telomerách nebo subtelomerických oblastech – např. u trnobříchých (Characiformes) (Hatanaka et al. 2002, Cioffi et al. 2011b, Scacchetti et al. 2015c).

V této práci sice nebyly žádné konkrétní satDNA ani mini- nebo mikrosatelity cytogeneticky analyzovány, ale přítomnost jejich genomově-specifických variant nepochybně sehrála významnou úlohu při analýzách rybích genomů metodami GISH a CGH.

### 3.3.2. Telomery

Telomery jsou speciální ribonukleoproteinové struktury na koncích chromozómů, složené ze specifických G-bohatých tandemových repetitivních DNA, proteinových komplexů (nazývaných souhrnně „shelterin“) a nekódující telomerické RNA (TERRA) (de Lange 2005, Azzalin et al. 2007, O'Sullivan & Karlseder 2010). Hlavní funkce telomer je chránit konce eukaryotických chromozómů před enzymatickou degradací a před fúzí s jinými chromozómy; zabránit rozpoznání konců chromozómů enzymatickou mašinerií pro opravu dvouvláknových zlomů a zamezit zkracování chromozómů vyplývajícího z mechanismu replikace na opožděném vlákně DNA (Olovnikov 1973, Blackburn & Greider 1995, Bolzán & Bianchi, 2006). U telomerické DNA ryb, stejně jako u ostatních obratlovců, je základní jednotkou opakování hexamer (TTAGGG)<sub>n</sub> (Moyzis et al. 1998, Meyne et al. 1989, 1990). Telomery vykazují značnou délkovou variabilitu mezidruhovou, vnitrodruhovou i v rámci chromozómů jedné buňky (Zijlmans et al. 1997, Canela et al. 2007). U ryb se tato variabilita pohybuje mezi 2-15 kbp (Elmore et al. 2008). Kromě své obvyklé přítomnosti na koncích chromozómů se mohou telomerické repetice vyskytovat i v jiných částech genomu jako tzv. intersticiální telomerické sekvence (ITSs) (přehledy viz Bolzán & Bianchi 2006, Lin & Yan 2008, Ruiz-Herrera et al. 2008). V takových případech mohou být pozůstatkem po nejrůznějších chromozómových přestavbách – často fúzích, méně často inverzích (např. Meyne et al. 1990, Metcalfe et al. 1998, Go et al. 2000, Nanda et al. 2002b, Hartmann a Scherthan 2004, Mota-Velasco et al. 2010, Ocalewicz 2013), ale mohou rovněž být výsledkem procesů transpozice nebo některých mechanismů opravy dvouvláknových zlomů v DNA (Azzalin et al., 2001, Nergadze et al. 2007). V případech zejména evolučně starších chromozómových přestaveb už nemusí být ITSs přítomny, popřípadě nemusí být zahrnuty do přestavby již od počátku (např. u Robertsonových (Rb) translokací myši; Garagna et al. 1995, Nanda et al. 1995), anebo mohou být přítomny v tak malém počtu kopií, že jsou cytogeneticky nedetekovatelné. Byly však popsány i situace, kdy se ITSs naopak zachovaly u evolučně starších přestaveb, zatímco u recentních se nedochovaly (Nanda et al. 2002b). ITSs jsou považovány za oblasti náchylné ke k rekombinacím (Ashley & Ward 1993, Nanda et al. 2002b) a mohou potenciálně vést k následným druhotným centrickým rozpadům a inverzím (Slijepčević 1998, Lin & Yan 2008). ITSs se vyskytují napříč různými taxony včetně obojživelníků, ptáků, hlodavců a savců (Meyne et al. 1990, Schmid et al. 2010) a byly popsány i u celé řady druhů ryb (přehled Ocalewicz 2013). ITSs ryb často asociují s konstitutivním heterochromatinem (např. Meyne et al. 1990, Cioffi et al. 2010a, Scacchetti et al. 2011, Rosa et al. 2012) a mohou v některých případech susedit nebo ko-lokalizovat i

s oblastmi NOR (např. Ocalewicz et al. 2004, Gornung et al. 2004, Pomianowski et al. 2012) nebo 5S rDNA (Rosa et al. 2012). Mohou dokonce pokrývat i celé mikrochromozómy jako např. u některých jeseterů (Fontana et al. 1998a, 2004). Některé studie naznačují, že zejména v případech rozsáhlých ITSs (tzv. heterochromatinové ITSs, het-ITSs) se již nemusí jednat o telomerické sekvence *sensu stricto*, nýbrž o tzv. „telomere-like“ sekvence, které se amplifikují různými mechanismy jako součást satelitní sekvence (Garrido-Ramos et al. 1998, Metcalfe et al. 2004, Ruiz-Herrera et al. 2008). V každém případě FISH se sondami komplementárními k telomerickým sekvencím může poskytnout velice cenné informace o recentních nebo relativně nedávných procesech souvisejících se změnami na chromozómové úrovni (v rámci ryb např. Cioffi et al. 2010a, Cioffi et al. 2011a, c, Ocalewicz 2013, Ocalewicz et al. 2013), a může být dále velice užitečná i v případech, kdy není lehké definovat konce jednotlivých chromozómů – například při analýze meiotických multivalentů pohlavních chromozómů (př. Šíchová et al. 2015).

### 3.3.3. Středně repetitivní geny (multigenové rodiny)

V analýze karyotypů metodou FISH patří mezi nejužívanější takové sondy, které jsou komplementární ke genům tvořící tzv. multigenové rodiny (Cabral-de-Mello & Martins 2010). Obecně se jedná o skupiny genů, které byly odvozené genovou duplikací a mají sekvenční shodu nad 50 % (Martins & Wasco 2004, Nei & Rooney 2005, López-Flores & Garrido-Ramos 2012). Tyto paralogní geny mohou být rozptýlené po genomu (jako například čichové receptory savců) nebo mohou být organizovány v tandemu (globinové geny), přičemž mohou vytvářet i větší bloky středně repetitivních sekvencí (např. rRNA, histony nebo geny pro malé jaderné RNA – snRNA; „small nuclear RNA“) (Nei & Rooney 2005). Důvodem tohoto uspořádání je skutečnost, že v buňce je potřeba velké množství produktů těchto genů. Z hlediska cytogenetického mapování pak poskytují dvě zásadní výhody: 1) jejich repetitivní povaha umožňuje poměrně snadnou vizualizaci pomocí standardní metody FISH (na rozdíl od unikátních sekvencí, jejichž délka je pod limitem rozlišovací schopnosti běžného protokolu) a dále 2) se často jedná o geny, jejichž sekvence je velmi konzervovaná. V rámci ryb bylo nejvíce studií zaměřeno na lokalizaci genů pro ribozomální RNA. Za uplynulých 20 let byly charakterizovány fenotypy rDNA (tedy počet a distribuce obou klastrů rDNA) u zhruba stovky (5S rDNA) až několika set (45S rDNA) rybích druhů z nejrůznějších skupin (přehledy viz Martins & Wasco 2004, Cabral-de-Mello & Martins 2010, Gornung 2013). Kódující oblasti rDNA patří mezi vůbec nejkonzervovanější sekvence napříč organizmy (Hillis & Dixon 1991), takže se příslušné

vyrobené hybridizační sondy dají aplikovat na celou škálu příbuzných a mnohdy i nepříbuzných taxonů (příkladem za všechny budiž použití 28S rDNA sondy z myši na chromozomy kostlína obecného *Lepisosteus osseus*; Ráb et al. 1999). Samotná pozice lokusů konkrétních repetitivních genů může mít značnou informační hodnotu v rámci analýzy blízkce příbuzných druhů nebo jedinců daného druhu z různých subpopulací. Rozdíly v počtu a distribuci lokusů rDNA již posloužily v řadě studií jako tzv. mezidruhový (Amemiya & Gold 1990, Kirtiklis et al. 2010) či mezipopulační (př. Ferreira et al. 2007, Cioffi et al. 2009a, b, Lima-Filho et al. 2012) cytotaxonomický marker, včetně přímého uplatnění v akvakultuře (Porto-Foresti et al. 2007). Rozdíly ve fenotypu rDNA mohou dále pomoci odhalit přítomnost a povahu chromozómových přestaveb (např. Porto-Foresti et al. 2004, Vicari et al. 2010, Bellafronte et al. 2011, Machado et al. 2011). Ne vždy ovšem shodné fenotypy rDNA u dvou blízkce příbuzných druhů znamenají, že sledujeme klastry rDNA skutečně na homeologických chromozómech (Milhomem et al. 2013). I tak nám informace o počtu a pozicích daného klastru repetitivních genů může v některých případech naznačit evoluční vzdálenosti a vztahy v rámci souboru studovaných druhů. Výše zmíněné neplatí zejména v případech, kdy jsou počet a pozice klastrů dané multigenové rodiny příliš konzervativní nebo naopak příliš polymorfní.

Informační hodnota mapování repetitivních genů vzrůstá s počtem testovaných markerů. U ryb se v posledních letech vedle ribozomální RNA začínají ve větší míře využívat sondy komplementární k tandemově uspořádaným genům pro různé histony (Pendás et al. 1994a, Hashimoto et al. 2011, 2013, Lima-Filho et al. 2012, Pansonato-Alves et al. 2013a, b, Silva et al. 2013, 2014, Costa et al. 2014, 2016, Utsunomia et al. 2014a, Daniel et al. 2015) a taktéž pro U1 a U2 snRNA (Merlo et al. 2010, Úbeda-Manzanaro et al. 2010, Cabral-de-Mello et al. 2012, Merlo et al. 2012a, b, Supiwong et al. 2013, Utsunomia et al. 2014b, García-Souto et al. 2015, Scacchetti et al. 2015b, Silva et al. 2015). Drtivá většina prací v rybí cytogenetice popisuje mapování repetitivních genů metodou FISH na mitotické chromozomy, ale najdou se i práce na meiotických bivalentech (např. Cioffi & Bertollo 2010, Sampaio et al. 2014). Z populačního hlediska byly na úrovni zejména rDNA FISH dosud nejvíce zkoumány u trahir *H. malabaricus* (Erythrinidae) (např. Born & Bertollo 2000, Ferreira et al. 2007, Cioffi et al. 2009a, b, Blanco et al. 2010a, b,) a tetra *Astyanax scabripinnis* (Characidae) (přehled viz Piscor et al. 2015).

### 3.3.3.4. Geny pro ribozomální RNA a jejich dosavadní studium u ryb

Všechny aspekty buněčného růstu a vývoje jsou závislé na biogenezi ribozómů a následné syntéze proteinů. Jelikož buňka potřebuje velké množství ribozómů, potřebuje syntetizovat i velké množství ribozomální RNA (rRNA), která je jejich podstatnou součástí (Prokopowich et al. 2003). Navíc se rRNA nedá použít opakovaně pro syntézu výsledného produktu podobně jako mRNA („messenger RNA“). Z těchto důvodů rRNA zaujímá asi 80 % veškeré RNA v buňce (Prokopowich et al. 2003). Efektivní expresi napomáhá repetitivní charakter transkripčních jednotek pro rRNA, které se na chromozómech shlukují do oblastí označovaných jako rDNA (ribozomální DNA). Geny pro ribozomální RNA patří mezi nejlépe prostudované a zmapované oblasti DNA napříč organizmy. Eukaryotické genomy se vyznačují dramatickými rozdíly v počtu kopií transkripčních jednotek rDNA (přibližně od 20 do 20 000) (Long & Dawid 1980, Prokopowich et al. 2003, Weider et al. 2005), přičemž celá řada (především epigenetických) mechanismů dále reguluje, jaké množství z těchto kopií bude skutečně přepisováno do RNA (McStay & Grummt 2008). Odhaduje se, že až 50 % rDNA je obvykle transkripčně inaktivní (Schleisinger et al. 2009).

Geny pro rRNA jsou na chromozómech uspořádány do dvou separátních klastrů, které se v genomech obratlovců (a většiny eukaryot) obvykle nacházejí na odlišných chromozómech (de Lucchini et al. 1993, Suzuki et al. 1996). Hlavní klastr rDNA kóduje geny pro 28S, 5,8S a 18S rRNA, které jsou přepisovány dohromady jako prekurzorová molekula se sedimentačním koeficientem<sup>2</sup> 45S (odtud označení 45S rDNA). Součástí transkripční jednotky jsou ještě dva vnější přepisované mezerníky (ETSs; external transcribed spacers – ETS1 a ETS2) a dva vnitřní přepisované mezerníky (ITSs; internal transcribed spacers – ITS1 a ITS2). Jednotlivé transkripční jednotky rRNA jsou od sebe odděleny mezigenovým mezerníkem (IGS; intergenic spacer), který obsahuje různé regulační oblasti (Long & Dawid 1980, Eickbush & Eickbush 2007) (Obr. 4). Pořadí jednotlivých komponent transkripční jednotky je u eukaryot vysoce konzervované: 5'-ETS1-18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S-ETS2-3' (viz Obr.4).

Oblast na chromozómu, kde se nachází 45S rDNA, je totožná s NOR. Již v telofázi na konci mitózy se okolo přepisovaných rRNA začíná formovat jadérko – nemembránový subkompartment, ve kterém probíhá většina kroků biosyntézy ribozómů (Scheer et al. 1993, Schwarzacher & Wachtler 1993, Gerbi et al. 2003). NOR aktivně přepisované v interfázi zůstávají nadále despiralizované a bývají tak patrné na mitotických chromozómech jako

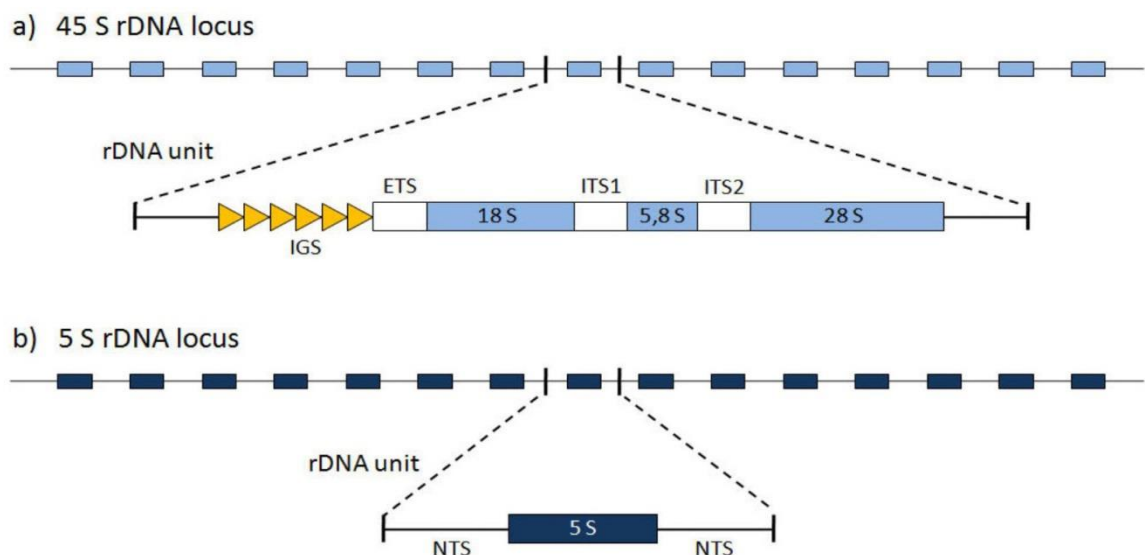
---

<sup>2</sup> Jedná se o koeficient pro ultracentriugaci; hodnota S (neboli Svedberg) je relativní číslo vyjadřující pohyblivost dané částice při centrifugaci.



sekundární konstrikce, protože se slabě barví Giemsovým barvivem (Heliot et al. 1997, Sumner 2003). Současně zde zůstávají asociované některé proteinové komponenty transkripčního aparátu, které lze vizualizovat metodou impregnace stříbrem (Howell & Black 1980). Tato metoda má ovšem tu zásadní nevýhodu, že zobrazí pouze NOR aktivní v předchozí interfázi (Miller et al. 1976) a někdy naopak zobrazí i jiné úseky na chromozómech (např. bloky heterochromatinu nebo kinetochory) (Suja et al. 1990, Dobigny et al. 2003).

Druhý klastr rDNA se exprimuje mimo oblast jádérka a je tvořen pouze tandemovými repeticemi genu pro 5S rRNA (mající u ryb konzervativní délku 120 bp), který se pravidelně střídá s kopiemi nepřepisovaného mezerníku (NTS; non-transcribed spacer) (Long & Dawid 1980). 5S rDNA obvykle vykazuje vyšší počet kopií než ostatní rRNA geny (Martins 2007). Zatímco kódující oblasti všech rRNA genů jsou velmi konzervativní (jsou to jedny z nejkonzervativnějších sekvencí vůbec), mezerníky bývají sekvenčně značně variabilní a lze se na jejich základě mapovat evoluční rozdíly mezi blízkými příbuznými druhy (Hillis & Dixon 1991, Eickbush & Eickbush 2007, Pinhal et al. 2011). U ryb bývá enormně variabilní zejména mezerník v 5S rDNA, a to jak sekvenčně, tak délkově (Martins & Wasco 2004, Pinhal et al. 2011, Campo & García-Vásquez 2012, Merlo et al. 2012b, Rebordinos et al. 2013).



**Obř. 4:** Organizace genů pro ribozomální RNA u eukaryot. **A** tandemové repetice 45S rDNA; výřez znázorňuje uspořádaní genů v transkripční jednotce a asociovaný mezigenový mezerník (IGS); na obrázku není znázorněn druhý vnější přepisovaný mezerník (ETS2) za genem 28S. **B** tandemové repetice 5S rDNA, výřez znázorňuje kódující oblast genu pro 5S rRNA a asociovaný nepřepisovaný mezerník. Upraveno podle Martins et al. 2011.

Jako ancestrální se pro ryby jeví fenotyp rDNA, kdy jeden pár chromozómů v karyotypu nese 45S rDNA a jiný chromozómový pár nese 5S rDNA (Martins & Galetti 2001, Sola et al. 2003, Gornung 2013). V případě 45S rDNA byl tento trend pozorován u 72 % dosud analyzovaných ryb (Gornung 2013). Evoluční dynamika klastrů rDNA ale může být i poměrně značná. Zatímco u některých skupin ryb je počet obou klastrů rDNA druhově specifický a dá se tudíž použít jako cytotaxonomický marker (Amemiya & Gold 1988, Martins & Galetti 1999, Almeida-Toledo et al. 2002, Martins et al. 2006), u jiných ryb byl pozorován značný polymorfismus v počtu lokusů, a to nejen mezi jedinci stejného druhu, ale i intra-individuálně (Castro et al. 2001, Jankun et al. 2001, Rábová et al. 2001, Jorge & Moreira-Filho 2004, Boroń et al. 2006, Gromicho & Collares-Pereira 2007, Cioffi et al. 2010a, 2015, Martins et al. 2013, Lima-Filho et al. 2014b, Pereira et al. 2014, Traldi et al. 2015). To platí zejména pro taxony, kde byly popsány abnormální fenotypy rDNA, zahrnující mnohdy až extrémně vysoké počty lokusů pro jeden či druhý klastř rDNA. Takové práce jsou známé u ryb ze skupin Perciformes (Affonso & Galetti 2005, Poletto et al. 2010b), Gymnotiformes (Scacchetti et al. 2011, 2012), Characiformes (Lima-Filho et al. 2014b), Cypriniformes (Singh et al. 2009), Salmoniformes (Pendás et al. 1993a, Fujiwara et al. 1998, Castro et al. 2001, Jankun et al. 2001) a Siluriformes (Maneechot et al. 2016). Podobné případy byly zaznamenány také u jiných obratlovců (Cazaux et al. 2011, Britton-Davidian et al. 2012), bezobratlých (Hirai et al. 1996, Veltsos et al. 2009) a rovněž u rostlin (Pedrosa-Harand et al. 2006). U tulipánu *Tulipa fosteriana* bylo odhaleno pomocí FISH rekordních 71 signálů 5S rDNA, některé z nich ale prokazatelně odpovídaly nekompletním nefunkčním kopiím těchto genů (Mizouchi et al. 2007). U ryb byl rekordní počet 54 lokusů 5S rDNA zaznamenán u keříčkovce *Clarias batrachus* (Maneechot et al. 2016). Další vysoké počty byly popsány např. u skaláry *Pterophyllum leopoldi* (42 lokusů 18S rDNA; Schneider et al. 2013a), trahira *E. erythrinus* (více než 20 lokusů 5S rDNA; Cioffi et al. 2010a) a některých cichlid (14-15 lokusů 5S rDNA; Poletto et al. 2010b, Nakajima et al. 2012). Variabilitu fenotypů rDNA dále podporuje u ryb obzvláště častý polymorfismus délky klastru 45S rDNA, který je mezi homology chromozómů často způsobem nerovnoměrným crossing-overem a odlišnou spiralizací (Collares-Pereira & Ráb 1999). Dále bývá popisován polymorfismus ve smyslu přítomnosti/absence rDNA lokusu v rámci homologických chromozómů (např. Castro et al. 2001, Boroń et al. 2006). V některých případech lze u ryb na druhové úrovni (nikoliv v rámci celých skupin) pozorovat rovněž syntenii obou typů klastrů rDNA a nebo jejich přímou ko-lokalizaci v daném lokusu (Pendás et al. 1994b, Drouin & de Sá 1995, Morán et al. 1996, Fujiwara et al. 1998, Almeida-Toledo et al. 2002,

Fontana et al. 2003, Hatanaka & Galetti 2004, Diniz et al. 2008, Kirtiklis et al. 2010, Hett et al. 2011, Rossi et al. 2012, Marquioni et al. 2013, Supiwong et al. 2014), potažmo jejich asociaci s jinými repetitivními geny (Drouin & de Sá 1995, Hashimoto et al. 2011, 2013, Lima-Filho et al. 2012, Pansonato-Alves et al. 2013a, b, Silva et al. 2013, 2015). Předpokládá se, že daná uspořádání vznikají spíše jako vedlejší efekt dynamických procesů v genomu, zejména v případě polyploidů (Ma & Gustafson 2005) mezidruhových hybridů (např. Pereira et al. 2014).

Z hlediska distribuce na chromozómech je u ryb patrný rozdíl mezi oběma klastry rDNA. 45S rDNA se většinou vyskytuje v telomerických nebo subtelomerických částech chromozómů (Gornung 2013) a řada prací naznačuje, že to by mohl být důvod disperze této rDNA u některých druhů ryb, jelikož v koncových částech chromozómů častěji dochází k nehomologní rekombinaci a translokacím (Mantovani et al. 2005). 5S rDNA se naopak převážně nachází v intersticiálních nebo přímo pericentromerických oblastech (Martins & Galetti 2001, Cioffi & Bertollo 2012), což tomuto klastru podle některých autorů poskytuje určitou evoluční stabilitu (Martins & Galetti 2001), např. z důvodu větší ochrany před transpozicií aktivitou (Noletto et al. 2007, Sczepanski et al. 2007). Nicméně, jak je patrné z předchozích odstavců, i tento klastr rDNA může u ryb vykazovat značnou variabilitu v počtu lokusů. Za zmínku stojí, že někdy se rDNA u ryb nachází na pohlavních chromozómech a to jak na tom párovém (X, Z; Morán et al. 1996, Born & Bertollo 2000, Phillips et al. 2004) tak na alozómu (Y, W; Artoni & Bertollo 2002, Diniz et al. 2008, Ghigliotti et al. 2013, Lima-Filho et al. 2014a, Scacchetti et al. 2015a, b, Yano et al., in rev.), případně na obou (Parise-Maltempo et al. 2007, Machado et al. 2011, Pucci et al. 2014, Scacchetti et al. 2015a, b).

Z výše uvedeného vyplývá, že výskyty neobvyklých fenotypů rDNA se nezdají být tak vzácné, jak se původně předpokládalo a s přibývajícím počtem studií se postupně mění názor na charakter rDNA jako na stabilní cytogenetický marker. Čím dál tím více je naopak patrné, že se jedná o značně dynamickou frakci genomu. Jak již bylo zmíněno výše, geny kódující rRNA jsou z hlediska sekvence jedny z nejkonzervovanějších oblastí eukaryotického genomu, které procházejí minimálními změnami v průběhu stovky miliónů let. Tento stav ale může paradoxně přispívat k nestabilitě genomu, protože sekvenční stabilita genů pro rRNA spolu s jejich repetitivním charakterem zároveň zvyšují riziko heterologních synapsí v meióze, které mohou vést k nerovnoměrným crossing-overům mezi nehomologickými chromozómy, tj. k ektopickým (nealelickým) rekombinacím (Raskina et al. 2004, 2008, Rebordinos et al. 2013). Popsaný mechanismus je ale zároveň součástí

procesů přispívajících k udržování sekvenční homogenity kopií rDNA. Dynamika genových klastrů bývá popisována pomocí konceptů „concerted evolution“ a „birth-and-death evolution“ (termíny nemají české ekvivalenty), popřípadě pomocí přechodných modelů (Eickbush & Eickbush 2007, Nei & Rooney 2005, Pinhal et al. 2011). „Concerted evolution“ popisuje evoluci konkrétního klastru genů jako proces, který pomocí mechanismů nerovnoměrného crossing-overu a genové konverze udržuje uniformitu sekvence dané multigenové rodiny v konkrétním genomu (resp. dochází k homogenizaci dané sekvence na všech přítomných lokusech). Tento koncept platí pro tandemové repetice obecně. Zatímco pro vysvětlení dynamiky 45S rDNA je concerted evolution dostačující, u 5S rDNA je situace komplikovanější a daný model musí být doplněn o koncept výše zmíněné „birth-and-death evolution“, který popisuje vznik a fixaci nových sekvenčních variant 5S rDNA pomocí duplikací (Nei & Rooney 2005, Pinhal et al. 2011, Vierna et al. 2013). Z hlediska různých variant totiž u 5S rDNA (a to zejména u ryb) často nacházíme v genomech různé varianty lišící se obvykle sekvencí a délkou NTS (Pendás et al. 1994b, Morán et al. 1996, Martins & Galetti 2001, Martins & Wasco 2004, Eickbush & Eickbush 2007, Pinhal et al. 2011, Rebordinos et al. 2013) a tyto varianty často zahrnují i pseudogeny (Martins & Wasco 2004). Nezřídka bývá přítomna jedna dominantní varianta 5S rDNA doplněná o minoritní lokusy s odlišnou sekvencí (Messias et al. 2003). Zdá se tedy, že homogenizace procesem concerted evolution probíhá jen u některých klastrů 5S rDNA, zatímco zbylé varianty se vyvíjejí nezávisle a postupně se délkově i sekvenčně odlišují (Martins 2007).

V posledních letech je ovšem stále více zřejmé, že dynamice zejména lokusů rDNA napomáhá ještě další faktor. Řada studií ukázala, že změny ve fenotypech rDNA není možné vždy zcela vysvětlit jen klasickými chromozómovými představami (Dubcovsky & Dvořák 1995, Raskina et al. 2004, 2008, Datson & Murray 2006) a navíc bylo zdokumentováno, že určitá množina mobilních genetických elementů, tedy TEs, preferenčně inseruje svoje kopie do lokusů rDNA (Jakubczak et al. 1991, Kalendar et al. 2008, Zhang et al. 2008). To je možné mj. i díky tomu, že se v genomu nachází nadbytek kopií genů pro ribozomální RNA, a tedy určité množství inzerovaných TEs do rDNA může být buňkou tolerováno (Eickbush & Eickbush 2007). Navíc v konkrétních případech, zejména u ryb, byla disperze rDNA genů přímo spjata se současným výskytem některých TEs v daných lokusech (Cioffi et al. 2010a, de Silva et al. 2011, Nakajima et al. 2012, Costa et al. 2013, Silva et al. 2013). Diverzité TEs u ryb je věnována následující kapitola.

### 3.3.4. Transponovatelné elementy (TEs)

Genomy ryb vykazují značnou variabilitu ve velikosti a jedním z hlavních odpovědných faktorů je – podobně jako u ostatních obratlovců – rozdílná akumulace TEs (Kidwell 2002, Biémont & Vieira 2006, Feschotte & Pritham 2007, Böhne et al. 2008, Chalopin et al. 2015a). Jedná se o úseky DNA, které jsou schopné se v rámci jádra dané buňky přemístit z jednoho místa genomu na jiné a přitom se kopírovat anebo po sobě zanechat dvouvláknový zlom. Na základě jejich struktury a mechanismu transpozice jsou TEs klasifikovány do dvou hlavních tříd: 1) retrotranspozóny (RTEs) a 2) DNA transpozóny (DTEs) (Kidwell 2002, Wicker et al. 2007). Přestože dříve byly TEs považovány za frakci genomu, která nemá žádnou funkci a nijak nepřispívá k životaschopnosti organismu („junk DNA“) (Doolittle & Sapienza 1980) a která se tedy jen samoučelně kopíruje se zbytkem genomu do dceřiných buněk („selfish DNA“) (Orgel & Crick 1980), dnes je naprosto zřejmé, že TEs hrají celou řadu velice významných rolí v evoluci a v architektuře genomu. Konkrétně mohou podporovat vznik chromozómových přestaveb (Lønning & Saedler 2002, Raskina et al. 2008), ovlivňovat regulaci genové exprese přilehlých genů (Medstrand et al. 2005, Shapiro & Sternberg 2005, Slotkin & Martienssen 2007) nebo hrát úlohu při diferenciaci pohlavních chromozómů (např. Harvey et al. 2003, Steinemann & Steinemann 2005, Chalopin et al. 2015b). V neposlední řadě, některé TEs mohou mít vliv na stabilitu genomu a na jeho evoluci prostřednictvím různých epigenetických procesů (Jurka et al. 2007, Slotkin & Martienssen 2007). Byly rovněž popsány role TEs při adaptaci daného organismu na nové podmínky (Casacuberta & Gonzáles 2013). TEs evidentně zvýšením genetické variability podporují schopnost genomů vyvíjet se, když se změní externí podmínky (Rebollo et al. 2010, Hua-Van et al. 2011).

Množství a zastoupení jednotlivých TEs v genomech různých organismů může být do značné míry odrazem komplexity jejich obranných mechanismů proti transpoziční aktivitě (Abrusán & Krambeck 2006). Obranné mechanismy hostitelského genomu spolu s četností transpozice, kompeticí mezi jednotlivými typy TEs a dalšími vlivy jako je velikost populace a způsob reprodukce daného organismu vedou k jedinečnosti z hlediska obsahu TEs u různých evolučních linií (Le Rouzic a Capy 2006). Explosivní re-aktivace TEs může být odpovědí na stres, způsobený např. polyploidizační událostí, mezidruhovým křížením; anebo se může jednat o abiotický (environmentální) stres (McClintock 1984, Capy et al. 2000, Rebollo et al. 2010, Belyayev 2014). Důvodem, proč při hybridizaci a polyploidizaci dochází ke značné re-aktivaci TEs, je náhlá deregulace epigenetických regulačních mechanismů (Fontdevila 2005, Arkhipova a Rodriguez 2013).

Přestože jsou rybí genomy obecně více kompaktní než například genomy savčí, byla v nich pozorována největší diverzita TEs v rámci obratlovců. *De facto* každá skupina TEs je v genomech ryb nějakým způsobem zastoupena (Volff et al. 2003, Volff 2005, Dettai et al. 2007, Chalopin et al. 2015a). Recentní analýzy naznačují převahu DTEs u kostnatých ryb (Chalopin et al. 2015a, Gao et al. 2016) a ukazují, že jsou nejdůležitějším faktorem přispívajícím k variabilitě velikostí jejich genomů (Gao et al. 2016). Diverzita (nikoliv však kvantita) zejména RTEs zůstala v porovnání třeba s lidským nebo myším genomem velmi značná i v redukovaných kompaktních genomech čtverzubců (Roest Crollius et al. 2000, Aparicio et al. 2002, Volff et al. 2003). Z hlediska procentuálního zastoupení TEs v genomu má z dosud analyzovaných druhů zatím nejméně čtverzubeček *Tetraodon nigroviridis* (6 %) a nejvíce dánío pruhované *Danio rerio* (56 %, tedy přibližně 10x více) (Chalopin et al. 2015a, Gao et al. 2016). Obsah a distribuce TEs se mohou značně lišit v rámci stejné vývojové linie včetně blízce příbuzných druhů (např. Cioffi et al. 2010, Ferreira et al. 2011b) a mohou tak mít vliv na variabilitu ve velikostech genomů. Je dále zajímavé, že např. sladkovodní ryby, které obvykle tvoří menší efektivní populace než ryby mořské, mají obecně větší genomy (Yi a Streelman 2005). Stojí taky za povšimnutí, že mnoho rybích TEs zůstává stále aktivních (Bouneau et al. 2003, Huang et al. 2012).

Komplexní pohled na distribuci TEs v rámci genomu je nezbytný pro pochopení interakcí a koevoluce TEs s hostitelským genomem. Proto je žádoucí kombinovat sekvenační data s cytogenetickou analýzou (Dettai et al. 2007, Valente et al. 2016). V poslední době rychle narůstá počet prací, které se u ryb věnují fyzickému mapování transponovatelných elementů pomocí metody FISH (přehledy viz Ferreira et al. 2011b, Costa et al. 2013). Zatím jsou ale dostupné informace jen u velmi malého zlomku druhů z celkové diverzity (cca kolem 60 druhů). Z toho důvodu zatím není možné v širším kontextu chápat distribuční vzor a evoluční role TEs v rámci fylogenetických vztahů ryb. Je však zřejmé, že zatímco někdy bývají TEs rozptýlené po většině chromozómů daného karyotypu (Ozouf-Costaz et al. 2004), většinou tvoří viditelné shluky v konkrétních oblastech genomu jako například poblíž centromer nebo rDNA (Cioffi et al. 2010, Valente et al. 2011). Mezi nejhojněji studované elementy patří non-LTR („long terminal repeat“) RTEs rodiny *Rex* (elementy *Rex1*, 3 a 6), které byly poprvé popsány u platy skvrnitě *X. maculatus* (Volff et al. 1999) a byly aktivní během evoluce celé řady rybích linií (Volff et al. 2000, Volff 2005, Ferreira et al. 2011b, Costa et al. 2013). Distribuce těchto elementů se liší v rámci kostnatých ryb – u některých skupin se shlukují v oblastech heterochromatinu, případně výhradně v centromerách (Ozouf-Costaz et al. 2004, Teixeira et al. 2009, Cioffi et

al. 2010, Valente et al. 2011), u jiných jsou zase rozptýlené po celém genomu (Ozouf-Costaz et al. 2004, Ferreira et al. 2011a, Pansonato-Alves 2013b, Daniel et al. 2015). Dosud publikované studie přisuzují elementům rodiny *Rex* možné role ve speciálních procesech, při vzniku pohlavních a B chromozómů a aktivní účast na chromozómových přestavbách či disperzi lokusů rDNA (Ziegler et al. 2003, Ozouf-Costaz et al. 2004, Martins 2007, Cioffi et al. 2010, Cioffi & Bertollo 2012, Terencio et al. 2012, Silva et al. 2013). V rámci ryb byl dokonce popsán i příklad údajného horizontálního přenosu TEs (Koga et al. 2000).

### **3.4. Chromozómové přestavby a jejich význam v karyotypové diferenciaci ryb**

Struktura karyotypu je obvykle do značné míry specifickou charakteristikou daného živočišného nebo rostlinného druhu a změny v počtu, morfologii a velikosti chromozómů mohou být vnímány buď jako důsledek, anebo jako přímý důvod speciálních událostí (White 1973, 1978, King 1993, Sumner 2003, Raskina et al. 2008). Ač to nemusí být vždy pravidlem (např. Molina et al. 2002, Molina 2007), karyotypy různých druhů se od sebe liší z důvodu nejrůznějších chromozómových přestaveb a obvykle není jednoduché určit směr, jakým tyto změny proběhly (tj. směr karyotypové diferenciace). Potřebné podpůrné údaje nám však může poskytnout fylogenetický strom určující vztahy mezi zkoumanými druhy a/nebo tzv. outgroup (tj. karyotyp druhu patřícího do příbuzné, pokud možno sesterské skupiny) (Sumner 2003, Dobigny et al. 2004). Velice důležité je rovněž stanovit tzv. ancestrální karyotyp – tj., jaký karyotyp měl společný předek dané taxonomické skupiny (Dobigny et al. 2004). Je také nutné počítat s tím, že v některých případech pozorované přestavby nejsou (zatím) kauzálně spojené se speciací, nýbrž se udržují v rámci daného druhu jako polymorfizmy, které často vytvářejí mezipopulační rozdíly a představují různé karyomorfy (King 1993). Výskyt chromozómových polymorfizmů v přírodních populacích eviduje celá řada prací (White 1973, 1978, King 1993, Hoffman et al. 2004). Vedle polymorfizmů menšího rozsahu ovšem v některých případech karyotypová analýza odhalí kryptické druhy nebo druhový komplex, což je obzvláště důležité v případech, kdy jiné typy analýz (např. morfometrická analýza) žádné rozdíly neodhalí (Volobouev et al. 2002).

Abychom se mohli bavit o karyotypové diferenciaci a potažmo o chromozómové speciaci, musíme si nejprve definovat, jaký je mechanismus vzniku nejběžnějších chromozómových přestaveb, jaký vliv mají na životaschopnost jedince, jakým způsobem mohou být fixovány v populaci a jaký je jejich vliv na proces speciace. O těchto tématech pojednávají následující podkapitoly.

### 3.4.1. Základní typy přestaveb a jejich vliv na životaschopnost a fertilitu

Předmětem následujících odstavců není vyčerpávající přehled všech chromozómových přestaveb, nýbrž nástin mechanismu vzniku a důsledky těch nejběžnějších z nich, které se ve zvýšené míře uplatnily v karyotypové diferenciaci/evoluci napříč organizmy. Ač bych nerad opomíjel důležitý příspěvek delecí, duplikací a reciprokových či nerekiprokových translokací nezahrnujících centromeru, svoji pozornost zaměřím zejména na inverze, centrické fúze a rozpady, tandemové fúze a adice heterochromatinu (King 1993, Schmid et al. 2010). Tyto přestavby nejen, že jsou nejčastěji popisovanými mechanismy změny  $2n$  a  $NF$  v rámci karyotypové diferenciaci (byť bohužel někdy v rámci mylné interpretace; přehled viz Schubert & Lysák 2011), ale rovněž budou dále diskutovány v kontextu s výsledky této práce.

Chromozómová inverze je přestavba, při které dojde obvykle ke dvěma dvouvláknovým zlomům v rámci jednoho chromozómu, vyštěpený segment se převrátí o  $180^\circ$  a posléze dojde k jeho opětovnému znovuspojení s mateřskou molekulou DNA. K inverzi může dojít mj. také mechanismem ektopické rekombinace zahrnující dvě kopie téže tandemové repetice (často TEs) na daném chromozómu (Delprat et al. 2009). Pokud je součástí invertovaného segmentu centromera, jedná se o inverzi pericentrickou, v opačném případě se bavíme o inverzi paracentrické. V konečném důsledku se změní pořadí některých genů na chromozómu, může dojít ke změně v jejich expresi, a pokud se jednalo o inverzi pericentrickou, může se více či méně změnit morfologická kategorie chromozómu (King 1993, Schmid et al. 2010). Pro jedince heterozygotního pro danou inverzi potom platí, že v profázi prvního meiotického dělení, aby spolu mohly párovat homologní chromozómy, vznikne v oblasti párování invertovaného segmentu s původní neinvertovanou oblastí tzv. inverzní smyčka. Pokud v oblasti inverzní smyčky nedojde ke crossing-overu, polovina gamet ponese chromozóm s inverzí, ale jinak se nic zásadního z hlediska životaschopnosti potomstva nestane. Podobný výsledek bude mít i dvojitý crossing-over v rámci smyčky. Pokud ale dojde uvnitř smyčky k jednoduchému crossing-overu mezi invertovanou a neinvertovanou chromatidou, povede to při následné segregaci chromozómů ke tvorbě gamet, z nichž polovina ponese chromozóm s duplikací a delecí různých segmentů. Takovéto aberantní gamety povedou ke vzniku neživotaschopného potomstva (White 1973, Hoffmann & Rieseberg 2008, Lysák & Schubert 2013). Pokud tedy není rekombinace v oblasti přestavby nějakým způsobem potlačena, je heterozygot pro inverzi silně selektivně znevýhodněn z hlediska reprodukce (King 1993, Hoffman & Rieseberg 2008, Schmid et al. 2010). I přesto bylo zjištěno, že na rozdíl od rostlin většina inverzí nemá u živočichů vliv na



redukci fitness (John 1981, Coyne et al. 1993, Bardhan & Sharma 2000, Rieseberg 2001, Coyne a Orr 2004). Naopak, inverze hrály velmi podstatnou úlohu v karyotypové evoluci mnoha živočišných skupin (White 1973, Green a Sessions 2007).

Centrické fúze jsou nejrozšířenějším typem chromozómové přestavby v karyotypové evoluci v rámci dosud studovaných organismů (King 1993, Schmid et al. 2010). Analogickým procesem v opačném směru probíhají centrické rozpady, které jsou obecně méně časté (např. Qumsiyeh 1994). Na rozdíl od inverzí, centrické fúze a rozpady mění  $2n$  a zcela jasně mění také velikost a morfologii zúčastněných chromozómů. Fúze navíc zahrnuje dva nehomologické chromozómy, zatímco výše popisované inverze se odehrávají pouze v rámci jedné vazebné skupiny. Nejznámější popisovanou formou jsou fúze a rozpady Robertsonova typu. K Robertsonovým (Rb) translokacím/fúzím dochází tehdy, pokud dva jednoramenné (akrocentrické nebo subtelocentrické) chromozómy fúzíjí spolu v oblasti centromery za vzniku nápadně většího dvouramenného (submetacentrického nebo metacentrického) elementu, přičemž se ztrácí krátká raménka původních chromozómů (*sensu* Robertson 1916). Produkt Rb translokace má posléze dvě centromery lokalizované vedle sebe, ale ty se funkčně chovají jako jeden celek, nebo je jedna původní centromera inaktivována. Někdy se centromera produktu Rb translokace na cytologické úrovni projevuje jako nápadný blok pericentromerického heterochromatinu (např. Schmid et al. 2010). To záleží zejména na tom, na kterém místě v původních chromozómech dojde ke zlomům – jestli v krátkých (p) raménkách anebo přímo uvnitř satelitní sekvence centromery. V tom druhém případě vzniká ještě jako meziprodukt miniaturní chromozóm s centromerou a pokud je eliminován při následných buněčných děleních, může Rb translokace vést k dědičnému snížení  $2n$  (Lysák & Schubert 2013). Rb translokace mohou vzniknout i v přímém důsledku zkrácení telomer na kritickou délku, v důsledku diskontinuální replikace na opožděném vlákně DNA (tzv. „end replication problem“) (Olovnikov 1973, Allsopp et al. 1995, Slijepčević 1998). Vlivem translokace dochází ke vzniku nových vazebných skupin, může dojít k přerušení vazby genu s regulační oblastí, ke tvorbě chimérických genů a k deregulaci exprese genů v oblasti přestavby (aktuální přehled viz Roukos & Misteli 2014). V profázi prvního meiotického dělení se u hetrozygota s translokací tvoří trivalent ze dvou jednoramenných a jednoho ekvivalentního dvouramenného homologického chromozómu a následně dochází k segregáčním problémům i bez účasti rekombinace. Na úrovni jedince způsobují Rb (a jiné reciproké) translokace produkci asi 40% nebalancovaných gamet, poruchu fertility, poruchy spermatogeneze, vznik deformovaných spermií aj. (King 1993, Roux et al. 2005, Vozdová et al. 2014). U člověka jsou Rb

translokace nejběžnější chromozómovou přestavbou (Page et al. 1996). Z evolučního hlediska ale vznik stabilní Rb translokace, následovaný její fixací v polymorfní populaci, může vyústit v post-zygotickou reproduktivní izolaci homozygotů pro danou přestavbu (Baker & Bickham 1986, Ropiquet et al. 2008). Klasickým modelem pro mezipopulační variabilitu Rb translokací je myš domácí *Mus musculus domesticus*, u které byla zjištěna ohromná diverzita  $2n$  způsobená Rb translokacemi zahrnujícími přibližně 60 % všech možných kombinací původních telocentrických chromozómů (tj. přes 100 tzv. „metacentrických ras“) (Hauffe et al. 2012 a citace zde uvedené). Konkrétně právě u myši se ukázalo, že heterozygotní sestava chromozómů zahrnutých v Rb translokaci má minimální efekt na fitness (Hauffe a Searle 1998, Sans-Fuentes et al. 2010). U savců obecně napomohla vzniku Rb translokací řada faktorů – velikosti chromozómů, obsah GC-bohaté DNA, genová denzita, nehomologní rekombinace mezi repetitivními sekvencemi a eroze či inaktivace telomer na p-raménkách (Slijepčević 1998, Garagna et al. 2001, Ruiz-Herrera et al. 2010, Wesche & Robinson 2012).

V případě tandemové fúze dva chromozómy fúzují svými konci, a pokud je následně jedna původní centromera inaktivována, vede to ke vzniku stabilního produktu. Běžným případem je fúze dvou malých akrocentrických chromozómů za vzniku velkého jednoramenného elementu. Důsledkem tandemové fúze je redukce  $2n$  a změna NF. Segregační poměry v meióze jsou u heterozygota podobné jako u centrických fúzí a rozpadů (King 1993, Schmid et al. 2010). Tandemové fúze bývají často pozorovány u organizmů, v jejichž karyotypech je převaha jednoramenných chromozómů a markerem této přestavby může být intersticiální blok konstitutivního heterochromatinu v dlouhých (q) raménkách (King 1993). Tandemové fúze byly dominantní přestavbou v karyotypové evoluci jelínek rodu *Muntjac* (Lee et al. 1993, Hartmann a Scherthan 2004).

Adice heterochromatinového bloku může vzniknout např. amplifikací pericentromerického heterochromatinu za vzniku různě dlouhých heterochromatinových p-ramének. Případná disperze na další chromozómy může být podpořena lokací na konci chromozómu, které jsou náchylnější k přenosu genetického materiálu a nenáhodným uspořádáním chromozómů (resp. přiblížení telomer) v interfázním jádře podle modelu popsaného Schweizerem & Loidlem (1987). Heterochromatinizace krátkého raménka může být rovněž důsledkem inverze (King 1993). Křížící experimenty ukázaly, že adice heterochromatinu u heterozygotů nemá obvykle žádný negativní vliv na fertilitu, a tak zde příliš nepůsobí evoluční tlak proti tvorbě různých polymorfizmů. Takové polymorfizmy pak

mohou setrvat v rámci populace velmi dlouho. Nicméně vysoký obsah heterochromatinu v genomu zvyšuje pravděpodobnost vzniku dalších typů přestaveb (King 1993).

V rámci ryb obvykle jednoduché polymorfizmy zahrnující pouze jednu chromozómovou přestavbu nemají obvykle zásadní negativní vliv na životaschopnost a na fitness (tj. reprodukční zdatnost) u heterozygotních jedinců, jak bylo popsáno v případě centrických fúzí a rozpadů u zástupců lososovitých (Salmonidae) (např. Phillips & Kapuscinski 1987, 1988) a hlaváčovitých (Gobiidae) (Ene et al. 2003) nebo v případě jiných typů translokací u gudeovitých (Goodeidae) (Turner et al. 1985). Mezi zajímavé případy patří výskyt plně životaschopných a fertálních dvojitých heterozygotů pro dvě různé přestavby (inverze a centrické rozpady) u lososa *Oncorhynchus gorbuscha* (Phillips et al. 1999). Naopak, paracentrická inverze zahrnující NOR u pstruha duhového *O. mykiss* byla asociována s letalitou u homozygotních jedinců (Porto-Foresti et al. 2004).

### 3.4.2. Modely chromozómové speciace

Karyotypová diferenciacie zahrnuje 1) chromozómové přestavby vytvářející vnitropopulační karyotypovou variabilitu a 2) různé karyotypové změny, jež se fixují v různých populacích. Z evolučního úhlu pohledu je nejzajímavějším aspektem karyotypové diferenciacie potenciál chromozómových přestaveb přispět ke speciaci a adaptaci jako efektivní post-zygotická bariéra. Nicméně, jak je zřejmé z některých karyotypově konzervativních skupin živočichů (vačnatci, medvědi, kočky aj.), speciace nemusí nutně změny na karyotypové úrovni zahrnovat (White 1973, 1978, King 1993, Qumsiyeh 1994).

Modely chromozómové speciace mohou být rozděleny do dvou základních skupin. Do té první patří modely tradiční (tzv. „hybrid-sterility models“) (White 1978, King 1993, Rieseberg 2001), které předpokládají, že určité typy chromozómových přestaveb jako jsou translokace, inverze, fúze a rozpady mohou mít negativní vliv na fertilitu a na životaschopnost potomků daného jedince vlivem mechanismů popsaných výše. Výsledné gamety (nebo zygota z nich vzniklá) jsou následně neživotaschopné, což vytváří bariéru mezi jedinci s přestavbou a jedinci se standardním karyotypem. Absence genového toku mezi populacemi lišícími se v dané přestavbě nakonec vede ke speciaci. Takto koncipované modely ovšem naráží na fakt, že přestavba, která v heterozygotním stavu způsobí značnou redukci fitness, může být v populaci fixována jen za určitých podmínek – např. pomocí meiotického tahu, genetického driftu v malých inbredních populacích anebo v případě pozitivní selekce ve prospěch nově vzniklé kombinace alel, jejichž přítomnost v silné genové vazbě hraje nějakou důležitou úlohu v adaptaci na lokální podmínky prostředí (White 1978,

Lande 1985, King 1993, Rieseberg 2001, Kirkpatrick & Barton 2006, Kawakami et al. 2011). Tyto podmínky nejsou v přírodě až tak časté, aby takto koncipovaný model chromozómové speciace mohl být široce uplatněn (Rieseberg 2001, Ayala & Coluzzi 2005, Butlin 2005). Mimoto, v případě, že přestavba příliš fitness jedince nesníží, bude naopak snadno fixována a nebude mít moc velký vliv na reprodukční izolaci dané populace, tedy nepovede ke speciaci (Rieseberg 2001, Navarro & Barton 2003). Proti tradičním modelům nakonec hovoří i experimentální data, protože bylo prokázáno, že např. inverze u živočichů často fitness neredukují (viz výše).

Druhá skupina modelů (tzv. „suppressed-recombination models“) je založena na více recentních představách o principu chromozómové speciace. Takové modely předpokládají, že v blízkosti zlomů u přestaveb v heterozygotním stavu je značně redukován až inhibován crossing-over – pravděpodobně proto, že přestavba narušuje párování chromozómů (Noor et al. 2001, Rieseberg et al. 2001, Ayala & Coluzzi 2005, Butlin 2005, Faria & Navarro 2010). V oblasti vymezené chromozómovou přestavbou a v jejím okolí se tedy mohou začít akumulovat rozdíly na úrovni sekvence DNA, protože v daném místě nebude docházet k rekombinaci a to umožní genům lokalizovaným v této části chromozómu odlišit se na sekvenční úrovni. Postupná akumulace rozdílů mezi jedinci lišícími se v dané přestavbě může značně přispět k divergenci druhů. Suprese rekombinace je tedy faktor, který určuje potenciál chromozómové přestavby vést ke speciaci (Noor et al. 2001, Rieseberg 2001, Navarro & Barton 2003). Rozdíl od předchozí skupiny modelů spočívá v tom, že modely potlačení (suprese) rekombinace počítají s kumulativním efektem – tj. vznik chromozómové přestavby a následné sekvenční odlišení. Chromozómová přestavba přitom nemusí mít negativní efekt na fitness, aby mohla ke speciaci vést (Rieseberg 2001). Modely na této bázi byly podpořeny teoreticky i empiricky (Navarro & Barton 2003, Coyne & Orr 2004, Ayala & Coluzzi 2005, Kirkpatrick & Barton 2006, Feder & Nosil 2009, Faria & Navarro 2010). Většina z nich se zaměřila na analýzu efektu chromozómových inverzí, i když poslední dobou začínají přibývat také práce zaměřené na Rb translokace (Dumas et al. 2015).

Změny na úrovni chromozómových přestaveb vedou k přeuspořádání současných genových vazeb, což může mít různý vliv na expresi genů anebo celých genových klastrů. Takové změny mohou být zároveň důležitým zdrojem evolučních inovací (Butlin 2005, Faria & Navarro 2010). Suprese rekombinace v oblasti chromozómové přestavby může mít za následek, že se v této oblasti chromozómu budou postupně hromadit (a dostávat do silné genové vazby) alely, které mohou mít vliv na lepší adaptaci daného druhu na příslušnou lokalitu (Noor et al. 2001, Butlin 2005, Kirkpatrick & Barton 2006, Hoffmann & Rieseberg

2008, Faria & Navarro 2010, Guerrero & Kirkpatrick 2014), nebo se dostanou do vazby geny přímo asociované s reprodukční izolací (Kawakami et al. 2011). To může vést k divergenci dvou populací i bez nutnosti přerušení genového toku.

Některé práce naznačují, že genomy konkrétních taxonomických skupin jsou náchylné k určitým typům přestaveb, což se posléze může např. odrazit v podobné adaptabilitě na určité podmínky prostředí. Daný jev se nazývá karyotypová ortoselekce (White 1973, 1978, King 1993) a může souviset mj. s distribucí repetitivních sekvencí, které se mohou na iniciaci přestaveb podílet (King 1993, Raskina et al. 2008). Např. u myši *M. musculus domesticus* byla popsána pozitivní korelace mezi náchylností k Rb translokacím a výskytem AT-bohatých pericentromerických repetitivních sekvencí (Redi et al. 1990). Další typické příklady karyotypové ortoselekce jsou Rb translokace u turovitých (Gallagher & Womack 1992) nebo centrické rozpady u zástupců psovitých šelem (Graphodatski et al. 2001).

Jaké procesy vlastně stojí v pozadí karyotypové evoluce/diferenciace ryb? Jaké jsou hybné síly, které určují, zdali bude mít karyotyp převahu jednoramenných nebo dvouramenných chromozómů a jaké jsou důsledky? S ohledem na ohromnou biodiverzitu paprskoploutvých ryb, neumožňuje dosud limitovaný počet karyotypovaných druhů vyvodit obecnější závěry o mechanismech karyotypové diferenciace celé skupiny. Pro některé jednotlivé řády paprskoploutvých ryb však už ale relevantní data dostupná jsou, např. u Salmoniformes (Phillips a Ráb 2001), Esociformes (Ráb 2004) a Perciformes (Molina 2007, Artoni et al. 2015) Současné teorie o trendech karyotypové diferenciace paprskoploutvých ryb zahrnují mechanismus meiotického tahu na úrovni větších taxonomických celků, a účast karyotypové ortoselekce následně na úrovni čeledí a rodů (Molina et al. 2014) Meiotický tah (*sensu* Sandler & Novitski 1957) vede k preferenční segregaci chromozómů v meióze a může mít za následek postupnou akumulaci jednoramenných nebo dvouramenných chromozómů v karyotypu konkrétních skupin ryb. Speciální význam je přisuzován především tahu centromerickému, kde variace v sekvenci centromer a struktura asociovaných centromerických proteinů hrají roli v rozdílných schopnostech centromer vázat mikrotubuly dělicího vřetenka (Malik 2009). Kromě těchto představ byla již dříve konkrétně u Salmoniformes úspěšně aplikována hypotéza, kterou formuloval Qumsiyeh (1994) pro karyotypovou evoluci savců. Qumsiyeh (1994) předpokládá, že změny  $2n$  a  $NF$  prostřednictvím konkrétních chromozómových přestaveb mohou být selektivně zvýhodněny z důvodu jejich efektu na zvýšení nebo snížení rekombinace, což může mít v konečném důsledku značný vliv na schopnost adaptace na specifické podmínky prostředí.

Zatímco u některých skupin kostnatých ryb karyotypová variabilita pozitivně koreluje s pozorovanou diverzitou např. ve tvaru těla (z dosud nezmiňovaných třeba u hadohlavcovitých Channidae; Cioffi et al. 2015 a citace zde uvedené), u jiných skupin naopak zjevně karyotypová diferenciace nehraje až tak zásadní evoluční úlohu. Například u halančíka *Chromaphyosemion bivittatum* je malý stupeň haplotypové a morfologické diverzity doprovázen neobvyklou vnitropopulační i mezipopulační karyotypovou diverzitou (Völker et al. 2007, 2008) a naopak, některé čeledi ostnoploutvých ryb (Perciformes) mají extrémně konzervované karyotypy na úrovni  $2n$  i NF a přitom vykazují ohromnou variabilitu v morfologii těla (Molina 2007, Motta-Neto et al. 2011a, b).

### **3.4.3. Cytologická detekce chromozómových přestaveb a jejich interpretace**

Počet chromozómů a NF jsou dobrými vodítky pro detekci karyotypových změn. Obvykle ale tímto způsobem zachytíme jen ty nejnápadnější chromozómové přestavby – konkrétně tandemové fúze, centrické fúze a rozpady a pericentrické inverze. Naopak běžnou cytogenetickou analýzou obvykle nezachytíme většinu reciprokových translokací, které jsou některými autory považovány za nejčastější typ chromozómové přestavby v karyotypové evoluci (Schubert & Lysák 2011). Velice nápadným náznakem fúzí a rozpadů je změna  $2n$  při současně nezměněném NF. Právě pro usnadnění kvantifikace těchto typů přestaveb byla charakteristika NF původně navržena (Matthey 1945). Pericentrické inverze naopak mohou pozměnit NF, ale  $2n$  zůstane stejné. Paracentrické inverze oproti tomu odhalíme jen náhodou (nepočítáme-li klasické studie na polytenních chromozómech; přehled viz Schmid et al. (2010), a to sice pokud jsou asociované s nějakým cytologicky detekovatelným markerem (blok heterochromatinu, rDNA lokus apod.) (u ryb např. Porto-Foresti et al. 2004). Asociace s bloky heterochromatinu však může být vhodným markerem pro detekci celé řady jiných chromozómových přestaveb (Badaeva et al. 2007). Vhodnou metodou pro detekci invertovaných segmentů na chromozómech je CO-FISH (hybridizace jednovláknových sond), díky které může být zjištěna dokonce orientace hybridizovaného úseku (Robinson et al. 1998, Garagna et al. 2001). Někdy není vyhodnocení mechanismů karyotypové diferenciace úplně jednoznačné a daná pozorování mohou být nesprávně interpretována (Schubert & Lysák 2011). Pro detailnější studium karyotypové diferenciace/evoluce se stále více uplatňuje analýza využívající FISH s celochromozómovými malovacími sondami (např. Kubičková et al. 2002, Chaves et al. 2004, Vozdová et al. 2011) a to včetně rybí cyogenetiky (.viz kapitola 3.2 a zejména studie Nagamachi et al. 2010).

#### 3.4.4. Chromozómové přestavby v karyotypové diferenciaci ryb

Na základě srovnávací analýzy genomů medaky, zebřičky, čtverzubce a genomu lidského došli Ravi & Venkatesh (2008) k závěru, že v genomech kostnatých ryb se vyskytly chromozómové přestavby všeho druhu ve větší míře než u ostatních obratlovců. Četné cytogenetické studie ukázaly, že karyotypy konkrétních skupin formovaly převážně pericentrické inverze a Rb translokace, případně tandemové fúze a centrické rozpady. Výrazný vliv pericentrických inverzí na karyotypovou diferenciaci byl popsán např. u některých Perciformes (Molina & Galetti 2004, Kavalco 2005, Molina 2007, Pucci et al. 2014), přestože obecně je tato skupina vnímána z karyotypového hlediska jako značně konzervativní (Molina et al. 2002, Molina 2007, Motta-Neto et al. 2011a, b). Rb translokace (případně tandemové fúze a centrické rozpady) byly popsány např. u lososovitých (Salmonidae) (Ráb & Phillips 2001), kde byly dokumentovány i různé populace polymorfní pro danou přestavbu (Thorgaard 1976, Phillips & Kapucinski 1987). Podobně polymorfní populace byly popsány rovněž u některých sumců (Siluriformes) (Porto et al. 2014), hlaváčovitých (Gobiidae) (Ene 2003) a jednoho mexického druhu z čeledi gudejovitých (Cyprinodontiformes) (Turner et al. 1985). Centrické rozpady byly popsány zejména u sumců (Siluriformes) (Artoni & Bertollo 2001, Kavalco et al. 2005, Milhomem et al. 2010, Mariotto et al. 2011, Rosa et al. 2012, Maneechot et al. 2016) a především pro čeleď Locariidae jsou hlavním mechanismem karyotypové diferenciace (Artoni & Bertollo 2001). Adice AT-bohatého heterochromatinu byly popsány u halančíků (Völker et al. 2007, 2008). Není náhodou, že výše popsané případy se týkají zejména sladkovodních ryb. U mořských ryb je fixace nových přestaveb obtížnější kvůli vysoké mobilitě (vajíček, larev i dospělců) a vzhledem k absenci geografických překážek (Galetti et al. 2000). Vyjíměčně ale i u mořských ryb byly pozorovány polymorfizmy třeba na úrovni centrických fúzí či rozpadů – např. u sledě bělomořského *Clupea pallasii marisalbi* (Lajus 2007).

Ačkoliv jsou chromozómové přestavby významným mechanismem speciace a u ryb měly nepochybně důležitý vliv na diverzifikaci druhů v rámci různých podskupin, poněkud nadřazenější roli měly v evoluci genomů (a karyotypů) ryb změny celogenomové, kterým se věnuje následující kapitola.

### 3.5. Polyploidie a její význam v evoluci ryb

#### 3.5.1. Polyploidie – obecná charakteristika a vymezení termínu

Polyploidie je stav, kdy se v somatických buňkách vyskytuje více než dvě kompletní sady chromozómů. Jedná se v podstatě o extrémní případ duplikace, která v tomto případě postihuje celý genom (whole genome duplication, WGD). Polyploidizace neboli WGD se vyskytla u předchůdců celé řady skupin dnešních obratlovců, rostlin a hub a řada autorů připisuje tomuto procesu značný význam z hlediska druhové diverzifikace (přehled viz Cox et al. 2014). Polyploidie se vyskytuje obzvláště u rostlin, kde podle současných genomových a cytogenetických analýz prodělaly všechny vyšší rostliny alespoň jednu WGD (Jaillon et al. 2009, Soltis et al. 2009, Van de Peer et al. 2009, Jiao et al. 2011). U živočichů je odlišení polyploidních populací od těch diploidních na morfologické úrovni často téměř nemožné, ovšem užitím genetických a cytogenetických metod počet polyploidních forem živočichů postupně narůstá (přehled viz Bogart & Bi 2013). I tak ale zatím stále zůstává faktem, že u živočichů se polyploidie vyskytuje méně než u rostlin. Důvodů, proč tomu tak je, byla vyčtena celá řada. Patří mezi ně: 1) přítomnost pohlavních chromozómů, 2) komplexnější ontogenetický vývoj, 3) nižší schopnost kompenzace poměru velikost/počet buněk (přehledy viz Mable 2004, Mable et al. 2011). V případě pohlavních chromozómů dochází u polyploidů k problémům spjatým s jejich chybnou segregací do dceřiných buněk a může dojít i k porušení kompenzace dávky genů (Hartl & Ruvolo 2012). Byly ovšem popsány i protiargumenty, proč by např. přítomnost pohlavních chromozómů u živočišných polyploidů vadit správné reprodukci nemusela (Mable 2004). Z hlediska vývoje, generuje polyploidie dle očekávání předčasnou mortalitu nebo těžké vývojové abnormality zejména u vyšších obratlovců (Otto & Whitton 2000). Nicméně i tak hrála polyploidie u obratlovců nepochybně velmi důležitou evoluční úlohu, krom jiného i díky tomu, že umožňuje sympatrickou speciaci (Otto & Whitton 2000).

K polyploidii dochází v důsledku působení různých biotických a abiotických stresů – např. fyzikálních (zejména teplotní), nebo jako důsledek hybridizační události či přestárnutí gamet. Za určitých okolností se tento stav může evolučně fixovat za vzniku nového (polyploidního) taxonu. Při znalosti diploidních předků můžeme potom hovořit o evoluční polyploidizaci. Po polyploidní události ovšem genom vlivem řady mechanismů (viz dále) nastoupí fázi postupné re-diploidizace vedoucí až (u sexuálně se rozmnožujících organismů) k obnovení tvorby bivalentů namísto multivalentů v meióze a zde pak hovoříme o biologickém diploidovi (Tyalé & Parisod 2013). Z hlediska objevování polyploidních druhů pak nastává problém, pokud polyploidní původ tušíme, ale nejsou známi přímí



předchůdci daného druhu. Snadnost identifikace polyploidního původu druhu souvisí rovněž se stářím polyploidizační události – např. u paleopolyploidů už genom došel do tak pokročilé fáze re-diploidizace, že je prakticky nemožné rozpoznat případné parentální genomy a bývá obtížné rozpoznat polyploidii samotnou (přehledy viz Flajšhans et al. 2013, Tyalé & Parisod 2013).

### 3.5.2. Autopolyploidie a allopolyploidie

Polyploidie může být výsledkem znásobení celé sady chromozómů u jednoho druhu (autopolyploidie) a nebo se může jednat o spojení dvou různých genomů při mezidruhově hybridizaci (allopolyploidie) (Otto 2007, Flajšhans et al. 2013). V případě autopolyploidizace můžou být příčinou poruchy gametogeneze (spontánní porucha segregace chromozómů během prvního nebo druhého meiotického dělení) a následné splynutí gamet, z nichž jedna – (ať už spermie nebo vajíčko) – má neredukovanou (tedy diploidní) sadu chromozómů. Dále může být příčinou stárnutí ovulovaných oocytů a nebo může dojít k poruše rozchodu chromozómů v časném embryu. Zapůsobit mohou i vlivy prostředí, které mohou způsobit poruchy v procesu fertilizace gamet (přehledy viz Flajšhans et al. 2013, Mason & Pires 2015). Allopolyploidizace zahrnuje inkorporaci jednoho nebo i více genomů blízké příbuzným druhů procesem hybridizace. Má obvykle za následek změnu normálního bisexuálního typu rozmnožování na některý typ rozmnožování asexuálního (viz kap. 3.5.7.).

Přestože máme stále značně omezené znalosti ohledně procesů spjatých s allopolyploidizací a jejími důsledky (Ma & Gustafson et al. 2005, Parisod et al. 2010a, Abbott et al. 2013), tak se zdá, že v přírodě má u studenokrevných živočichů tato forma nad autopolyploidii převahu, což by mohlo být vysvětleno např. přítomností dvou různých sad genetického materiálu, které mohou poskytnout větší možnosti pro následné evoluční procesy spjaté s adaptací a vývojem daného polyploida (Mallet 2007). U rostlin však převažuje autopolyploidie (Ramsey & Schemske 1998), ovšem není zatím úplně patrné, jaké z toho přesně pro rostliny plynou evoluční důsledky (Comai 2005, Parisod et al. 2010b).

Přestože auto- i allopolyploidie může vést k reprodukční izolaci části populace daného druhu, projevují se oba mechanismy jinak v konečném důsledku. Autopolyploidní jedinci se od diploidních vzhledově příliš neliší a obývají i podobnou nebo stejnou niku, což vede ke kompetici mezi diploidními a polyploidními jedinci, díky čemuž se polyploidní linie nemusí dlouhodobě udržet (Zhang & King 1993). Pokud autopolyploidní jedinci začnou obývat jinou niku, je možná jejich ko-existence s diploidním druhem – např. sekavec *Cobitis*

*biwae* (Kusunoki et al. 1994, Saitoh et al. 2010). Vznik allopolyploidních jedinců je více komplexní proces, který může zahrnovat i období asexuální reprodukce. Hybridní potomstvo má větší potenciál adaptovat se na jinou niku než autopolyploidi (Arnold & Bennett 1993, Brochmann et al. 2004, Paun et al. 2011). U ryb jsou příkladem allotetraploidní linie pakaprovcovití (Catostomidae) (Uyeno & Smith 1972, Ferris a Whitt 1980), nebo početné polyploidní linie kaprovitých (Cyprinidae) Yang et al. 2015).

### 3.5.3. Dynamika genomu po polyploidizační události

Polyploidizace funguje jako okamžitá a účinná bariéra genového toku, jelikož potomci rodičů o různém stupni ploidie se buď nevyvíjejí, nebo jsou sterilní, z důvodu nebalancovaného počtu chromozómů (Comai 2005). Polyploidizace tak může většinou vést ke speciaci.

Polyploidie je spojena s řadou dynamických změn probíhajících na genomové a epigenetické úrovni. Patří mezi ně chromozómové přestavby, mobilizace TEs, umlčení některých genů a jev zvaný „genome downsizing“ (viz dále) (Parisod et al. 2010a, b, 2012, Tyalé a Parisod 2013). Současně dochází i k akumulaci repetitivních sekvencí, které se vyvíjejí rychleji než sekvence unikátní (Schwarzacher et al. 1989).

Již delší dobu je obecně přijímána myšlenka, že polyploidizace výrazně zvyšuje plasticitu genomu, která následně urychluje genomovou evoluci prostřednictvím různých strukturních změn, vytvářením nových genových komplexů a zejména pak díky přítomnosti redundantních kopií genů (Ohno 1970, 1999, Taylor & Raes 2004). Tyto nadbytečné kopie genů přítomné v genomech polyploidů jednak poskytují nové kombinace alel, což může vést 1) ke značné akceleraci evoluce u daného polyploidního genomu (heterózní efekt) a 2) k eliminaci možného nepříznivého vlivu recesivních alel (Comai 2005, Madlung 2013). Navíc je zde menší selekční tlak na tyto nadbytečné kopie a ty mohou po akumulaci různých mutací získat nové funkce (neofunkcionalizace) (přehled viz Cuypers & Hogeweg 2014). Takové geny se mohou ukázat v určitém ohledu jako evolučně výhodné a mohou vést potenciálně až ke speciaci. K udržení fyziologie organismu totiž stačí dvě alely daného genu, tudíž selekce nepůsobí na všechny alely polyploida stejně (Rong et al. 2010). Mnohem častěji se však nadbytečné kopie vlivem naakumulovaných mutací, inzercí TEs nebo vlivem epigenetických modifikací stanou zcela nefunkčními (non-funkcionalizace, pseudofunkcionalizace) (Kidwell & Lisch 1997, Lynch & Conery 2000). Poslední možností je, že dojde k rozložení funkce mezi původní a nadbytečnou kopii daného genu (subfunkcionalizace) (Lynch a Conery 2000).

Dalším důsledkem polyploidizační události je deregulace mechanismů, které se podílely na umlčování TEs, a tak dochází ke značnému nárůstu transpoziciční aktivity (Matzke & Matzke 1998, Ma & Gustafson et al. 2005, Parisod et al. 2010a, b). To se projevuje zejména u allopolyploidů (viz dále), protože zde přicházejí do styku dva původně odlišné genomy, které nejsou obvykle zcela kompatibilní z hlediska obranných mechanismů proti transpozici. Re-aktivace TEs může vést k rapidním změnám na úrovni uspořádání genomu i na úrovni exprese různých genů (Raskina et al. 2008, Rebollo et al. 2010, Bento et al. 2013). Již Barbara McClintock (1984) navrhla, že v důsledku polyploidní události může k uvedeným procesům dojít. Její tzv. “teorie genomového šoku” byla dosud v praxi pozorována u mnoha allopolyploidních rostlin a v konečném důsledku může znamenat ztráty funkce některých genů, poruchy v meiotickém párování chromozómů, změny v metylačních vzorech a nebo chromozómové přestavby (Cox et al. 2014). Genetické a epigenetické modifikace zahrnuté v reorganizaci zejména allopolyploidních genomů byly již popsány v řadě případů (přehled viz Bento et al. 2013)

Bylo prokázáno, že po polyploidizační události není výsledný genom sumou velikostí genomů původních (resp. dvojnásobek původního genomu u autopolyploidie), nýbrž že v důsledků reorganizačních procesů dochází ke snížení celkového obsahu DNA. Dochází totiž k jevu označovanému jako „genome downsizing“, při němž mohou i podstatné části chromozómů (zejména u autopolyploidů) být ztraceny. Tyto změny jsou zřejmě nezbytné k tomu, aby nějakým způsobem byla nastavena životaschopnost polyploidního genomu. Genome downsizing je pravděpodobně velice rozšířený jev (Leitch & Bennett 2004), který významně přispívá k procesu re-diploidizace. Nakonec se po určité době nastrádá tolik genomických/cytogenetických změn, že může být výsledný genom charakterizován jako diploidní (resp. re-diploidizovaný) (Otto & Whitton 2000, Ma & Gustafson 2005, Tyalé & Parisod 2013).

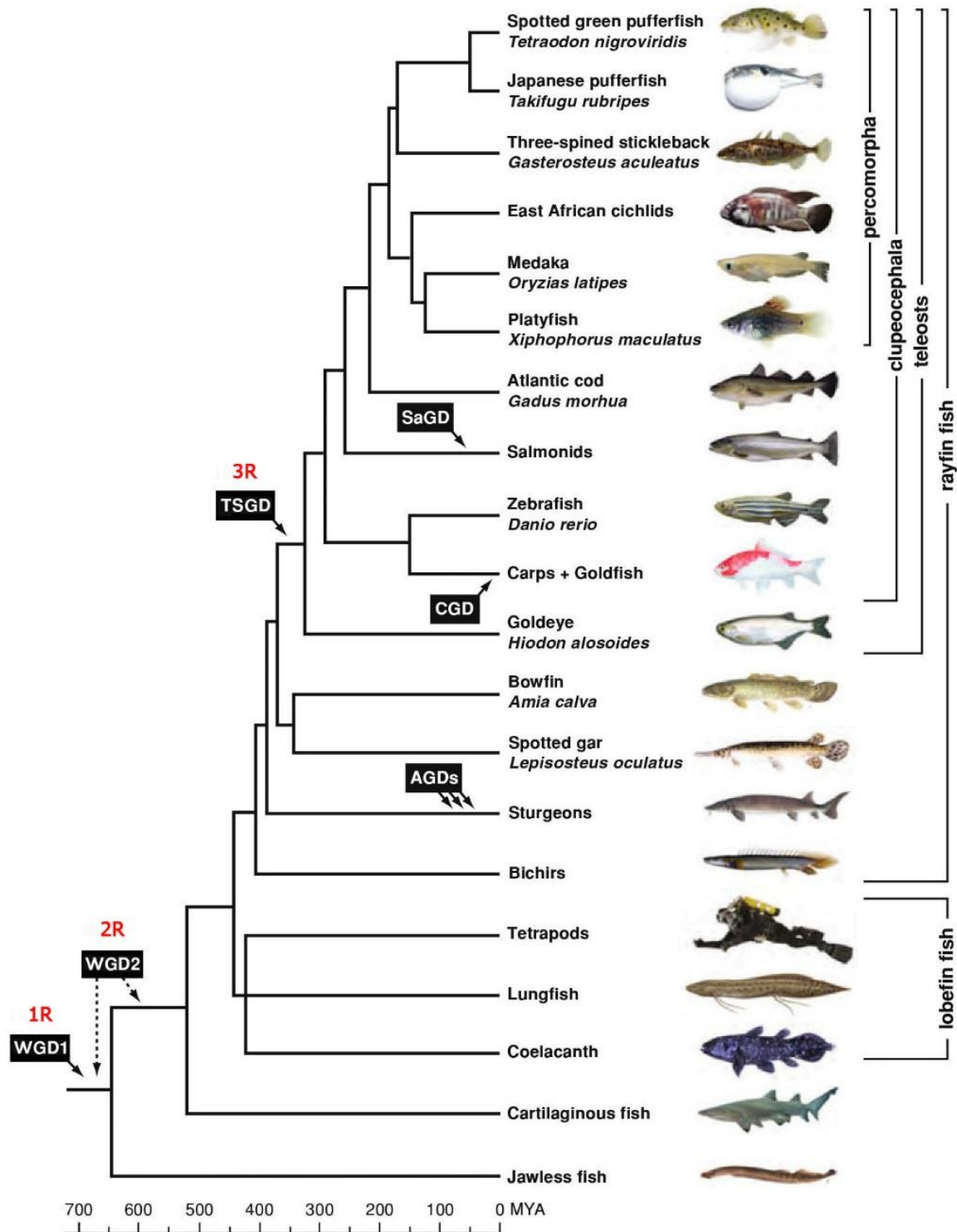
#### **3.5.4. Polyploidizační události v evoluci obratlovců**

Současné modely chromozómové evoluce (Nakatani et al. 2007) předpokládají, že u předchůdců dnešních obratlovců došlo ke dvěma celogenomovým duplikacím (2R neboli „two rounds“ hypotéza) – první z nich u předchůdců dnešních obratlovců a druhá při vzniku čelistnaticů (Gnathostomata) (Ohno 1970, 1999, Panopoulou & Poustka 2005, Volff 2005, Froschauer et al. 2006) (Obr. 5). Mezi důkazy 2R hypotézy patří nálezy paralogních genů v různých genových rodinách (Becak 2014).

V rámci paprskoploutvých ryb nastala ještě třetí WGD (3R hypotéza) u vzniku kostnatých ryb (tj. po jejich divergenci od předků dnešních jeseterů, veslonosů a kostlínů) a to v období asi před 226-350 miliony let (Christoffels et al. 2004, Hoegg et al. 2004, Vandepoele et al. 2004, Inoue et al. 2005, Meyer & Van de Peer 2005, Hurley et al. 2007) (Obr. 5). K této události (nazývané také jako „teleost-specific genome duplication“ TSGD) tedy došlo až po divergenci linie Teleostei od předků dnešních jeseterů a veslonosů (Acipenseriformes), bichirů (Polypteriformes), kaprounů (Amiiformes) a kostlínů (*Lepisosteiformes*) (Birstein et al. 1977, Ludwig et al. 2001, Volff 2005, Froschauer et al. 2006, Crow et al. 2012). Důkazy hovořící pro správnost 3R hypotézy pocházejí z analýzy konzervované syntenie a výsledky potvrdily i sekvenační projekty (přehled viz Glasauer a Neuhaus 2014). Časové zařazení TSGD a skutečnost, že kostnaté ryby tvoří 99 % současné rybí biodiverzity naznačují ohromný potenciál polyploidie jako evolučního mechanismu (Amores et al. 1998, Taylor et al. 2001, Hoegg et al. 2004, Crow et al. 2006, Santini et al. 2009, Inoue et al. 2010). To je patrné i přesto, že dosud bylo zmapováno na genomové či cytogenetické úrovni jen 10 % rybí biodiverzity.

Nicméně je třeba připomenout, že i v rámci Acipenseriformes došlo k určitým specifickým polyploidizačním událostem – jeseteři (Acipenseridae) prodělali svoje vlastní tři specifické WGD (Obr. 5) a veslonosi (Polyodon) jednu nezávislou WGD (Crow et al. 2012). Další celogenomové duplikace se odehrály u kostnatých: Botiidae (Šlechtová et al. 2006), Catostomidae (Uyeno & Smith 1972), Cyprinidae (David et al. 2003, Yang et al. 2015), Salmonidae (MacQueen & Johnston 2014) (Obr. 5) a zjevně i Callichthyidae (Oliveira et al. 1992; Taylor & Oliveira, ústní sdělení P. Rábovi).

Pro úplnost je dobré uvést, že vedle 2R a 3R a událostí u Acipenseriformes dále proběhla celá řada dalších polyploidizačních událostí nezávisle na sobě u různých linií nižších obratlovců tj. vedle ryb ještě zejména u obojživelníků; Mable et al. 2011). U teplokrevných obratlovců jsou případy polyploidie vzácné – např. byla dlouho předpokládána u osmáka pouštního *Tympanoctomys barrerae* (Gallardo et al. 1999, 2004), ale analýza pomocí malovacích sond ukázala, že tomu tak nejspíše není (Svartman et al. 2005) a tento případ bude nepochybně i nadálem předmětem diskuze. U člověka byly výjimečně popsány případy triploidních dětí, které se dožily téměř jednoho roku (Takabachi et al. 2008 a citace zde uvedené).



**Obr. 5:** Systematické členění ryb s časovou osou datující divergence jednotlivých skupin a s vyznačením jednotlivých polyploidizačních událostí. WGD1 a WGD2 – první dvě celogenomové duplikace u zrodu obratlovců; TSGD – celogenomová duplikace specifická pro kostnaté ryby (Teleostei); AGDs – polyploidizační události specifické pro jesetery a lopatonosy (Acipenseriformes); CGD – celogenomová duplikace u kaprovitých; SaGD – celogenomová duplikace u předka dnešních lososovitých (Salmonidae). MYA – million years ago (milióny let v čase nazpět). Upraveno podle Braasch a Postlethwait 2012.

### 3.5.5. Důkazy 3R hypotézy a protokaryotyp obratlovců

Poslední dobou bylo publikováno několik srovnávacích studií zabývajících se analýzou konzervované syntenie mezi obratlovci, jejichž genom byl již sekvenován (Jaillon et al. 2004, Naruse et al. 2004, Woods et al. 2005, Kohn et al. 2006, Nakatani et al. 2007). Na základě srovnání genomů člověka, kura domácího, zebřičky, čtevrzubce *Tetraodon nigroviridis* a medaky byl zrekonstruován pravděpodobný hypotetický karyotyp předchůdce dnešních obratlovců ( $2n = 22$ ), čtvernožců ( $2n = 36$ ) a kostnatých ryb ( $2n = 24$ ) (Kohn et al. 2006). Uvedené hypotetické údaje do značné míry odpovídají skutečným současným poměrům, a jelikož většina dnešních kostnatých ryb má karyotyp s diploidním počtem chromozómů  $2n = 48$ , tak tyto výsledky podporují 3R hypotézu.

### 3.5.6. Výskyt polyploidie u ryb

Různé nezávislé, paralelní polyploidizační události proběhly u řady různých skupin, rodů, druhů nebo populací. Největší počet případů polyploidie u ryb je znám zejména u evolučně bazálních kostnatých ryb a u některých Ostaryophysí (skupina zahrnující Cypriniformes, Characiformes, Siluriormes, Gymnotiformes a Gonorynchiformes). U Ostaryophysí je z polyploidního hlediska nejvýznamější řád Cypriniformes (máloostní), jehož podčeď Cyprininae zahrnuje nejvíce polyploidních druhů v rámci paprskoploutvých ryb vůbec (přes 400) (Amores et al. 1998, Leggatt & Iwama 2003, Taylor et al. 2003, Arai 2011, Yang et al. 2015 Froese & Pauly 2016), obvykle se jedná o tetraploidy (~ 100 chromozómů) nebo hexaploidy (~ 150 chromozómů). Patří sem např. *Barbus* (Chenuil et al. 1999), hybridní polyploidní (3x nebo 4x) komplexy karasů (Takada et al. 2010, Jakovlić & Gui 2011, He et al. 2012, Li et al. 2014, Luo et al. 2014) nebo třeba kapr obecný *Cyprinus carpio*, který má paleotetraploidní původ (Larhammar & Risinger 1994, David et al. 2003) stejně jako ostatní zástupci tribu Cyprinini (Yang et al. 2010, 2015). Velice zajímavým případem je potom druh *Ptychobarbus dipogon*, u něhož bylo napočítáno až 446 chromozómů (Yu & Yu 1990, Cui et al. 1991), což je nejvyšší dosud přirozený známý počet chromozómů u obratlovců. V rámci sesterské linie Leuciscinae je dobré (opět) zmínit hybridní polyploidní komplex jelců *Squalius alburnoides* (Alves et al. 2001). Jako příklady dalších polyploidních Cypriniformes uvedu: peříčkovce *Heteropneustes fossilis* (Siluriformes) (Pandian & Koteeswaran 1999), hybridní polyploidní komplexy sekavců rodu *Cobitis* a piskořů rodu *Misgurnus* (Cobitidae) a tetraploidní linii u sekavek čeledi Botiidae (o nichž bude detailněji pojednáno později) (Šlechtová et al. 2006). Další rybí skupiny s vysokým počtem polyploidních druhů jsou Salmoniformes, Catostomidae a Acipenseriformes (Eschmeyer 2016). Případy polyploidie u evolučně mladších skupin jsou

popsány jen vyjímečně – např. u Perciformes (rod *Channa*) (Legatt & Iwama 2003, Gregory 2005) a Cyprinodontiformes (Schultz 1969). Není však úplně jasné, jestli sledovaný trend distribuce polyploidie u ryb není jen důsledkem nedostatku příslušných dat.

Spontánní polyploidie je v přírodě u ryb velmi častým a široce dokumentovaným jevem (Benfey 1989, Pandian & Koteleswaran 1998, Ráb et al. 2007). Ukázalo se, že rybí genomy jsou natolik plastické a tolerantní k polyploidii, že u nich lze poměrně jednoduchými technikami polyploidii indukovat experimentálně (např. pomocí tepelného nebo tlakového šoku), čehož se dodnes hojně využívá v akvakultuře. Dané polyploidní formy mají široké využití – např. k produkci tržních ryb o vyšší hmotnosti (zejména u pstruha duhového) nebo při vysazování sterilních polyploidů do volných vod (zejména do sportovních rybářských revírů) (Piferrer et al. 2009).

### **3.5.7. Polyploidie, hybridizace a asexuální reprodukce u ryb**

U ryb jsou popsány případy dvou typů asexuální reprodukce – hybridogeneze a zejména gynogeneze. Celkem bylo dosud u nižších obratlovců objeveno více než 80 hybridních komplexů (Alves et al. 2001). Obvyklou indikací při takovém objevu je přítomnost celosamičí populace a nebo přítomnost jedinců různé ploidie na jedné lokalitě (Drozd et al. 2010).

Při gynogenezi samičky produkují diploidní vajíčka, která k nastartování procesu embryogeneze sice potřebují splynutí se samčí spermií, ale nejdojde ke splynutí prvojader (tj. samčí jádro se rozplyne v cytoplazmě vajíčka a jeho genetická informace se nepřenese do potomstva). Potomstvo je následně celosamičí, jedná se o klony matky (Lamatsch & Stöck 2009). Mezi gynogeneticky se rozmnožující ryby patří např. diploidně-polyploidní complex sekavců rodu *Cobitis* (Vasil'ev & Vasil'eva 1982, Vasil'ev et al. 1989, Ráb et al. 2000, Bohlen & Ritterbusch 2000, Bohlen & Ráb 2001, Janko et al. 2007), karasů (*Carassius*) (Ráb et al. 2007, Knytl et al. 2013a) a taky živorodka křížená *Poecilia formosa* (Turner et al. 1980, Lampert et al. 2005).

Hybridogenezí se u ryb rozmnožuje např. komplex ryb rodu *Poeciliopsis* (Schultz 1969, Vrijenhoek 1989) a komplex jelce iberského *Squalius alburnoides* (přehled viz Gromicho & Collares-Pereira et al. 2007). Během hybridogeneze dochází v gametogenezi hybridů k eliminaci jednoho rodičovského genomu a tito jedinci pak v gametách přenášejí pouze genom druhého rodičovského druhu. Hybridní jedinci se pak páří pouze s jedinci rodičovského druhu, jehož genom byl premeioticky eliminován (Lamatsch & Stöck 2009).

V malém procentu případů dojde během procesu asexuální reprodukce ke splynutí prvojader a zvýší se ploidní stupeň u potomka cestou adice genomu (Choleva et al. 2012). V případě, že má hybridní jedinec diploidní genom, stane se při náhodné adici dalšího genomu hybridním triploidem. Byly popsány případy, kdy tyto hybridní polyploidi našli svoji novou ekologickou niku a nakonec populačně převládli nad sexuálně se množící formou. Nakonec, může dojít k adici dalšího genomu (prostřednictvím tzv. “triploidního mostu”) a vznikne potomstvo tetraploidní, které už se může množit opět sexuálně (protože mají sudý počet chromozómových sad ) (Ramsey & Schemske 1998). Může se u nich tak obnovit sexuální reprodukce, s funkční meiózou a probíhající rekombinací a stanou se tak v podstatě biologickými (funkčními) diploidy (Alves et al. 2001, Piferrer et al. 2009, Lamatsch & Stöck 2009, Bogart & Bi 2013, Choleva & Janko 2013, Collares-Pereira et al. 2013, Sternberg & Saura 2013).

### **3.5.8. Cytogenetické metody využitelné pro studium polyploidie**

Existuje celá řada metod, které nám mohou pomoci odhalit původ polyploidie u daného organismu. Velmi často používanou metodou je průtoková cytometrie (Ráb et al. 2007, Flajšhans et al. 2013), dále pak stanovení karyotypu, kvantifikace obarvených jader v buňkách, mikrodenzitometrie a měření velikostí buněk a jader (Flajšhans et al. 2013). Nejmodernější metody jsou již schopné analyzovat genomovou expresi u allopolyploidů za účelem podrobnějšího studia jejich genomové kompozice a evoluce (Duchemin et al. 2015). Z čistě molekulárně-cytogenetických metod je metodou první volby genomová *in situ* hybridizace (GISH) nebo komparativní genomová hybridizace (CGH).

CGH byla původně navržena jako metoda pro detekci rozdílů mezi genomem zdravých a nádorových buněk na cytogenetické úrovni (Kallioniemi et al. 1992). Tato technika byla později přizpůsobena pro studium mezidruhových hybridů a našla široké uplatnění zejména u rostlin (Schwarzacher et al. 1989, Chester et al. 2010). Později byla využita i na detekci pohlavních chromozómů i u ryb (Traut et al. 1999, 2001). Princip metody spočívá v aplikaci odlišně značených celogenomových sond DNA (které náleží buď dvěma parentálním druhům při analýze hybridů, nebo samci a samici při analýze pohlavních chromozómů). Sondy jsou hybridizovány současně na chromozómovém preparátu, což umožňuje detekovat molekulární rozdíly mezi nimi. V případě pohlavních chromozómů bude jedna ze sond nasedat výrazně silněji na nehomologní část nepárového chromozómu. Při analýze genomů hybridů budou diferencially značeny chromozómy rodičovských druhů. Zatímco CGH využívá dvě různě značené celogenomové sondy, varianta GISH pracuje



pouze s jednou. Mechanismus GISH/CGH závisí zejména na přítomnosti genomově-specifických rozptýlených repetitivních sekvencí (především RTEs, satDNA a mikrosatelity), které se obvykle vyvíjejí rychleji než unikátní oblasti genomu (Charlesworth et al. 1994) a díky kterým lze odlišit oba studované genomy (Schwarzacher et al. 1989, Schubert et al. 2001, Kato et al. 2005). Takových sekvencí je zejména v rostlinných genomech velké množství (Schwarzacher et al. 1989). V některých případech (především u taxonů s malými genomy) nemusí být metoda úspěšná anebo jsou rozdílové signály omezeny do oblastí bohatých na repetitivní DNA (Raina a Rani 2001, Lysák a Lexer 2006). I pro takové případy však už byla vyvinuta varianta protokolu GISH/CGH (Jang a Weiss-Schneeweiss 2015).

GISH nebo CGH se obvykle aplikují za použití kompetitivní neboli blokující DNA jednoho z analyzovaných druhů či pohlaví (Traut et al. 1999, 2001), nebo za použití C<sub>0</sub>t-1 DNA (Sealey et al. 1985, Trifonov et al. 2009). Důvodem je nutnost vyvážit (resp. blokovat) zejména vysoce repetitivní tandemové sekvence, které by vlastní hybridizací na chromozómy mohly překrýt specifické signály. Dále je vhodné eliminovat i další společné sekvence DNA. Např. u GISH je značená sonda jednoho genomu blokována kompetitivní DNA připravenou z druhého genomu a tato blokující DNA odejme společné sekvence v hybridizační směsi, a tedy ve výsledku hybridizuje na chromozómy v ideálním případě jen ta frakce sondy, která obsahuje pouze sekvence specifické pro jeden genom. V některých případech mezidruhové GISH (zejména při variantě zvané „komparativní genomová *in situ* hybridizace“, cGISH) se alternativně nepoužívá kompetitivní DNA žádná (She et al. 2012).

Metody CGH i GISH jsou používány např. k detekci pohlavních chromozómů zejména v případech, kdy jsou rozdíly mezi nimi na cytologické úrovni velmi nepatrné, chromozómy jsou příliš malé, počet chromozómů je příliš vysoký nebo nefungují pruhovací metody (Traut et al. 1999, 2001). Tímto přístupem byly objeveny nebo potvrzeny pohlavní chromozómy v rané fázi diferenciacce např. u obojživelníků a plazů (Ezaz et al. 2005, Ezaz et al. 2006, Martinez et al. 2008, Koubová et al. 2014, Altmanová et al. 2016). Ve většině těchto případů by nebylo možné odhalit pohlavní chromozómy běžnými cytogenetickými metodami. U ryb byla podobná analýza provedena u dánia pruhovaného *D. rerio*, platy skvrnitě *X. maculatus* a živorodky duhové *Poecilia reticulata*, kde byly následně lokalizovány pohlavně-specifické oblasti na chromozómech v rámci časné fáze diferenciacce gonozómů (Traut and Winking 2001). Recentně byla metodou CGH rovněž lokalizována samičí specifická oblast na W chromozómu u tetry zvané *Triporthus signatus* (Yano et al., in rev).

Pro účely identifikace parentálních genomů u mezidruhových hybridů, allopolyploidů a nebo při analýze možné mezidruhové introgrese byla metoda GISH/CGH používána zejména u rostlin (Schwarzacher et al. 1989, Jiang & Gill 1994, Kato et al. 2005, Lim et al. 2007, Matoba et al. 2007, Marková & Vyskot 2009). V rámci analyzovaného druhu je dokonce možné rozeznat i tři různé genomy – např. v karyotypu hexaploidní pšenice *Triticum* (Han et al. 2003, 2004, Mahelka et al. 2011, 2013). GISH/CGH ovšem našly uplatnění i při analýze parentálních genomů u hybridních obojživelníků (např. Bi & Boraght 2006, Zálesná et al. 2011), či třeba měkkýšů (Huang et al. 2015). U ryb konkrétně GISH pomohla při identifikaci genomů u allotetraploidních hybridů gynogeneticky se reprodukcující samice karase stříbřitého *Carassius auratus gibelio* (Zhu & Gui 2007, Knytl et al. 2013a), identifikaci genomového složení u hybridních sekavců rodu *Cobitis* (Majtánová et al. 2016a), při analýze hybridního komplexu jelců rodu *Squalius* podčeledi Leuciscinae (Pereira et al. 2013, 2014) a při detekci chromozómové eliminace u mezidruhových hybridů *Oryzias latipes* a *O. hubbsi* (Sakai et al. 2007).

Poslední možností je aplikace mezidruhové GISH pro zmapování distribuce sekvenčně konzervovaných úseků na chromozómech mezi blízce nebo vzdáleně příbuznými druhy – tak jako např. u tilápie *Oreochromis niloticus* (Valente et al. 2009).

GISH a CGH jsou finančně nenáročné metody vhodná pro studium organizace genomu zejména u nemodelových organismů, u kterých většinou dosud nejsou známe celogenomové sekvence.

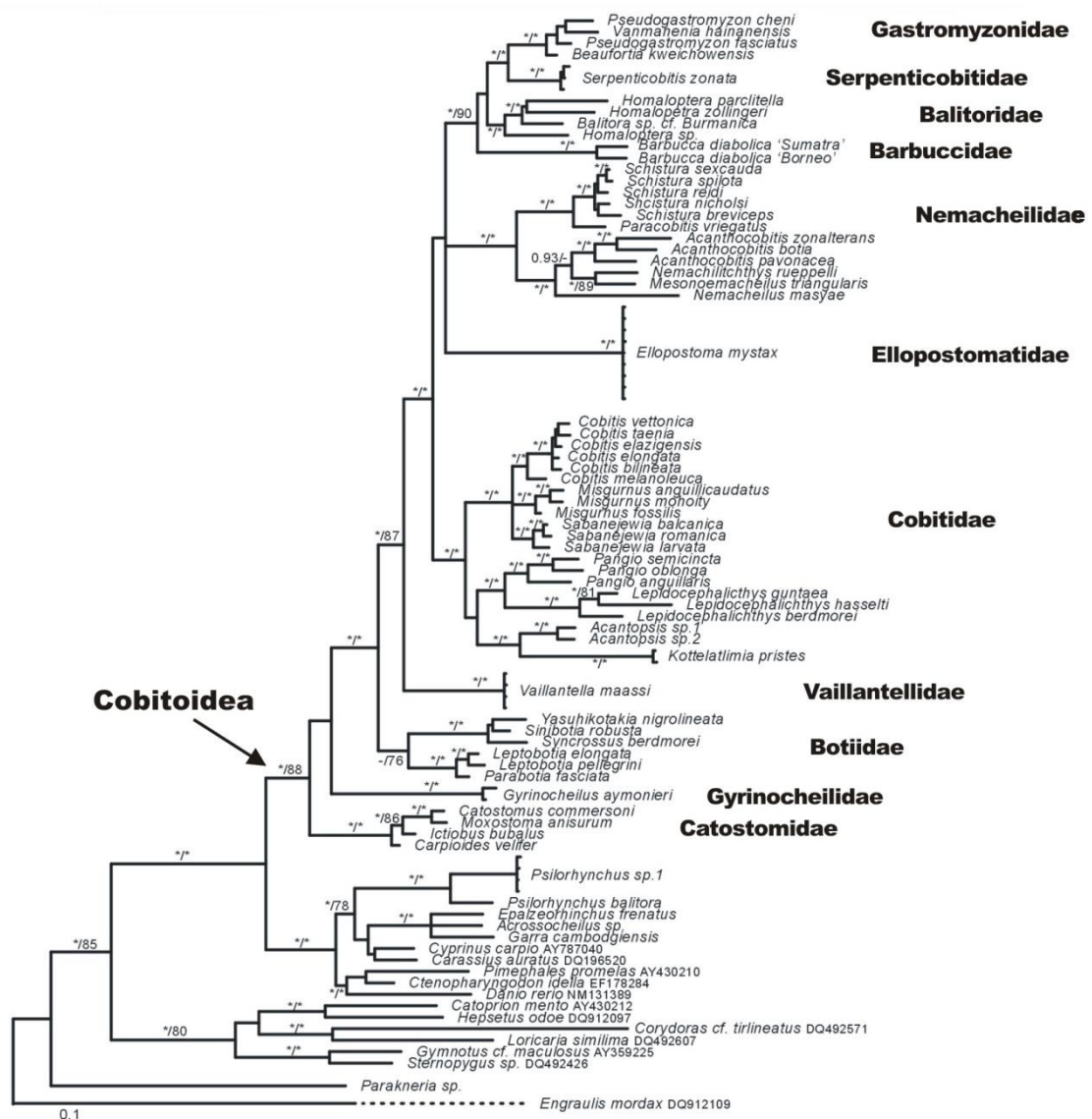
### 3.6. Modelové skupiny ryb zahrnutých v této práci

#### 3.6.1. Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes)

Řád máloostní (Cypriniformes) je z hlediska druhové diverzity největší skupinou sladkovodních ryb na této planetě (Nelson 2006, Mayden et al. 2009, Saitoh et al. 2011). Větví se do dvou hlavních fylogenetických linií – 1) Cyprinoidea zahrnující např. čeleď kaprovitých a 2) Cobitoidea, která sdružuje čeledi sekavcovitých ryb. Cobitoidea se v současnosti člení do deseti čeledí zahrnujících přibližně 1100 druhů, přičemž někdy se jako jedenáctá čeleď počítají Catostomidae, jejichž fylogenetický vztah ke zbytku sekavců však není dosud zcela objasněn (Šlechtová et al. 2007, Kottelat 2012) (Obr.6). Sekavcovité ryby se vyskytují téměř ve všech vodních systémech Eurasie. Jedná se obvykle o drobné bentické ryby, v jejichž evoluci došlo k ohromné diverzifikaci, jež se odráží ve značné diverzitě v morfologii těla a ekologických specializacích. Cytogenetika zástupců Cobitoidea je dosud z velké části neprozkoumaná; dosud byli analyzováni (převážně konvenční cytogenetickou analýzou) jen někteří zástupci čeledí Botiidae, Catostomidae, Cobitidae, Nemacheilidae a Vaillantellidae (Uyeno a Smith 1972, Bohlen et al. 2008, Arai 2011, Kaewmad et al. 2014). Zvláštní pozornost byla dosud soustředěna zejména na zástupce čeledi Cobitidae, kde bylo odhaleno několik polyploidizačních událostí (Saitoh et al. 2010, Arai 2011), jež v některých případech souvisely s přechodem na asexuální způsob reprodukce – v drtivé většině případů na gynogenezi (Vasil'eva & Vasil'ev 1998, Bohlen & Ritterbusch 2000, Bohlen & Ráb 2001), vyjímečně na tzv. meiotickou hybridogenezi (detail viz Morishima et al. 2008).

##### 3.6.1.1. Mřenky (Nemacheilidae)

Mřenky představují nejdiferzifikovanější skupinu sekavcovitých ryb. Zahrnují 46 rodů s 600 popsány druhy (Kottelat 2012). Je to současně i skupina geograficky nejrozšířenější. Zástupce mřenek lze najít takřka ve všech eurasijských vodních tocích od Portugalska po Japonsko a od sibiřských řek po Jávu. Kromě výše uvedeného se mřenky vyznačují i značnou diverzitou morfologickou, distribuční (hojně rozšířené vs. endemité druhy) a diverzitou ve schopnosti kolonizovat širokou škálu vodních habitatů. Někteří zástupci (*Triplophysa stoliczkaya*) byli nalezeni dokonce ve výšce téměř 5200 metrů nad mořem (v Himálajích), což je v rámci ryb rekordní záznam a naopak jedinci druhu *Triplophysa zhaoi* byli nalezeni v jeskyni v Turfanské proláklíně (Xinjiang, Čína), v hloubce 50 m pod mořem, tedy na jednom z nejhloubějších míst v rámci sladkovodních ryb (přehled viz Kottelat 2012).



**Obr. 6:** Systematické členění nadčeledi Cobitoidea a nejbližších sesterských skupin. Upraveno podle Bohlen a Šlechtová 2009 a Kottelat 2012.

### 3.6.1.2. Sekavky (Botiidae)

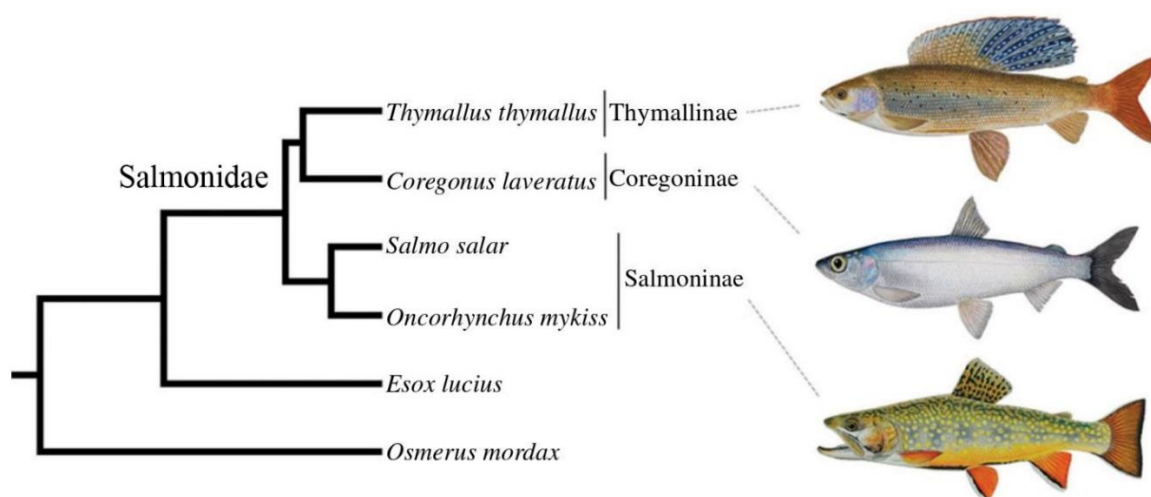
Sekavky čeledi Botiidae obývají asijské toky středně velkých a větších řek od Pakistánu po Japonsko a od Jávy po Rusko. Mezi jejich typické morfologické charakteristiky patří vysunovatelný suborbitální trn (Nalbant 2002). Na rozdíl od ostatních sekavců se nejedná o striktně bentické ryby. Sekavky byly dříve zahrnuty v čeledi Cobitidae, ale později bylo prokázáno, že se jedná o nezávislou vývojovou linii v rámci Cobitoidea (Šlechtová et al. 2007). Na základě rozsáhlé fylogenetické analýzy (Šlechtová et al. 2006) bylo prokázáno,

že se Botiidae člení do dvou podčeledí, z nichž jedna zahrnuje pouze diploidní druhy (Leptobotiinae) a druhá pouze druhy tetraploidní (Botiinae). Obě podčeledi (zahrnující celkem 9 rodů) mají zcela separované oblasti výskytu. Zatímco Leptobotiinae se vyskytují v severních částech Asie, Botiinae obývají jižní a západní oblasti. Pouze v jižní Číně dochází ke kontaktu ryb rodu *Sinibotia* (Botiinae) se sekavkami rodu *Leptobotia* a *Parabotia* (Botiinae). Dosavadní údaje favorizují polyploidizační událost jako hybnou sílu v pozadí separace Botiinae a Leptobotiinae (Šlechtová et al. 2006).

### 3.6.2. Lososovití (Teleostei: Salmoniformes)

Skupinu Salmoniformes tvoří jediná čeleď, Salmonidae, a ta zahrnuje 11 rodů a 70 druhů (Nelson 2006). Patří sem atlantičtí a pacifičtí pstruzi a lososi, siveni, hlavatky a lenci (Salmoninae), síhové (Coregoninae) a lipani (Thymallinae) (Obr. 7). Téměř všechny druhy jsou významné z hlediska akvakultury. Navíc je tato skupina pozoruhodná i z evolučně-genetického hlediska. U předka Salmoniformes totiž došlo k autopolyploidizační události (následně po 3R) zhruba před 88-103 miliony let (Macqueen & Johnston 2014). Vzhledem k tomu, že diploidní předci lososovitých již zcela vyhynuli, je celá čeleď polyploidní (Phillips & Ráb 2001). Důkazem polyploidie budiž dvojnásobná velikost genomů ve srovnání s nejbližší skupinou Esociformes (Phillips a Ráb 2001), setrvávající tvorba tetraivalentů v meióze (Lee & Wright 1981, Oliveira et al. 1995) a pozůstalé genové duplikace (Moghadam et al. 2005, Koop & Davidson 2008). Mapování pomocí BAC FISH odhalilo u lososovitých rozsáhlé syntenní bloky, které zůstaly konzervované po miliony let (Phillips et al. 2006, Berthelot et al. 2014).

Po autotetraploidizaci byl první hypotetický protokaryotyp lososovitých složen ze 100 akrocentrických chromozómů (Phillips & Ráb 2001). V rámci re-diploidizace (která ještě neskončila – viz výše a Sakamoto et al. 2000) došlo postupně k celé řadě chromozómových přestaveb, nejčastěji Rb translokacím, které vedly k diverzifikaci karyotypu a adaptivní radiaci druhů (Phillips & Ráb 2001). Neukončené re-diploidizaci krom jiného nasvědčuje i mezidruhová variabilita v počtu chromozómových ramének u zástupců podčeledí Coregoninae, Salmoninae a Thymallinae (Jankun et al. 2007, Caputo et al. 2009, Ocalewicz a Dobosz 2009, Ocalewicz et al. 2013). Karyotypy lososovitých spadají do dvou charakteristických kategorií. Zatímco v kategorii A se  $2n$  pohybuje kolem 80 chromozómů, kategorii B tvoří zástupci s  $2n$  kolem 60 chromozómů (Phillips & Ráb 2001).



**Obr. 7:** Systematické členění čeledi lososovitých (Salmonidae) a nejbližších sesterských skupin. Upraveno podle MacQueen a Johnston 2014.

### 3.6.3. Jeseteři (Chondrostei: Acipenseriformes)

Jeseteři a veslonosi jsou jednou z nejstarších dosud žijících skupin paprskoploutvých ryb – staří podobně jako bichiři a kostlíni (Sallan 2014). Původ této skupiny ryb se datuje do období jury, tedy do doby přibližně před 200 miliony let (Bemis et al. 1997, Hurley et al. 2007). Patří sem jeseteři a lopatonosi (Acipenseridae; 25 druhů) a dva druhy veslonosů (*Polyodon*) (Bemis et al. 1997). Řada morfologických znaků těchto ryb nese archaické prvky (Roček 2002).

Jeseteři jsou velice žádoucí pro výzkum genetiky a evoluce z celé řady důvodů. Jedním z nich je fakt, že se oddělili od přechůdců dnešních kostnatých ryb ještě před třetí genomovou duplikací (Ohno 1970, Fontana 1994, Bemis et al. 1997, Ludwig et al. 2001). (Cyto)genetické a genomické údaje u této skupiny tak mohou být velice užitečné jako outgroup při objasňování procesů souvisejících s 3R hypotézou. Z cytogenetického hlediska mají jeseteři karyotyp, který u ryb nemá obdoby – je složený z většího počtu mikrochromozómů a menšího počtu makrochromozómů. Jelikož jeseteři prodělali několik následných celogenomových duplikací (viz výše), můžeme u nich odlišit celkem tři ploidní úrovně: paleotetraploidi ( $2n = 4x \sim 120$ ; např. *A. ruthenus*), paleooktaploidi ( $2n = 8x \sim 240$ ; např. *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*) a paleododekaploidi ( $2n = 12x \sim 360$ ; např. *A. brevirostrum*) (Birstein et al. 1997, Havelka et al. 2011, 2016, Fontana 2016). Jeseteři tedy vykazují jedny z největších počtů chromozómů mezi obratlovci. Některé studie založené na cytogenetickém mapování (nejen) 5S a 45S rDNA a na molekulárních analýzách mikrosatelitů ovšem naznačují, že jeseteři se 120 chromozómy by mohli být (minimálně



z funkčního hlediska) diploidi, s 240 chromozómy tetraploidi atd. Výsledky se ovšem nedají vztáhnout na celý genom, a tak dodnes není zcela rozhodnuto, která verze polyploidní série je ta správná. Z cytogenetického hlediska může být pro vyřešení této otázky velmi užitečným nástrojem mapování unikátních sekvencí zaklonovaných v BAC klonech a WCP (Fontana et al. 2007). Pozoruhodný je fakt, že druhy jesterů s různým stupněm ploidie se mohou mezi sebou libovolně křížit (uměle i v přírodě) a vzniklé potomstvo s intermediárním počtem chromozómů je plně fertlní a často vysoce ploidní (Havelka et al. 2011, 2013, 2014, 2016). Hybridní potomstvo je navíc schopné křížit se s rodičovským druhem (Havelka et al. 2011, 2013). Polyploidie u jeseterů se tedy zdá být v tomto světle s vysokou pravděpodobností allopolyploidii, ovšem dosavadní údaje naznačují, že u veslonosů došlo naopak k autopolyploidii (Symonová et al. 2010).



**Obr. 8:** Vybraní zástupci studovaných skupin paprskoploutvých ryb. **A** Acipenseridae; **B-C** Botiidae; **D-F** Nemacheilidae; **G-H** Salmonidae. A) *Acipenser ruthenus*, B) *Chromobotia macracantha*, C) *Sinibotia pulchra*, D) *Nemachilichthys ruppelli*, E) *Schistura pridii*, F) *S. notostigma*, G) *Coregonus albula*, H) *C. fontanae*. A, B, E – [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) (Froese & Pauly 2016); C, D, F – Bohlen J., UŽFG AV ČR; G-H – Schulz a Freyhof 2003.

## **4. Materiál a metody**

### **4.1. Použitý biologický materiál**

V průběhu dizertační práce byly pro cytogenetickou a molekulárně biologickou analýzu zpracovány výhradně ryby zakoupené od zahraničních a tuzemských soukromých chovatelů, chovatelů akvariijních ryb, z rybích farem anebo byly uloveny na konkrétních lokalitách na základě patřičných povolení. Pro izolaci DNA a přípravu chromozómových preparátů byla využita svalová tkáň, krev nebo ocasní ploutev. Lihové preparáty zpracovaných jedinců jsou uloženy ve sbírce Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

### **4.2. Výčet použitých metod**

#### **Konvenční cytogenetika**

Příprava chromozómových preparátů z ploutví a ledvin, barvení Giemsou, C-pruhování, fluorescenční pruhování, detekce nukleolárních organizátorů (NOR) pomocí dusičnanu stříbrného

#### **Molekulární cytogenetika**

Jednobarevná a dvoubarevná FISH, TSA-FISH, PNA-FISH, GISH, CGH

#### **Mikroskopie**

světelná, fluorescenční

#### **Práce s DNA**

izolace, separace, stanovení koncentrace, PCR, neradioaktivní značení (pomocí PCR, nick translace), sonikace, celogenomová amplifikace pomocí WGA kitů

#### **Genové inženýrství**

Klonování genů

#### **Práce se sekvencemi**

BLAST/n, GenBank



## 5. Výsledky

### 5.1. Souhrnný komentář k publikacím zahrnutým do dizertace

Předkládaná dizertační práce se zabývá srovnávací karyotypovou analýzou u paprskoploutvých ryb. Jedná se ovšem o nejdíverzifikovanější skupinu obratlovců, proto jsem svoji pozornost soustředil jen na vybrané skupiny, jejichž charakteristiky jsou nějakým způsobem vhodné pro řešení otázek spjatých s karyotypovou diferenciací/evolucí a jejím vlivem na evoluční a ekologické procesy. Abychom mohli plnohodnotně využít cytogenetická data, ve většině případů předkládané publikace kombinují cytogenetický přístup s dalšími vědeckými disciplínami/přístupy jako je fylogeneze (Sember et al. 2015, Bohlen et al., in rev.), sekvenční analýza repetitivních sekvencí (Symonová et al. 2013b, Sember et al. 2015), umělé produkce hybridů (Symonová et al. 2013a) a morfometrie (Bohlen et al. in rev.).

V první publikaci zařazené do dizertační práce (Sember et al. 2015) se zaměřujeme zejména na podrobnou srovnávací karyotypovou analýzu u mřenek čeledi Nemacheilidae. Důvody, proč jsme si pro dané účely vybrali zrovna tuto skupinu ryb, jsou následující: 1) naše laboratoř se již delší dobu zabývá (na cytogenetické a fylogenetické úrovni) fenoménem asexuální reprodukce u sekavců rodu *Cobitis*, patřící do čeledi Cobitidae, sesterské skupiny mřenek (např. Bohlen & Ritterbusch 2000, Bohlen & Ráb 2001, Janko et al. 2007), 2) vzhledem k charakteristikám popsaným v kapitole 3.6.1.1 jsou Nemacheilidae skupinou vykazující značný potenciál pro ekologickou adaptaci a jsou velmi úspěšní v kolonizaci nejrůznějších habitatů. Cílem publikace Sember et al. 2015 bylo objasnit, jak důležitý vliv měly změny na úrovni karyotypu na evoluční procesy v pozadí ohromné diverzifikace této skupiny sekavcovitých ryb, protože u studovaných sesterských skupin (Cobitidae, Catostomidae a Botiidae) byly vlivem polyploidizace a/nebo přechodem na asexuální mód reprodukce změny na chromozómové a genomové úrovni evidentně podstatným evolučním faktorem (Uyeno & Smith 1972, Ráb et al. 2000, Bohlen & Ritterbusch 2000, Bohlen & Ráb 2001, Šlechtová et al. 2006 a další). Až dosud bylo o mřenkách publikováno jen několik prací, které se zabývají téměř výhradně základním popisem karyotypu (Arai 2011, Gaffaroglu et al. 2012, Kumar et al. 2014, Esmaili et al. 2015), proto zůstávala tato otázka u druhově nejpočetnější čeledi skupiny Cobitoidea dosud nezodpovězena. Naše výsledky ukazují, že ohromná diverzifikace mřenek čeledi Nemacheilidae je spojena se značnou cytogenetickou variabilitou, která je ovšem patrná až na sub-chromozomální úrovni (tj. analýzy distribuce a sekvenčního složení (konstitutivního) heterochromatinu a především na

úrovni mapování tandemových repetitivních sekvencí). Naopak z hlediska 2n se skupina jeví jako převážně konzervativní a homogenní. Analýza fenotypů rDNA – ač fylogeneticky neinformativní – ukázala skrytou variabilitu spojenou s dynamikou repetitivních sekvencí, zejména v případě 5S rDNA, kde je navíc patrná korelace mezi zvýšeným počtem lokusů 5S rDNA a endemizmem.

Publikace Symonová et al. (2013b) se detailně věnuje fenoménu multiplikace lokusů rDNA, který byl stejně jako u mřenek (Sember et al. 2015) pozorován i u síhů podčeledi Coregoninae. Hlavním tématem studie Symonová et al. (2013b) je analýza adaptivní radiace a ekologické speciace v severoněmeckém jezeře Stechlin, vzniklém po poslední době ledové (tj. před 12-15 tisíci lety), na příkladu dvou sympatrických druhů síhů. Síhové (zástupci lososovitých ryb) podstupovali v různých postglaciálních jezerech v Eurasii a Americe opakované cykly ústupů do refúgií a sekundárních kontaktů tak, jak se střídaly doby ledové a meziledové. Důsledkem nejen toho často tvoří v jezerech sympatrické druhové páry nebo jeden ancestrální druh dá vzniknout více novým druhům (např. Vonlanthen et al. 2009). Patří proto mezi vhodné modely adaptivní speciace (Hudson et al. 2011). Síhové jsou rovněž ideálním modelem pro studium časných post-zygotických bariér, protože reprodukční izolace mezi sympatrickými druhy je mnohdy recentní událostí (Bernatchez et al. 2010, Dion-Côté et al. 2014, 2015). Ve studii Symonová et al. (2013b) analyzujeme sympatrický pár síhů tvořený druhy *Coregonus albula* a *C. fontanae*. Zatímco *C. albula* je druh rozšířený i v jiných jezerech, *C. fontanae* je endemit pro jezero Stechlin (Schulz & Freyhof 2003) a liší se zejména svojí neobvykle malou velikostí těla (nejmenší v rámci síhů), obdobím kladení jiker (Schulz & Freyhof 2003) a metabolickou adaptací (Ohlberger et al. 2008). Cílem této publikace bylo analyzovat pomocí molekulárně-cytogenetických metod chromozómové pozadí divergence obou druhů a faktory, které mohly přispět k jejich reprodukční izolaci v jejich sympatrickém (i když ne přímo syntopickém<sup>3</sup>) areálu. Jedná se o první cytogenetický vhled do dané problematiky, která byla u síhů již dříve analyzována na několika desítkách studií zahrnujících data fylogenetická, biogeografická, (populačně) genetická, morfologická nebo eko-fyziologická (např. Østbye et al. 2005, 2006, Landry & Bernatchez 2010, Dalziel et al. 2015, Laporte et al. 2015). Naše výsledky ukazují, že endemitní druh *C. fontanae* má překvapivě vysoký počet (kompletních i nekompletních) lokusů pro 45S rDNA (až 40 signálů), které byly pravděpodobně rozšířeny po genomu procesem transpozice. Domníváme se, že zvýšená aktivita TEs spolu s explozivním

---

<sup>3</sup> Sympatrické druhy se vyskytují ve stejné oblasti, ale nemusí nutně sdílet konkrétní lokalitu. Syntopické druhy sdílejí i stejnou lokalitu.

nárůstem těchto lokusů 45S rDNA mohli způsobit rozdíl v četnosti (zejména nehomologní) rekombinace u obou parentálních druhů a ve svém důsledku napomoci divergenci obou druhů a následné speciaci. Předpokládaná zvýšená aktivita retrotranspozónu *Rex1* mohla být do jisté míry odpovědí na environmentálními stres, který by mohl souviset s nedostatkem potravy v jezeře Stechlin.

Dynamika nikoliv konkrétních vybraných, ale všech genomově-specifických disperzních repetitivních sekvencí byla zkoumána ve třetí studii (Symonová et al. 2013a), která se zaměřila na komparativní analýzu genomu u hybridů jeseterů druhů *Acipenser ruthenus*, *A. baerii* a *A. guldenstaedtii* vyprodukovaných v akvakultuře. Vysoká tolerance jeseterů k hybridizaci představuje v současnosti problémy pro rybolovem značně redukované a kriticky ohrožené přírodní populace, jelikož hybridní jedinci mohou původní druhy v jejich lokalitách i zcela nahradit a tím pádem přispět k jejich vyhubení. Detailnější vhled do mechanismů na úrovni dynamiky genomu umožňujících jeseterům úspěšnou mezidruhovou hybridizaci může napomoci konzervačním strategiím u této ohrožené skupiny ryb. Kombinace výsledků metod GISH a CGH zde odhalila, že genomy rodičovských druhů se na mitotických metafázích hybridního jedince navzájem liší pouze repetitivními sekvencemi, které jsou akumulovány na mikrochromozómech a na některých menších makrochromozómech. Oproti tomu zbylé makrochromozómy nevykazovaly druhově-specifické signály, pravděpodobně tak obsahují spíše unikátní sekvence a obecně oblasti s pomalejší evoluční dynamikou. Je možné, že toto uspořádání a preferenční distribuce genomově-specifických repetitivních sekvencí především na mikrochromozómy hraje nějakou roli ve flexibilitě jeseteřích genomů a v jejich schopnosti mezidruhově se křížit za vzniku fertilního a vysoce ploidního potomstva.

Jelikož druhá a třetí publikace zahrnovala metodu CGH, kterou bylo potřeba v mnoha ohledech pro uvedené rybí skupiny optimalizovat, došlo k vytvoření unikátního protokolu, který byl publikován jako kapitola v recentně vydané knize shrnující současné pokroky v metodách rybí cytogenetiky (Symonová et al. 2015).

V poslední publikaci (Bohlen et al., in rev.) se vracíme k fenoménu polyploidie a k sekavcovitým rybám. V popředí zájmu tohoto výzkumu jsou sekavky čeledi Botiidae, u kterých se předpokládá na základě dostupných dat (Doadrio & Perdices 2005, Šlechtová et al. 2006) polyploidizační událost při separaci dvou hlavních vývojových linií – diploidní podčeledi Leptobotiinae a tetraploidní Botiinae. Zatímco většina zástupců Leptobotiinae a Botiinae se svým areálem v rámci Asie nepřekrývá, na některých vodních tocích v Číně se spolu vyskytují určité druhy *Sinibotia* (Botiinae), *Leptobotia* a *Parabotia* (Leptobotiinae).

Naše studie analyzuje sekavky druhů *Sinibotia pulchra*, '*Botia*' *zebra* (Botiinae) a *Leptobotia guilinensis* (Leptobotiinae), vyskytujících se sympatricky v určitém úseku jihočínské řeky Li. Je pozoruhodné, že ač ostatní kongenerické druhy rodů *Sinibotia* a *Leptobotia* mají značné rozšíření v rámci Asie (včetně *S. pulchra*), druhy '*B.*' *zebra* a *L. guilinensis* jsou endemitem pro danou lokalitu. Pozoruhodná je dále nápadná podobnost zmíněných druhů v řadě diagnostických morfologických znacích. Cílem studie Bohlen et al., in rev. proto bylo analyzovat a posoudit, zda-li druh sekavky '*B.*' *zebra* nevznikl mezidruhovým křížením druhů *L. guilinensis* a *S. pulchra*. Naše analýza kombinovala morfologická, fylogenetická a cytogenetická data. Výsledky fylogenetické a cytogenetické analýzy jsou v rozporu s morfologickými údaji, a tedy s největší pravděpodobností se nejedná o hybrida, nýbrž o druh s výbornou morfologickou adaptací (napodobující diploidní druh *L. guilinensis*) na dané prostředí. S určitou pravděpodobností by se mohlo jednat o mimézii neboli mimikry známou např. u pancéřníčků rodu *Corydoras* (Alexandrou et al. 2011).

## 5.2. Publikace zařazené do dizertace

### Publikace 1 (Sember et al. 2015)

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

IF<sub>2015</sub>: 3,368

**Příspěvek autora:** Příprava a vyhodnocení chromozómových preparátů, sestavení karyotypů, C-pruhování, impregnace stříbrem, fluorescenční pruhování, příprava sond na metodu FISH včetně klonování některých PCR fragmentů, 5S a 28S rDNA FISH, telomerická TSA-FISH, sepsání publikace

### Publikace 2 (Symonová et al. 2013b)

Symonová R, Majtánová Z, Sember A, Staaks GBO, Bohlen J, Freyhof J, Rábová M, Ráb P. 2013. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress - activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evol Biol.* 13:42.

IF<sub>2013</sub>: 3,285

**Příspěvek autora:** experimenty FISH s fragmenty 18S rDNA a retrotranspozónem *Rex1*

### Publikace 3 (Symonová et al. 2013a)

Symonová R, Flajšhans M, Sember A, Havelka M, Gela D, Kořínková T, Rodina M, Rábová M, Ráb P. 2013. Molecular cytogenetics in artificial hybrid and highly polyploid sturgeons: an evolutionary story narrated by repetitive sequences. *Cytogenet Genome Res.* 141:153-162; zvaný článek do Themed Issue: "Molecular Cytogenetics of Fishes."

IF<sub>2013</sub>: 1,839

**Příspěvek autora:** všechny *in situ* experimenty na chromozómech jeseterů zahrnující komparativní genomovou hybridizaci (CGH) a genomovou *in situ* hybridizaci (GISH), vyhodnocení dat

### Publikace 4 (Symonová et al. 2015)

Symonová R, Sember A, Majtánová Z, Ráb P. 2015. Characterization of fish genomes by GISH and CGH. In: *Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts)*,

Eds: Catherine Ozouf-Costaz, Eva Pisano, Fausto Foresti, Lurdes Foresti de Almeida  
Toledo CRC Press, Inc., Enfield, NH 03748, USA.

**Příspěvek autora:** příspěvek k optimalizaci metod GISH a CGH u ryb a spolupráce na textu

**Publikace 5 (Bohlen et al. in rev.)**

Bohlen J, Šlechtová V, Šlechta V, Šlechtová V, **Sember A**, Ráb P. A ploidy difference represents an impassable barrier for hybridisation in animals. Is there an exception among botiid loaches (Teleostei: Botiidae)? PLoS ONE, *in revision* (druhé kolo).

**Příspěvek autora:** příprava a vyhodnocení chromozómových preparátů, sestavení karyotypů

Potvrzuji, že příspěvek Alexandra Sembera k prezentovaným výsledkům v publikacích:

Symonová et al. 2013a, Cytogenet Genome Res,

Symonová et al. 2013b, BMC Evol Biol,

Symonová et al. 2015 (kapitola v knize Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts))

tak, jak je uvedeno v kapitole „Publikace zařazení do dizertace“, je pravda.

Místo a datum:

*Mondsee, 17.2.2016*

.....



I declare that the contribution of Alexandr Sember to the presented results in Bohlen et al., in rev. (PLoS ONE), as stated in „Publications related to Ph.D. Thesis“ chapter, is true.

Místo a datum:

*3.3.2016*  
.....



**Publikace 1 (Sember et al. 2015)**

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

**IF<sub>2015</sub>**: 3,368

**Příspěvek autora:** Příprava a vyhodnocení chromozómových preparátů, sestavení karyotypů, C-pruhování, impregnace stříbrem, fluorescenční pruhování, příprava sond na metodu FISH včetně klonování některých PCR fragmentů, 5S a 28S rDNA FISH, telomerická TSA-FISH, sepsání publikace



RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Karyotype differentiation in 19 species of river loach fishes (Nemacheilidae, Teleostei): extensive variability associated with rDNA and heterochromatin distribution and its phylogenetic and ecological interpretation

Alexandr Sember<sup>1,2\*</sup>, Jörg Bohlen<sup>1</sup>, Vendula Šlechtová<sup>1</sup>, Marie Altmanová<sup>1,3</sup>, Radka Symonová<sup>1,4</sup> and Petr Ráb<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Loaches of the family Nemacheilidae are one of the most speciose elements of Palearctic freshwater ichthyofauna and have undergone rapid ecological adaptations and colonizations. Their cytotaxonomy is largely unexplored; with the impact of cytogenetical changes on this evolutionary diversification still unknown. An extensive cytogenetical survey was performed in 19 nemacheilid species using both conventional (Giemsa staining, C-banding, Ag- and Chromomycin A<sub>3</sub>/DAPI stainings) and molecular (fluorescence in situ hybridization with 5S rDNA, 45S rDNA, and telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> probes) methods. A phylogenetic tree of the analysed specimens was constructed based on one mitochondrial (*cytochrome b*) and two nuclear (*RAG1*, *IRBP*) genes.

**Results:** Seventeen species showed karyotypes composed of 2n = 50 chromosomes but differentiated by fundamental chromosome number (NF = 68–90). *Nemachilichthys ruppelli* (2n = 38) and *Schistura notostigma* (2n = 44–48) displayed reduced 2n with an elevated number of large metacentric chromosomes. Only *Schistura fasciolata* showed morphologically differentiated sex chromosomes with a multiple system of the XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> type. Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>)-fluorescence revealed interspecific heterogeneity in the distribution of GC-rich heterochromatin including its otherwise very rare association with 5S rDNA sites. The 45S rDNA sites were mostly located on a single chromosome pair contrasting markedly with a pattern of two (*Barbatula barbatula*, *Nemacheilus binotatus*, *N. ruppelli*) to 20 sites (*Physoschistura* sp.) of 5S rDNA. The cytogenetic changes did not follow the phylogenetic relationships between the samples. A high number of 5S rDNA sites was present in species with small effective population sizes.

(Continued on next page)

\* Correspondence: alexandr.sember@seznam.cz

<sup>1</sup>Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, Liběchov 277 21, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Sember et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

**Conclusion:** Despite a prevailing conservatism of  $2n$ , Nemacheilidae exhibited a remarkable cytogenetic variability on microstructural level. We suggest an important role for pericentric inversions, tandem and centric fusions in nemacheilid karyotype differentiation. Short repetitive sequences, genetic drift, founder effect, as well as the involvement of transposable elements in the dispersion of ribosomal DNA sites, might also have played a role in evolutionary processes such as reproductive isolation. These remarkable dynamics of their genomes qualify river loaches as a model for the study of the cytogenetic background of major evolutionary processes such as radiation, endemism and colonization of a wide range of habitats.

**Keywords:** Fish cytotaxonomy, Karyotype variability vs.  $2n$  uniformity, FISH, 45S - 5S ribosomal genes, Chromosome banding, Pericentric inversion, Robertsonian translocation, Effective population size

## Background

Cypriniformes, the largest order of freshwater fishes globally, is composed of two highly diverse Palearctic superfamilies – Cyprinoidea and Cobitoidea [1, 2]. Cobitoidea, or “loaches”, are a group of small benthic fishes which are one of the most common elements of Eurasian freshwater ichthyofauna. To date, Cobitoidea includes about 1100 species, currently recognized in ten families [3], and yet only representatives of Cobitidae, Botiidae, Catostomidae and Vaillantellidae have so far been studied cytogenetically. Several cases of highly diverse karyotypes and polyploidy have been discovered in the first three families, although not in Vaillantellidae [4]. The Botiidae family consists of two subfamilies differing in ploidy levels (one diploid and one tetraploid) [5]. In Cobitidae, several independent polyploidization events occurred [6, 7], in some cases after hybridization, leading to an asexual mode of reproduction [8–10]. From these limited data we can see that cytogenetic changes might have played an important role in the evolution of loaches and it remains an open question as to whether this is also true for the remaining cobitoid lineages.

With nearly 600 recognized species in 46 genera [3], Nemacheilidae, or “river loach”, represents the most diverse family of loach fishes, as well as being the most widespread with a distribution area ranging continuously from Portugal to Japan, and from most Siberian rivers to Java [11]. Importantly, river loaches are also very abundant within this enormous distribution area, occurring in virtually all rivers in Europe and Asia. On the other hand, their distribution pattern varies considerably; while some species are geographically very restricted, others are widely distributed, a feature often found even within the same genus, e.g., *Schistura* [3]. Additionally, Nemacheilidae have colonized an unusual variety of habitats including standing swamps, torrential rapids, major rivers, small forest streams, caves and lakes. Their ecological diversity is further illustrated by them being both the highest (above sea level) and the lowest (below ground level) freshwater fish in the world [3]. All these

characteristics make Nemacheilidae a vital model for evolutionary study and our candidate group with which to evaluate the impact of cytogenetic changes on their diversity.

Despite the vast biodiversity within Nemacheilidae, the cytogenetics and cytotaxonomy of this group remain poorly explored. Giemsa-stained chromosomes have been studied in only 24 species [7, 12–14] and banding techniques were performed solely in the single species *Barbatula barbatula* [15] while no molecular cytogenetics had previously been applied. From this limited data, karyotypes of most analysed species display the stable diploid chromosome number  $2n = 50$ , while interspecific karyotype variability in the number of chromosomal arms (Nombre Fundamental, NF) is apparent (see, e.g., [15–17]). In some species, intraspecific variability in  $2n$  and karyotype composition has also been documented [17–20]. Polyploidy has been recorded only in one species *B. 'barbatula'* ( $2n = 3x = 75$ ) [21]. The scarce available data does indicate the extensive but unexplored cytogenetic diversity of nemacheilid loaches.

The aim of this study is to assess cytogenetic variability within the Nemacheilidae family using conventional and molecular chromosome markers and to evaluate these data with regards to the evolutionary processes behind morphological and ecological diversification. A representative sampling of 19 species from eleven genera were used to investigate karyotypes, heterochromatin distribution and chromosomal characteristics of both rDNA classes and (in some cases) the telomeric sequence motif  $(TTAGGG)_n$ . All cytogenetic characteristics were mapped onto a phylogenetic tree based on molecular analyses of one mitochondrial and two nuclear genes.

## Methods

### Animals

Fifty-two individuals belonging to 19 different nemacheilid species were analysed (Table 1). Their distribution areas are specified in Fig. 1 and references for taxonomic identification are given in Additional file 1: Supplementary Methods 1. All analysed specimens were obtained from



**Table 1** Species under study, their sex, origin and geographical distribution

Species	Individuals	Source (country, province, river basin)	Distribution
<i>Barbatula barbatula</i> (Linnaeus, 1758)	3	Czech Republic, Středočeský kraj, Elbe	widespread (Europe, Asia)
<i>Lefua costata</i> (Kessler, 1876)	2♀	Republic of Korea, Gangwon, Geojin	widespread (Korea, China)
<i>Mesonoemacheilus guentheri</i> (Day, 1867)	1♂, 1♀	Ornamental fish trade	moderately widespread (southern India)
<i>Nemacheilus binotatus</i> (Smith, 1933)	1♂, 1♀	Ornamental fish trade	moderately widespread (Thailand)
<i>Nemachilichthys ruppelli</i> (Sykes, 1839)	1♂, 1♀	Ornamental fish trade	moderately widespread (southern India)
<i>Paracanthocobitis pictilis</i> (Kottelat, 2012)	2♀	Ornamental fish trade	endemic to Ataran river (Myanmar)
<i>Paracanthocobitis zonalternans</i> (Blyth, 1860)	1♂, 1♀	Myanmar, no details known	widespread (Bangladesh to Malaysia)
<i>Petruichthys brevis</i> (Boulenger, 1893)	1♂, 1♀ + 1	Ornamental fish trade	endemic to Inle Lake (Myanmar)
<i>Physoschistura elongata</i> (Sen & Nalbant, in Singh, Sen, Bănărescu & Nalbant, 1982)	2	Ornamental fish trade	endemic to Shilling county (northeast India)
<i>Physoschistura</i> sp.	2	Myanmar, Shan, Salween	endemic to surrounding of Inle Lake (Myanmar)
<i>Pteronemacheilus lucidorsum</i> (Bohlen & Šlechtová, 2011)	1♂, 1♀	Myanmar, Shan, Irrawaddy	endemic to upper Myitnge river basin (Myanmar)
<i>Schistura bolavenensis</i> (Kottelat, 2000)	3	Laos: Champasak, Mekong	moderately spread (Bolaven plateau, Laos)
<i>Schistura corica</i> (Hamilton, 1822)	1♂, 3♀	Ornamental fish trade	widespread (northern India, Bangladesh)
<i>Schistura fasciolata</i> (Nichols and Pope, 1927)	2♂, 1♀	Ornamental fish trade	widespread (southern China and northern Vietnam)
<i>Schistura hypsiura</i> (Bohlen, Šlechtová & Udomritthiruj, 2014)	1♂, 1♀ + 3	Ornamental fish trade	endemic to southern Rakhine state (Myanmar)
<i>Schistura notostigma</i> (Bleeker, 1863)	6	Ornamental fish trade	endemic (Sri Lanka)
<i>Schistura pridii</i> (Vidthayanon, 2003)	2	Ornamental fish trade	local endemic (northern Thailand)
<i>Schistura savona</i> (Hamilton, 1822)	3	Ornamental fish trade	widespread (northern India, Bangladesh)
<i>Seminemacheilus lendlii</i> (Hankó, 1924)	1♂, 1♀	Turkey, Anatolia, no details known	endemic to southeast Anatolia (Turkey)

ornamental fish trade, from a commercial fish farm or from private aquarium fish breeders. All experimental procedures involving fishes were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the IAPG AS CR, according with directives from the State Veterinary Administration of the Czech Republic, permit number 217/2010, and by permit number CZ 02386 from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. Voucher specimens are deposited to the fish collection of the Laboratory of Fish Genetics, IAPG, CAS, Liběchov.

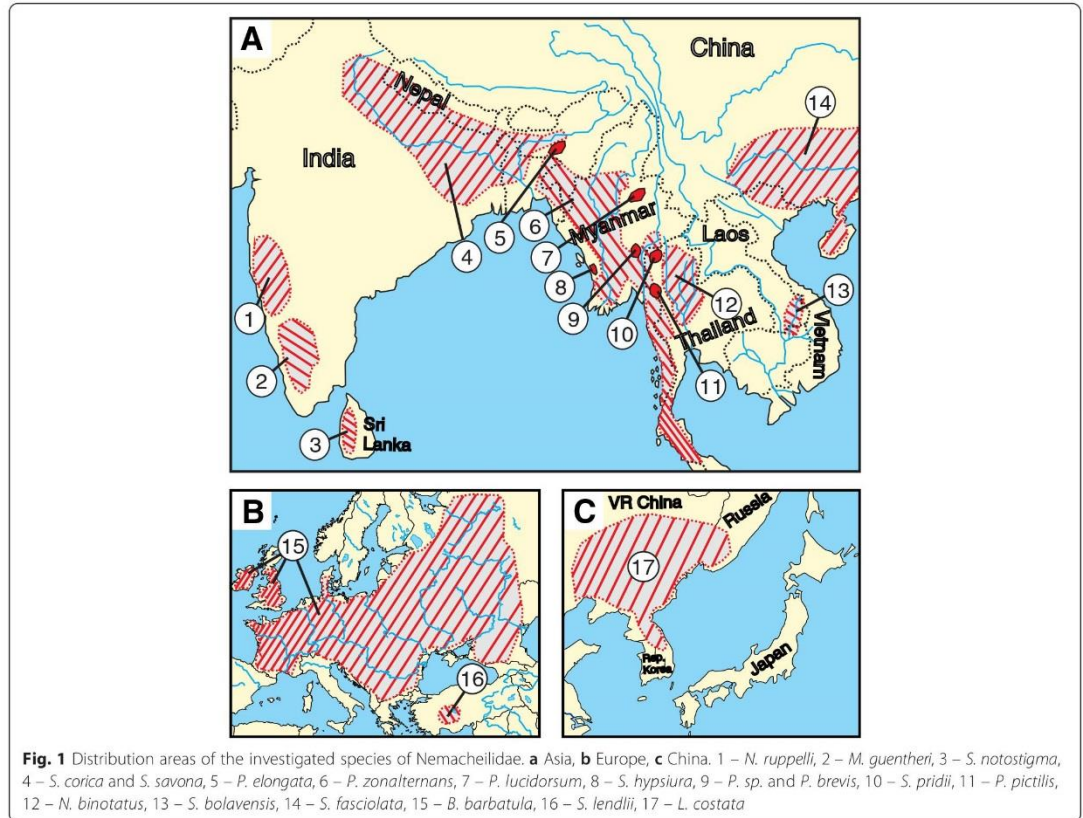
#### Chromosome preparation and analysis of constitutive heterochromatin

Mitotic chromosomes were obtained from regenerating fin tissue by the technique described by Völker et al. [22] and Völker and Ráb [23], with slight modifications (see Additional file 1: Supplementary Methods 2). For conventional cytogenetic analysis, chromosomes were stained with 5 % Giemsa solution (pH 6.8) (Merck, Darmstadt, Germany). Selected slides were destained in methanol:acetic acid fixation (see above) and re-used for the other techniques. For fluorescence in situ hybridization (FISH), slides were dehydrated in an ethanol series (70, 80 and 96 %, 3 min each) and

stored in a freezer (−20 °C). Visualization of the constitutive heterochromatin was done by C-banding according to Haaf and Schmid [24] using 4',6-diamidino-2-phenolindole (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) counterstaining. Fluorescence staining was performed sequentially or in separate experiments by GC-specific fluorochrome Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich) [25] and AT-specific fluorochrome DAPI (Sigma-Aldrich) [26], following Mayr et al. [27] and Sola et al. [28]. In *P. elongata*, a silver staining technique was employed according to Howell and Black [29]. At least ten metaphases per specimen were analysed, in some cases sequentially. In a few cases, metaphases with incomplete 2n were selected (see Figs. 6i and 7a; Additional file 2: Figure S1K), but were sufficient enough to present the required features. Chromosome morphology was classified according to Levan et al. [30], but modified as m – metacentric, sm – submetacentric, st – subtelocentric, a – acrocentric, where st and a chromosomes were scored as unarmmed, together in one category.

#### DNA isolation and probe preparation

Whole genomic DNA was extracted from fin tissue using the conventional phenol-chloroform-isoamylalcohol method [31] using PhaseLock Eppendorf tubes (5PRIME,



Gaithersburg, USA) to prevent protein contamination, or the Qiagen DNAeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). rDNA fragments were obtained by polymerase chain reaction (PCR) using previously described primers (see Additional file 3: Table S1; for PCR conditions see Additional file 1: Supplementary Methods 3). The resulting PCR products were purified using QIAquick PCR purification Kit (Qiagen), with multiple bands being electrophoresed in 0.8 % agarose gels and purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). DNA fragments were cloned to pDrive Cloning Vector (Qiagen) and transformed into QIAGEN EZ Competent Cells (Qiagen). Selected recombinant plasmids were isolated by QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) and sequenced in both strands by MacroGen (South Korea, Netherlands). Chromatograms of obtained sequences were verified and assembled using SeqMan Pro 10.1.2 (LaserGene, DNASTAR, Madison, WI.). The resulting consensus sequences were confirmed using NCBI BLAST/N analysis [32] and selected clones used to construct FISH probes.

Probes were labelled by PCR with biotin-16-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) or digoxigenin-11-dUTP (Roche). For each slide 200 ng of 5S rDNA, 200 ng of 45S rDNA and 25 µg of sonicated salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich) were added and the resulting probe precipitated in 96 % ethanol, washed in 70 % ethanol, air-dried and re-dissolved in hybridization buffer (50 % formamide, 10 % dextran sulphate, 2× SSC, 0.04 M NaPO<sub>4</sub> buffer, 0.1 % SDS, Denhardt reagents, see [33]) to give a final concentration of 25 ng/µl for each rDNA probe.

For telomeric FISH, non-templated PCR with primers (TTAGGG)<sub>5</sub> and (CCCTAA)<sub>5</sub> was carried out according to Ijdo et al. [34]. The amplified product was labelled using Nick Translation Mix (Abbot Molecular, Illinois, USA) with biotin-16-dUTP, taking 3–4 h to reach optimal probe size (100–500 bp).

#### FISH analysis

FISH was carried out according to Cremer et al. [35] with several modifications. Briefly, dehydration in an



ethanol series (70, 80 and 96 %, 3 min each) was followed by thermal aging for 1–2 h at 37 °C and 30 min at 60 °C. Prior to hybridization, the chromosomes were treated with RNase A (200 µg/ml in 2× SSC) (Sigma-Aldrich) for 90 min at 37 °C in a humid chamber and digested with pepsin (50 µg/ml in 10 mM HCl, 3 min, 37 °C). Slides were subsequently denatured in 75 % formamide (pH 7.0) (Sigma-Aldrich) in 2× SSC at 74 °C for 3 min, and then immediately cooled and dehydrated in 70 % (cold), 80 % and 96 % (RT) ethanol. The hybridization mixture was denatured at 86 °C for 6 min and immediately chilled on ice for 10 min. 10–20 µl of probe mixture was applied to a denatured slide and hybridization was performed overnight at 37 °C in a dark humid chamber. Post-hybridization washes were done twice in 50 % formamide in 2× SSC (pH 7.0) at 42 °C for 5 min and three times in 1× SSC at 42 °C (7 min each) before equilibration washing in 2× SSC at RT for 20 s. Prior to probe detection 500 µl of 3 % BSA (Vector Labs, Burlington, Canada) in 4× SSC in 0.01 % Tween 20 was dropped onto the slide (at 37 °C for 20 min) as a blocking treatment. Probes were detected by Anti-Digoxigenin-Rhodamine (Roche) and Streptavidin-FITC (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, USA) along with Anti-Digoxigenin-Fluorescein (Roche) and Streptavidin-Cy3 (Invitrogen Life Technologies) to exclude any artificial results (influenced e.g., by the type of applied antibody). Experiments with altered labelling (biotin for 45S and digoxigenin for 5S rDNA) were included to verify the observed patterns. All rDNA FISH pictures presented here are pseudocoloured in red for the 45S rDNA probe and in green for the 5S rDNA.

The slides were incubated with antibodies at 37 °C for 60 min in a dark humid chamber, washed four times (7 min each) in 4× SSC in 0.01 % Tween (pH 7.0) at 42 °C and the chromosomes then counterstained with DAPI in mounting medium (Cambio, Cambridge, United Kingdom), covered and sealed with a coverslip.

To enhance telomeric FISH signals, tyramid signal amplification (TSA) was performed using a kit with tyramide conjugated with Alexa 488 fluorochrome (Invitrogen Life Technologies).

After image processing FISH slides selected for fluorescence banding and/or C-banding were washed in 4× SSC in 0.01 % Tween (pH 7.0) and dehydrated in an ethanol series.

#### Microscopy and image analysis

Giemsa-stained chromosomes and FISH images were inspected using a Provis AX70 Olympus microscope with a standard fluorescence filter set. FISH images were captured under immersion objective 100× with a black and white CCD camera (DP30W Olympus) for each fluorescent dye using Olympus Acquisition Software.

The digital images were then pseudocoloured (blue for DAPI, red for Rhodamine or Cy3, green for FITC or Alexa488) and superimposed with MicroImage software (Olympus, version 4.0). FISH karyotype images were optimized and arranged using Adobe Photoshop, version CS6. Karyotypes from Giemsa-stained and C-banded images were arranged in IKAROS (Metasystems) software.

#### Phylogenetic analyses

Phylogenetic hypothesis was based on the analyses of three molecular markers: mitochondrial *cytochrome b* (*cyt b*), *recombination-activating gene 1* (*RAG1*) and *interphotoreceptor retinoid-binding protein* (*IRBP*). The primers and PCR reaction protocols for *cyt b* and *RAG1* followed Šlechtová et al. [5, 36], and Chen et al. [37] for the *IRBP* amplification (for details, see Additional file 1: Supplementary Methods 4). The same sets of PCR primers were used for sequencing (summarized for all genes in Additional file 3: Table S1). All three genes were sequenced for each of the 39 analysed specimens of Nemacheilidae.

Chromatograms were edited and assembled using SeqMan Pro 10.1.2 (LaserGene, DNASTAR). The sequences were aligned in BioEdit 7.0.5.3 [38] and evaluated based on their amino acid translation.

Prior to the phylogenetic analyses, the congruence among the three gene partitions was assessed using the incongruence length difference (ILD) test [39] with 1000 replication as implemented in PAUP 4.0b10 [40]. Since the test did not reveal any significant conflict (see the Results), all three datasets could be concatenated into a single matrix.

Alignments of all three genes were concatenated into a single 2998 bp dataset (1124 bp of *cyt b*, 974 bp of *RAG1* and 900 bp of *IRBP*) and 40 individuals (39 Nemacheilidae plus 1 outgroup). All sequences but one (*cyt b* sequence of *Botia lohachata*) are original data and were deposited in GenBank [41] under the accession numbers [KP738491 - KP738609] (see Additional file 4: Table S2).

Phylogenetic analysis of the concatenated dataset was performed using the partitioned Bayesian inference in MrBayes 3.2.2 [42]. The dataset was partitioned by genes and codon positions, involving in total nine partitions. The analysis was set to six Metropolis Coupled Markov Chains Monte Carlo (MCMCMC) with default heating conditions, searching the tree space for 5 million generations under the GTR + G + I settings for each partition, in two runs, starting with random trees and a sampling frequency of each 100 generations. The log-likelihood score distribution was examined to determine the burn-in values. The first 1000 trees were discarded as burn-in and the remaining

ones were used to build a 50 % majority rule consensus tree and statistical support of clades was assessed by posterior probabilities.

## Results

### Sequence analysis of *RAG1*, *IRBP* and *cyt b*

The *RAG1*, *cytochrome b* and *IRBP* datasets consisted of 974 (30 % of variable positions), 1124 (44 % v.p.) and 900 bp (35 % v.p.), respectively. The ILD test did not reject the null hypothesis about the homogeneity of any of the analysed datasets:  $P = 0.94$  for *RAG1* vs. *cyt b*,  $P = 0.71$  for *cyt b* vs. *IRBP* and  $P = 0.14$  for *RAG1* vs. *IRBP*. Therefore the data were concatenated into a single dataset for the further analysis, altogether providing a dataset of 2998 bp.

In the final phylogeny all analysed species were identified as monophyletic and well-separated lineages. The topology shows a prominent basal split into one major clade that contains *Nemacheilus binotatus* from northern Thailand plus all samples from Myanmar, India, Sri Lanka and Turkey and a second major clade that is composed from all samples from China, Laos, Europe and Korea. Within the first major clade, four subclades are visible: the first containing *N. binotatus*, the second *Schistura savona* and both species of *Paracanthocobitis*, the third solely *Nemachilichthys ruppelli* and the fourth containing all remaining samples from the genera *Mesonoemacheilus*, *Schistura*, *Physoschistura*, *Seminemacheilus*, *Pteronemacheilus* and *Petruichthys*. Within the second major clade, three subclades are visible: the first containing *Lefua costata* from Korea, the second *B. barbatula* from Europe and the third with two species of *Schistura* from Laos and China.

### Sequence analysis of 5S and 28S rDNA

PCR amplification of 28S rDNA resulted consistently in a fragment 300 bp in size, containing partial sequence of 28S rRNA coding region. Sequences for *P. elongata*, *S. bolavenensis*, *S. corica*, *S. fasciolata* as well as for *Botia almorhae* (from related family Botiidae) were deposited in GenBank [41] (see Additional file 5: Table S3). For 5S rDNA, a high degree of variability, both in length as well as in number of putative 5S rDNA fragments was observed among the analysed species, so sequenced fragments from *Esox lucius* (300 bp) and *B. almorhae* (500 bp) were used for constructing the FISH probe. The sequence of 5S rDNA fragment from *E. lucius* was verified in GenBank [EF514228]. The sequence of 5S rDNA from *B. almorhae* (deposited in GenBank; see Additional file 5: Table S3) contained a partial sequence of the 5S rDNA coding region (83 bp) and a putative NTS (non-transcribed spacer). For detailed analysis of nemacheilid 5S rDNA, we selected 200 and 600 bp PCR fragments from two specimens of *S. priddii*. Thirteen

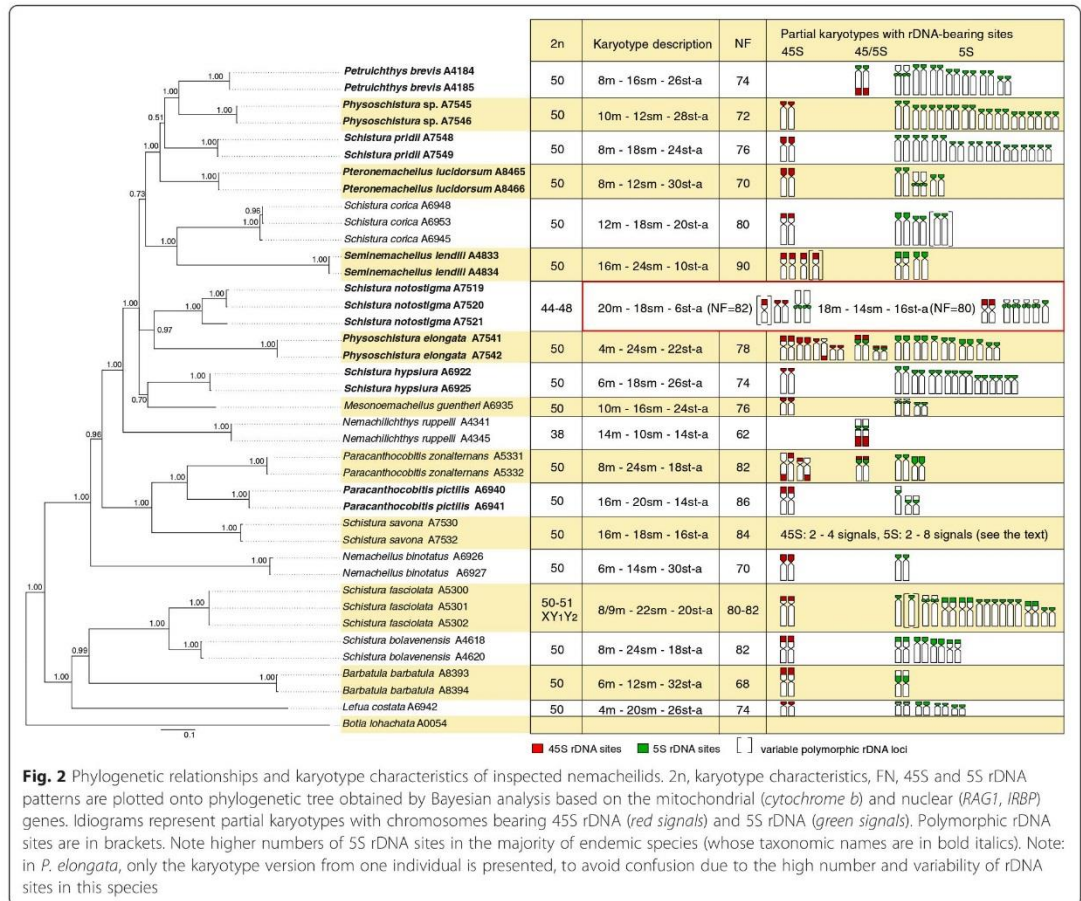
clones were sequenced and verified in BLAST/N and also searched against the Repbase database at the Genetic Information Research Institute (GIRI) [43] for the presence of transposable elements (TEs) or other repetitive sequences. Indeed, each cloned sequence contained - next to the 71 bp of the 5S rRNA gene coding region - a putative NTS (85 bp or 475 bp) containing a fragment (54 bp) of L1-2\_DR non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposon (RTE) at the 3' end (Additional file 6: Figure S2). The differences between both PCR fragments were thus in the length of the putative NTS and in the distance of the RTE fragment from the 5S rRNA coding region. No such association between TEs and rDNA loci was observed in the 5S rDNA of *B. almorhae* or in the 28S rDNA fragments characterized in this study.

### Cytogenetic characteristics

Figure 2 summarizes 2n, karyotype structure, NF and rDNA phenotypes (i.e., number and position of both major and minor rDNA sites) within the phylogenetic tree context analysis. Seventeen out of 19 species displayed karyotypes with uniform 2n = 50, but with a marked variability in NF values (68–90) (Figs. 2, 3 and 5; Additional file 7: Figure S3). In the remaining two species, karyotypes with reduced 2n were observed: *N. ruppelli* (2n = 38) (Fig. 4a), *S. notostigma* (2n = 44 or 48) (Additional file 8: Figure S4A, C, E). Two different karyomorphs occurred in examined individuals of the latter species – with 2n = 44 (five individuals, Additional file 8: Figure S4A, C) and with 2n = 48 (a single individual, Additional file 8: Figure S4E). Karyotypes of both species exhibited a significantly higher number of large m chromosomes compared to karyotypes with 2n = 50. Except for the large m chromosomes in *N. ruppelli* (six pairs) and *S. notostigma* (one or two pairs), karyotypes in all other species were composed of comparatively small chromosomes, gradually decreasing in size. Very tiny chromosomes were observed in *L. costata*, *P. pictilis*, *P. zonalternans*, *S. hypsiura* and *S. savona*. Centromere positions often gradually differed making it difficult to establish strict borderlines between formal chromosomal categories.

In almost all species no intraspecific numerical or structural polymorphisms between males and females that might indicate the presence of sex chromosomes were detected, although only females were examined in *L. costata* and *P. pictilis* and unsexed specimens in 7 other species – see Table 1. However, in *S. fasciolata*, males exhibited 2n = 51 chromosomes with a karyotype composed of (9 m + 20sm + 22st-a) while a female presented a 2n = 50 (8 m + 20sm + 22st-a), suggesting the presence of a multiple XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system (Fig. 5a, c).



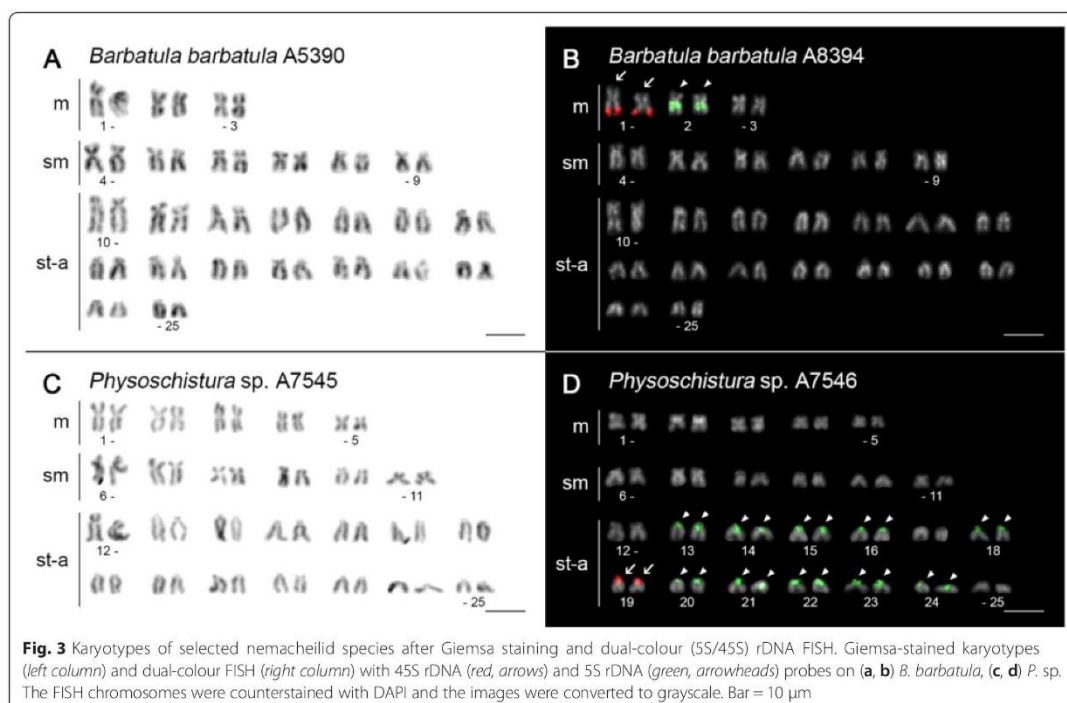


**Fig. 2** Phylogenetic relationships and karyotype characteristics of inspected nemacheilids. 2n, karyotype characteristics, FN, 45S and 5S rDNA patterns are plotted onto phylogenetic tree obtained by Bayesian analysis based on the mitochondrial (*cytochrome b*) and nuclear (*RAG1*, *IRBP*) genes. Idiograms represent partial karyotypes with chromosomes bearing 45S rDNA (red signals) and 5S rDNA (green signals). Polymorphic rDNA sites are in brackets. Note higher numbers of 5S rDNA sites in the majority of endemic species (whose taxonomic names are in bold italics). Note: in *P. elongata*, only the karyotype version from one individual is presented, to avoid confusion due to the high number and variability of rDNA sites in this species

**Heterochromatin distribution and composition**

The distribution of constitutive heterochromatin was studied by CDD (CMA<sub>3</sub>/DAPI) banding in all species and C-banding in a subset of 10 species (Additional file 9: Table S4). The C-banding and DAPI patterns were usually congruent with the exceptions observed in *N. ruppelli* and *S. bolavenensis*, where also some CMA<sub>3</sub>-positive (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>) regions (NOR-associated) were slightly positively heteropycnotic after C-banding at the same time (Fig. 4c; Additional file 2: Figure S1L). In the remaining species, the CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> regions did not match the C-bands. With the exception of *N. ruppelli* and *S. lendlii* (Fig. 4c; Additional file 2: Figure S1Q) all other species displayed generally low or moderate levels of AT-rich C-heterochromatin. In almost all species, its predominant location was in the pericentromeric regions of some or all chromosomes, except for *S. corica*, where only a few interstitial bands and two whole-arm

heterochromatic regions (p-arms, sm) were apparent (Additional file 2: Figure S1M). In one or more chromosomal pairs of m-sm type in *M. guentheri*, *P. sp.*, *S. bolavenensis*, *S. hypsiura* and *S. lendlii* (Additional file 2: Figure S1D, I, L, N, Q) the heterochromatin encompasses a substantial part or even the entire arm of the chromosome. These regions were adjacent to 5S or 45S rDNA only in *S. bolavenensis*, *S. corica* and *S. lendlii*. Few heterochromatic p-arms of st-a chromosomes were observed in *L. costata*, *M. guentheri*, *N. ruppelli*, *P. zonalternans* and *S. pridi* (Fig. 4c, Additional file 2: Figure S1B, C, D, G, O). Huge heterochromatic regions were found flanking the primary constrictions of m chromosomes in *N. ruppelli* (six pairs, Fig. 4c), *S. notostigma* (one or two pairs, Additional file 8: Figure S4C), *S. savona* (one pair, Additional file 2: Figure S1P) as well as in one (male) or two (female) st chromosomes in *S. fasciolata* (Fig. 5d). In the latter species, compared to Giemsa-stained karyotypes,



this heterochromatic region was confined to the st chromosome present on one homologue in males and on both homologues in females. Also noticeable was the C-heterochromatic block on the male-specific single large m chromosome. Furthermore, intercalar DAPI-positive bands were clearly visible after C- or CDD banding in a subset of sm/st chromosomes (from one to four pairs) in *B. barbatula*, *N. ruppelli*, *N. binotatus*, *S. bolavenensis*, *S. corica* and *S. notostigma*, often appearing as dot-like sites located proximally on the q arms. Finally, a polymorphic AT-rich p-arm was observed in one homologue of pair 18 in *M. guentheri*, but only in the male karyotype (Additional file 7: Figure S3D).

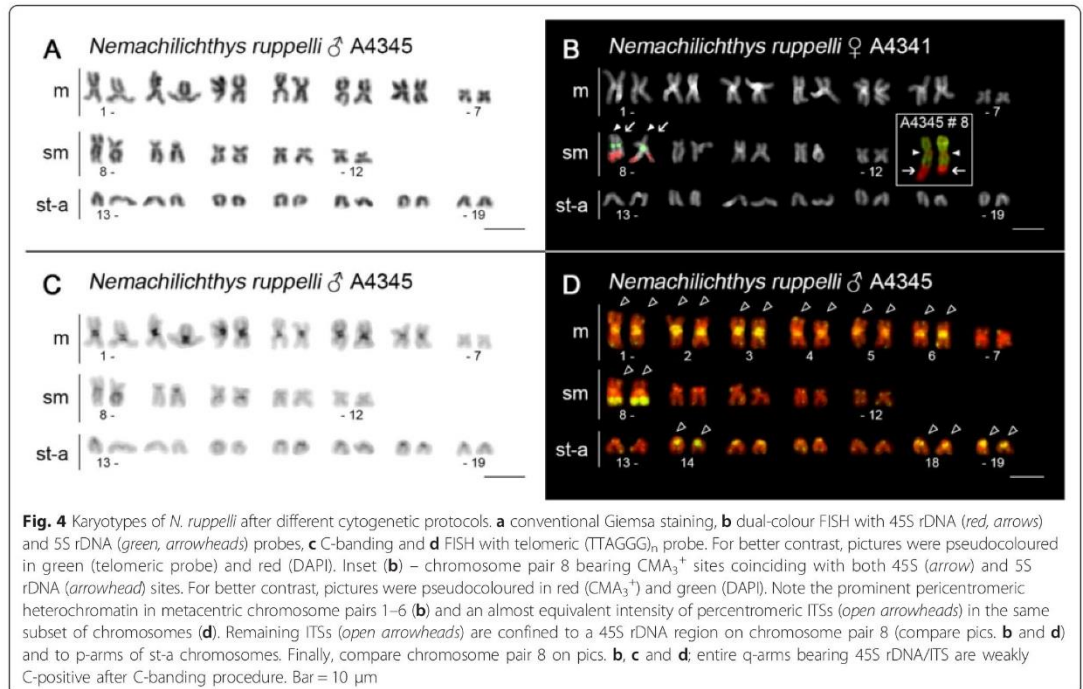
CMA<sub>3</sub> labelled only GC-rich regions associated exclusively with NORs in seven species (*L. costata*, *P. brevis*, *P. sp.*, *S. fasciolata*, *S. pridi*, *S. savona* and *S. lendlii*), but also with 5S rDNA regions in seven other nemacheilids (Additional file 9: Table S4). More specifically, species with only some 5S rDNA sites being CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (e.g., *M. guentheri*, *P. zonalternans*, *P. elongata*) (Fig. 6b, g; Additional file 10: Figure S5B) and others with all of them (e.g., *B. barbatula*, *N. ruppelli*, *S. notostigma*) (Figs. 4b and 6a, i). In six out of seven species, we observed the 5S rDNA/CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> pattern directly by sequential application of CDD banding and rDNA FISH (Fig. 6b, g-i). In *S. corica* (Fig. 6f), however, a similar

conclusion was based on observation of remarkably high number of CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> sites and their distribution in centromeres and chromosomal p-arms, similarly to 5S rDNA sites. In *P. pictilis*, *P. lucidorsum* and *S. hypsiura*, association of CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> and 5S rDNA sites was inconclusive (Fig. 6d; Additional file 10: Figure S5D, F). In *N. binotatus* and *S. bolavenensis*, CMA<sub>3</sub> labelled NORs and some other regions non-related to 5S rDNA (Fig. 6c, h). A more complicated pattern was observed in *P. elongata* (with a subset of CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> 5S rDNAs and additional CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> regions) and *S. notostigma* (where all 5S rDNAs were CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> and other CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> regions also appeared) (Fig. 6g, i; Additional file 10: Figure S5G). Finally, *S. corica* displayed an extensive dispersal of CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> regions with locations in all centromeres, some p-arms and along the single pair of NOR (Fig. 6f).

#### rDNA phenotypes

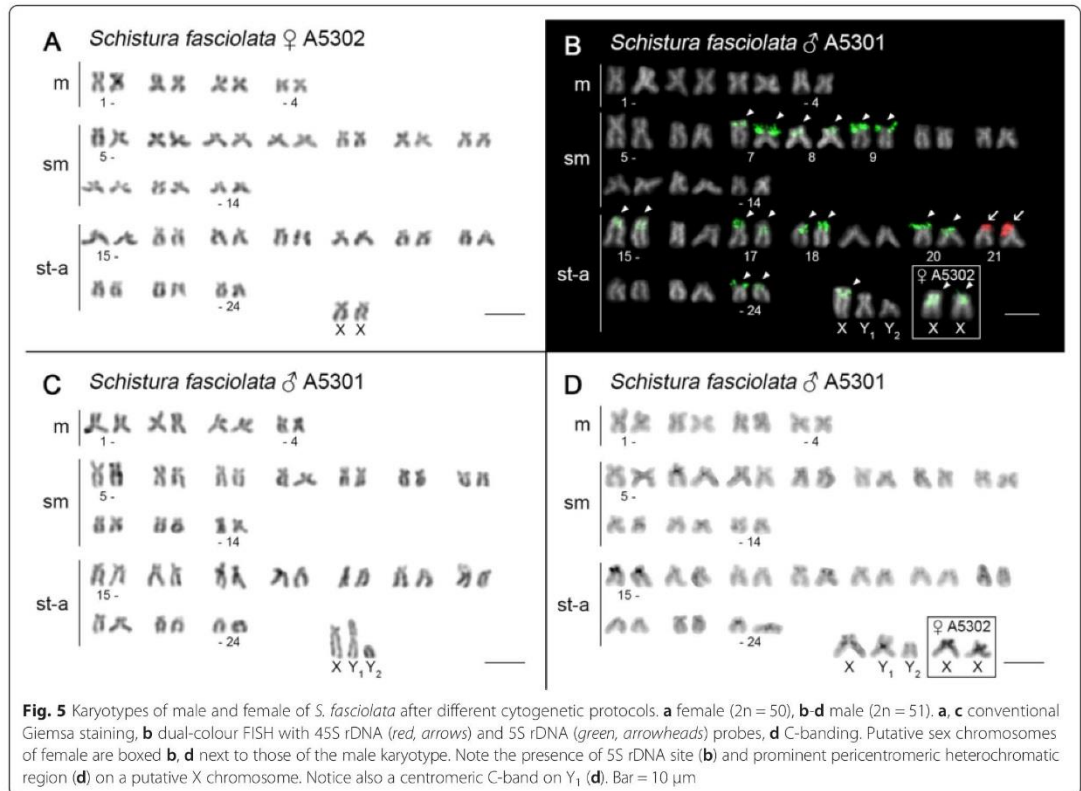
All karyotypes resulting from the rDNA FISH experiments are shown in Figs. 3, 4 and 5; Additional file 7: Figure S3, Additional file 8: Figure S4B, D, F and Additional file 11: Figure S6B, D and partial idiograms showing rDNA phenotypes in the phylogenetic context are summarized in Fig. 2. In most species, the 28S rDNA probe (i.e., corresponding to the NOR-associated major ribosomal cluster 45S rDNA, which





codes for 28S, 5.8S and 18S rRNA genes) showed only one pair of NOR-bearing chromosomes located in CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> sites. NOR phenotypes with two or more loci were observed in *P. zonalternans* (Additional file 11: Figure S6B), *S. savona* (not shown; see later in the text), *S. lendlii* (Additional file 7: Figure S3V) and especially in *P. elongata* with the number of sites ranging from 12 (Additional file 11: Figure S6D) to 14 (Fig. 6g). In the latter, not more than six NORs were stained also by AgNO<sub>3</sub> impregnation (data not shown). The 45S rDNA sites were located exclusively terminally (m) or covered entire p-arms of a particular st-a chromosome pair. By contrast, we found a considerable variability in the number of 5S rDNA sites, ranging from two (*B. barbatula*, *N. binotatus*, *N. ruppelli*, *S. notostigma*; Figs. 3b and 4b; Additional file 7: Figure S3F and Additional file 8: Figure S4B, D) to 20 (*Physoschistura* sp.; Fig. 3d). The 5S rDNA clusters were mainly located in pericentromeric regions or distributed in the entire p-arms of some st-a chromosomes, but location in/nearby centromeres of m-sm chromosomes was also observed (*B. barbatula*, *N. ruppelli*, *P. lucidorsum*, *S. notostigma*; Figs. 3b and 4b; Additional file 7: Figure S3L and Additional file 8: Figure S4B, D). In two species we observed one pair of chromosomes with a syntenic association of both rDNA classes (*P. brevis* – pair 13,

Additional file 7: Figure S3J; *N. ruppelli* – pair 8, Fig. 4b) and another two species displayed direct co-localization of them (*P. zonalternans* – pair 12; *P. elongata* – pairs 4 and 12 – Additional file 11: Figure S6B, D). In the latter species there is an intraspecific variability in the number of both rDNA clusters as well as the number of their co-localization sites, based on observation of 5S rDNA ranging between 14 and 16 sites (Fig. 6g and Additional file 11: Figure S6D) and even six co-localized rDNA sites in some metaphases (Fig. 6g). Here, we further observed intraspecific variability in 1) size polymorphism, especially in 45S rDNA (best seen on FISH karyotypes of *S. bolavenensis* and *S. corica* – Additional file 7: Figure S3N, P) 2) polymorphism in the presence/absence of homologous rDNA sites (*P. pictilis* – pair 10; *S. lendlii* – pair 3 and *S. notostigma* – pairs 12 and 22, Additional file 7: Figure S3H, V, Additional file 8: Figure S4D, F), 3) number of rDNA sites (*S. corica* – pair 17; *S. hypsiura* – pair 18, Additional file 7: Figure S3P, R; *S. notostigma* – compare Additional file 8: Figure S4B and F), 4) heterozygosity for inversion involving rDNA loci (*P. zonalternans* – pair 10; *P. elongata* – pair 5, Additional file 11: Figure S6B, D), and 5) linkage of the 5S rDNA locus to a putative sex chromosome (*S. fasciolata* – Fig. 5b). Interestingly, a conspicuous difference in the 5S rDNA phenotype was discovered between two

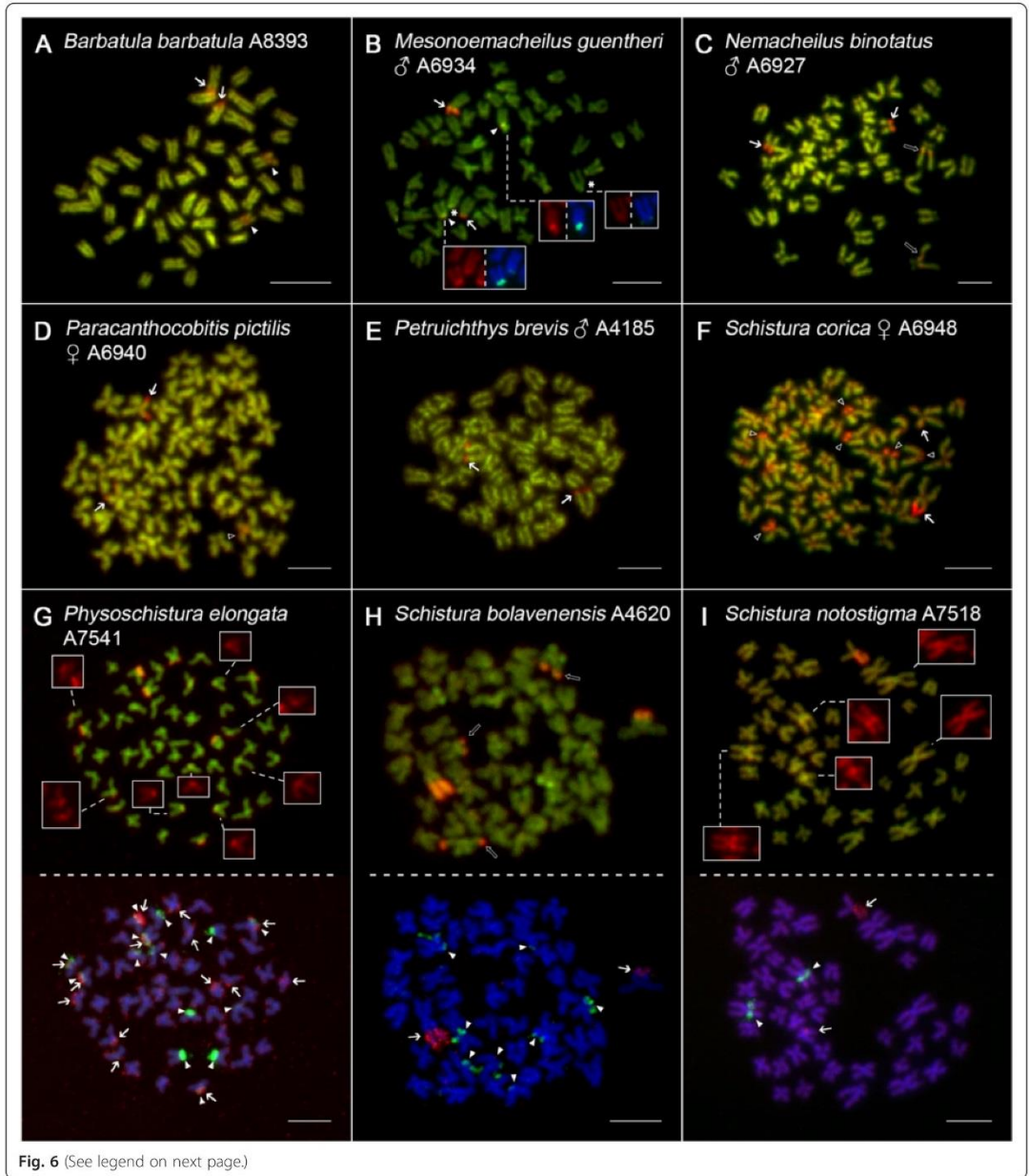


karyomorphs of *S. notostigma*. While the karyomorph with 2n = 48 (1 specimen) exhibited five sites of 5S rDNA (all in pericentromeric regions of the st-a chromosomes, Additional file 8: Figure S4F), the karyomorph with 2n = 44 displayed only two of them, adjacent to centromeres of large-sized m chromosomes (5 specimens) (Additional file 8: Figure S4B, D). In *S. savona*, we observed considerable intraspecific variability being shown from two to four signals of 45S and from two to eight signals of 5S rDNA cluster (data not shown). In this species, however, it was not possible to conclusively distinguish whether this was the result of high intraspecific and intra-individual variability or whether it was artificial due to the limited visibility of the hybridization signals on such extraordinarily small chromosomes and so, these results are not discussed further.

#### Telomeric FISH

In order to document interstitial telomeric sites (ITSs) as remnants of chromosomal rearrangements, we employed FISH with conserved vertebrate telomeric

(TTAGGG)<sub>n</sub> repeat [44] in a subset of seven species (*L. costata*, *N. binotatus*, *N. ruppelli*, *P. brevis*, *P. elongata*, *S. corica* and both karyomorphs of *S. notostigma*). As expected, the telomeric probe labelled the ends of all chromosomes, and no ITSs were revealed in five out of seven species (Fig. 7b, c and Additional file 12: Figure S7A-D). Clear ITSs, however, were observed consistently on ten metaphases of *N. binotatus* (Fig. 7a) and 15 metaphases of *N. ruppelli* (Fig. 4d). In *N. binotatus*, a single pair of ITSs occurred proximally on the q-arms of the largest chromosome in the karyotype (pair 11). These ITSs co-localized with sequentially heterogeneous AT/GC-rich heterochromatic regions. In *N. ruppelli*, three pairs of extensive and three pairs of faint pericentromeric ITSs were observed in large-sized m chromosomes (Fig. 4d). These six ITSs were coincident with AT-rich C-heterochromatin (Fig. 4c). Moreover, in this species additional large ITSs were also scattered all along the region of the single pair of 45S rDNA (compare Fig. 4b and d). The high intensity of some ITSs signals resulted in very limited visibility of natural telomeric signals on





(See figure on previous page.)

**Fig. 6** Mitotic metaphases of selected nemacheilid species after CDD banding. **a, c, d, e, f** single metaphases; **b** metaphase arranged with boxes showing particular chromosomes sequentially after CDD banding and dual-colour rDNA FISH. **g-i** whole metaphases arranged sequentially – after CDD banding (upper row) and corresponding dual-colour FISH showing locations of 45S rDNA and 5S rDNA (lower row). **a** *B. barbatula*, **b** *M. guentheri*, **c** *N. binotatus*, **d** *P. pictilis*, **e** *P. brevis*, **f** *S. corica*, **g** *P. elongata*, **h** *S. bolavenensis*, **i** *S. notostigma*. For better contrast, CDD-banded pictures were pseudocoloured in red (for CMA<sub>3</sub>) and green (for DAPI). FISH metaphases follow the same colour scheme as in Figs. 2, 3, 4 and 5. Arrows show CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/45S rDNA sites, arrowheads show CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/5S sites, open arrowheads show a putative CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/5S sites and open arrows show CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> regions non-related to rDNAs and minor/putative CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> sites. In the particular case of *M. guentheri* (**b**), note the CMA<sub>3</sub>-negative 5S rDNA sites (denoted by asterisk), while the remaining boxes clearly show CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/5S rDNA sites. In non-sequential metaphases (**a-f**), considering the number and location of CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> signals in comparison to respective FISH karyotypes (Fig. 2 and Additional file 7: Figure S3), the association between 45S rDNA and CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> sites is clearly apparent from pics. and the same is true also for some or all 5S rDNA sites in (**a, d** and **f**). Due to the close proximity of 5S rDNA sites to centromeres (which are usually AT-rich and display bright fluorescence), some CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/5S rDNA sites are not clearly apparent from the pictures, therefore they are boxed with a separate channel for CMA<sub>3</sub> (red) (**b, g, i**). Note the significant spreading of CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> regions in centromeres of *S. corica* (**f**) and CMA<sub>3</sub>-positive ITSs in *N. binotatus* (**c**). Bar = 10 μm

the chromosomal ends. Finally, in *N. ruppelli* and *S. notostigma*, some p-arms of small or medium-sized st-a were entirely covered by telomeric repeats.

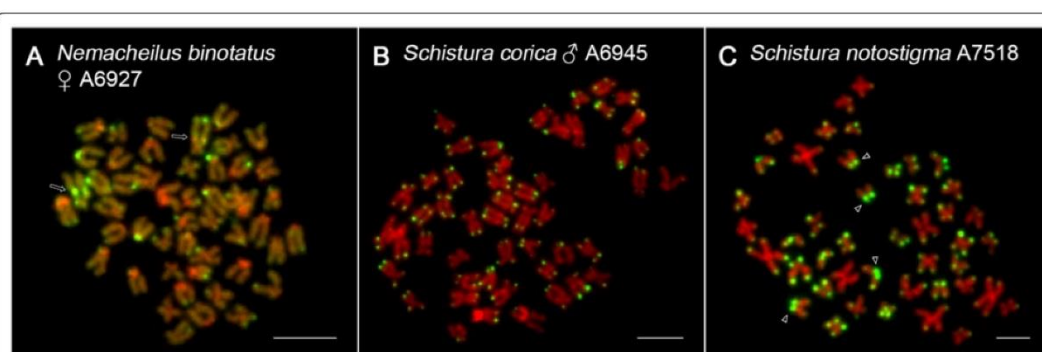
## Discussion

### Topology of the phylogenetic tree

In our phylogenetic reconstruction the seven analysed species of *Schistura* do not form a monophyletic lineage, but appear as polyphyletic. This result reflects the massive flaws in the present taxonomy of this genus as already formerly stated by several taxonomists who referred to *Schistura* as ‘a provisional, polyphyletic assemblage’ [45], ‘polyphyletic’ and ‘waste-basket name’ [46] or ‘possibly not monophyletic’ [47]. The observed polyphyly of *Schistura* is therefore not surprising, but most likely reveals the true natural relationships between the analysed taxa. The two analysed species of *Physoschistura* turn out not to be closely related, supporting the former opinion that *P. elongata* is not closely related to the Burmese species of *Physoschistura* [47].

### Karyotype differentiation and evolution

Karyotypes of *B. barbatula*, *L. costata*, *P. pictilis*, *S. fasciolata* and *S. savona* were revisited, whereas the remaining 14 species were examined for the first time. Our study thus increased the number of karyologically described river loaches to 38. Comparison of nemacheilid karyotypes reported in former studies with results presented here (Fig. 2) showed a different degree of congruence. While in *B. barbatula* our karyotype description matched the previous report of Vasil'ev [48] only, the karyotype of *P. pictilis* (formerly as *Acanthocobitis botia*) differed slightly in morphological classification from that recorded by Rishi et al. [49]. Also, we evaluated the karyotype of *L. costata* as having a higher number of banded elements than in Kim et al. [50]. Moreover, the karyotype of *S. fasciolata* described here is not consistent with that reported by Yu et al. [19], where no sex chromosomes were found, but one specimen of *S. fasciolata* with 44 chromosomes was included. Finally, karyotypes of *S. savona* reported in Khuda-Bukhsh et al. [18] consisted of 36 chromosomes while



**Fig. 7** Mitotic metaphases of selected nemacheilid species after TSA FISH with telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> probe. **a** *N. binotatus*, **b** *S. corica*, **c** *S. notostigma* (karyomorph with 44 chromosomes). Chromosomes with the telomeric repeat probe (green colour) are counterstained with DAPI, pseudocoloured in red colour for better contrast. Arrows point to the chromosomes with ITSs (**a**). Arrowheads show telomeric probe covering entire p-arm of st chromosomes (**c**). Bar = 10 μm

our results showed uniformly  $2n = 50$  in all three examined specimens. All these discrepancies may have resulted - besides the differences in chromosomal morphology classification due to difficulties described in the previous section - from the description of chromosomally different populations or by the misidentification of some species in the earlier studies.

Seventeen out of 19 analysed species showed conserved karyotypes with  $2n = 50$  (Figs. 2, 3 and 5; Additional file 7: Figure S3 and Additional file 11: Figure S6). This  $2n$  has been already documented for the majority of previously surveyed river loaches [7, 12–14] as well as in some other loach families [4] and cyprinid fishes [7, 51]. Similar karyotypes (with either 48 or 50 chromosomes) were found in more than 50 % teleost species, thus indicating high conservativeness of this  $2n$  [52]. Additionally, the  $2n = 48$  with exclusively monoarmed chromosomes is hypothesized to be ancestral for all Teleostei [53, 54].

Despite the generally stable karyotype macrostructure, the river loaches analysed here varied greatly in the proportion of chromosome types reflected by the increase or decrease of the NF value. The occurrence of species with similar karyotypes did not correspond with their phylogenetic relationships. Changes of NF without changes of the  $2n$  are strong indicators that nemacheilid chromosomes have evolved by diverse intrachromosomal rearrangements, such as various types of centromeric shifts.

We further recorded two species with karyotypes exhibiting reduced  $2n$ , namely *N. ruppelli* ( $2n = 38$ ) and *S. notostigma* ( $2n = 44$  or 48). In the latter, our sample included two different karyomorphs. A single individual with 48 chromosomes did not show any significant differences in morphology and in sequences of *IRBB*, *RAG1* and *cyt b* in comparison to individuals with  $2n = 44$ . Since we do not know the exact localities of analysed specimens, we cannot conclude, whether this result indicates the interpopulational variability.

In both species, reduction in  $2n$  was accompanied by an increased number of large m chromosomes, implying their origin via one or several centric fusions of Robertsonian (Rb) type. Based on comparison of  $2n$  and NF [55] and with respect to prevailing  $2n = 50$  in examined nemacheilids, *N. ruppelli* most likely underwent six Rb translocations, while karyotype differentiation in *S. notostigma* probably involved one Rb translocation (in karyomorph  $2n = 48$ ) and two Rb translocations, one tandem fusion and one para/pericentric inversion (in karyomorph  $2n = 44$ ), respectively. According to our phylogenetic analysis (Fig. 2), *N. ruppelli* and *S. notostigma* are not closely related, therefore the reduction of  $2n$  in these species apparently represents independent events. Furthermore, the combined results from C-banding and telomeric FISH suggest a slightly

different scenario of karyotype changes in both species (see below).

Besides our study, the evidence of reduced  $2n$  among Nemacheilidae has already been documented for *Nemacheilus selangoricus* ( $2n = 40$ ) [17], *Paracobitis potanini* ( $2n = 48$ ) [19], *S. fasciolata* ( $2n = 44$ ) [19], *S. savona* ( $2n = 36$ ) [18] and *Triplophysa siluroides* ( $2n = 48$ ) [20]. A different bias towards an increased number of either mono- or biarmed elements was apparent in these species. Some nemacheilid species (or at least representatives from some subpopulations) thus tend to reduce their  $2n$  via centric or tandem fusions. Except for the studied males of *S. fasciolata* here and the report on triploidy [21], karyotypes of river loaches analysed to date did not exceed  $2n = 50$  ([7, 12–14], this study).

Our data show that karyotypes in nemacheilid loaches have diversified mainly via centric or tandem fusions and pericentric inversions. In general, such chromosomal rearrangements can act as an efficient barrier for gene flow (by suppressing recombination in the affected region) and thus can contribute to speciation and/or local adaptation processes [56–58].

#### Distribution and sequence composition of constitutive heterochromatin

Heterochromatin is an important source of karyotype diversification in several fish groups (e.g., [27]) and its unusual distribution may sometimes correspond to remnants of particular chromosome rearrangements [59]. As we present here, the karyotypes of river loaches differ greatly in their distribution of AT-rich C-heterochromatin (Additional file 9: Table S4), and contain some noticeable common patterns. We especially emphasise a) the dot-like intercalary heterochromatic bands on the q-arms of sm or st chromosomes, very close to the centromere (e.g., in *B. barbatula*, *N. binotatus*, *S. bolavenensis* and *S. notostigma*) and b) the presence of entirely heterochromatic arms in some elements (e.g., in *M. guentheri*, *S. bolavenensis*, *S. corica*, *S. hypsiura* and *S. lendlii*). Both observed patterns might be related to pericentric inversions (heterochromatinization of short arms are usually the result of this kind of rearrangement) and/or heterochromatin block addition [60]. The dot-like intercalary sites could be also explained by tandem fusions [60, 61], but considering the constant  $2n$  in the majority of species under study, it would only be a plausible explanation for *S. notostigma*. Interestingly, although the presence of large biarmed chromosomes with entirely (or almost entirely) heterochromatic arms was shared by five nemacheilid species (*M. guentheri*, *P. sp.*, *S. hypsiura*, *S. corica* and *S. lendlii*), these regions were adjacent to rDNA clusters only in two of them (*S. corica* and *S. lendlii*). Whether these chromosomes are homeologous among some of the mentioned species and



whether the heterochromatic blocks contribute to the dynamics of rDNA clusters remains inconclusive. Also, polymorphism regarding the addition of AT-rich heterochromatic p-arms was observed in one pair of chromosomes in *M. guentheri*. While the male was heterozygous for the presence of a prolonged heterochromatic arm, the female possessed only the short variants. Comparable results have been previously documented in some other fishes ([62] and references therein) and may be explained by an unequal crossing-over or by transposition/amplification processes involving a DAPI-rich centromeric region [22]. The last intriguing feature was the presence of large blocks of AT-rich heterochromatin in the pericentromeric region of the largest m chromosomes of *N. ruppelli* and *S. notostigma*. These regions are possibly remnants of pericentromeric heterochromatin of previously monoarmed elements. Similar feature displayed also *S. savona* on one m chromosome pair, however, with unreduced  $2n = 50$ .

In fishes, GC-rich DNA segments labelled by  $CMA_3$  are almost exclusively associated with NORs [63, 64], with some exceptions in sturgeons [65]. NOR regions were usually not visualized after C-banding, thus most likely suggesting that GC-rich sequences were inserted into the intergenic spacers (IGSs) of the 45S rDNA arrays [63, 66]. Additionally, nearly half of the species analysed showed further  $CMA_3^+$  sites restricted to 5S rDNA regions – a feature that up to now has only been found among fishes in some Polypteriformes [67] and Perciformes, namely in Centrarchidae [68], Pomacanthidae [69] and Gobiidae [70]. Deiana et al. [68] attributed this feature to the presence of GC-rich repeats in NTS. Particularly interesting was the observation of all centromeres being  $CMA_3^+$  in *S. corica* – a similar feature as, for instance, in Gobiidae [71, 72] and Polypteriformes [73]. Also in the genus *Cobitis*, high number of  $CMA_3^+$  regions were recorded which were non-related to NORs (together with  $CMA_3$ -negative NOR sites) [74]. In a recent study, some  $CMA_3^+$  regions non-related to NORs were observed also in *P. elongata*, *S. bolavenensis* and *S. notostigma*. Therefore, our results represent another example that  $CMA_3$ -staining and 45S rDNA FISH do not always correspond and that CDD banding itself is not sufficient for the proper identification of NORs in fishes (discussed in [75, 76]).

The scattered occurrence of non-45S rDNA GC-rich sites does not appear to imply any correlation with phylogenetic relationships. However, the phylogenetically most derived species (*P. brevis* and *Physochistura* sp.) apparently lack GC-rich 5S signals (Fig. 6e and Additional file 10: Figure S5C). The evolutionary significance of this type of variability is still under debate. For instance, the sequence composition of heterochromatin can be associated with the different

success of recombination processes and with a propensity to some kind of chromosome rearrangements. Here, the GC-rich regions were involved in two Rb translocations in *S. notostigma* and one of the resulting fusion points also involved a 5S rDNA site, because karyomorph with  $2n = 48$  display higher number of exclusively terminally located 5S rDNA and GC-rich sites, while karyomorph with  $2n = 44$  exhibit reduced number of such regions, with some of them being apparently re-located to the pericentromeric region of large m chromosomes (Fig. 6i; Additional file 8: Figure S4B, F and Additional file 10: Figure S5G). Hence, centric fusion is very likely partly responsible for the reduction of 5S rDNA sites from five (karyomorph with  $2n = 48$ , st chromosomes, Additional file 8: Figure S4F) to two (karyomorph with  $2n = 44$ , m chromosomes, Additional file 8: Figure S4B, D). A similar scenario could also explain the largest sm pair in *N. ruppelli* (no. 8, Fig. 4b), with GC-rich 5S rDNA in the centromeric region. However, considering the other six pairs of large m chromosomes with marked large pericentromeric heterochromatin and ITSs (as evidence of Rb translocation; Fig. 4c, d), there is no space for additional fusions since  $2n = 38$  had already been reached. Therefore, two alternative explanations for this discrepancy can be hypothesized: 1) the occurrence of conspicuous pair 8 in *N. ruppelli*, with syntenic association of both rDNAs, may be the result of Rb translocation only in the case of parallel fission of some other previously metacentric pair (resulting possibly in st-a pairs 18 and 19, with a markedly strong telomeric signal on the p-arms, Fig. 4d) or 2) synteny of both clusters on chromosome pair 8 has been caused by another type of translocation event, non-affecting the  $2n$ .

GC-rich regions are more prone to high recombination rates [77]. In a similar way, GC-rich centromeres have been hypothesized to be favoured or even essential in the process of Rb translocations in some gobiid fishes [71, 72]. On the other hand, the majority of Rb translocations in *N. ruppelli* originated from elements containing AT-rich centromeres, and therefore it appears that more mechanisms exist for Rb translocations besides involvement of GC-rich regions. These findings contrast with those studies, but are consistent with results observed in killifishes [22] and *Mus musculus domesticus* [78].

Due to the number of reports evidencing 5S rDNA in the centromeres of fused chromosomes as gradually increasing in fishes [79, 80], it raises the question whether the 5S rDNA region could contribute in some way to the fusion process or it is only a consequence of it. It has been suggested that 5S rDNA can serve as break-points for the fusion due to its intensive activity and chromatin decondensation [80] but further data supporting this hypothesis would be required.

In our study, GC-rich sequences may be involved in the dispersion and homogenization of GC-rich/5S rDNA sequences as well as 45S rDNA sites and 5S/45S colocalized sites in the genome of *P. elongata* by ectopic recombination, similarly as observed in Gobiidae [70]. However, other nemacheilid species bearing GC-rich/5S rDNA regions do not display such extensive dispersion of 5S rDNA. Thus, other factors such as transposition together with stochastic processes in isolated populations may have been involved in the dynamics of GC-rich/5S rDNA sites. Similarly, a combination of transposition and unequal crossing-overs could have contributed to the dispersion of GC-rich centromeres in *S. corica*.

Our results from C- and CDD- banding further reinforced our initial hypotheses about the roles of pericentric inversions and centric/tandem fusions as the main processes underlying the karyotype differentiation of examined river loaches. Collectively, our data point to a substantial heterogeneity both in heterochromatin distribution and composition among the analysed river loaches, resulting probably from intense dynamics at chromosomal and genomic levels.

#### Sex chromosomes

While the majority of analysed species lacked morphologically differentiated gonosomes, we identified a putative multiple sex chromosome system  $XY_1Y_2$  in *S. fasciolata*. The two Y chromosomes in males (m and st) possibly arose from a double-strand break (or fission) in one proto-Y chromosome, followed perhaps by intrachromosomal rearrangements, such as pericentric inversions, in the larger element. Interestingly, the FISH results showed a pericentromeric 5S rDNA site on a putative X chromosome – a situation previously observed e.g., in rainbow trout [81]. In general, about 10 % of fish species cytogenetically examined to date exhibit morphologically differentiated gonosomes [82] and within them, only a few cases of the multiple system  $XY_1Y_2$  have been reported (e.g., [83–85]), with apparently phylogenetically independent origins among genera and families. Our finding is the first observed in river loaches. However, because our sample was rather small, we can not exclude the possibility that we are still dealing with a polymorphism instead of a sex chromosome system. Therefore our conclusions should be further confirmed using comparative genomic hybridization (CGH) [86] and analyses of meiotic chromosomes on a larger sample base.

#### Telomeric FISH pattern

Tandemly-arrayed telomeric  $(TTAGGG)_n$  repeats are usually present at the ends of vertebrate chromosomes, ensuring their stability and integrity. However, they also occasionally appear in non-telomeric locations (ITSs),

possibly as putative markers of previous chromosomal rearrangements, transpositions or as the result of DNA repair mechanisms ([87–89] and references therein). In *L. costata*, *P. brevis*, *P. lucidorsum* and *S. corica* and both karyomorphs of *S. notostigma*, the telomeric signals were restricted to the chromosome ends. Although some metaphases displayed putative intercalary telomeric sites, the lack of a second terminal signal on the particular chromosome suggests that these signals label natural telomeres. ITSs were therefore only found in *N. ruppelli* and *N. binotatus*. In the latter species, the single prominent ITS located interstitially on the long arm of the largest st pair may indicate a pericentric inversion or a tandem fusion event. Since the ancestral diploid chromosome number ( $2n = 50$ ) remained unchanged, the observed pair of ITSs is rather a relic of a previous pericentric inversion, although such types of rearrangement are not frequently associated with retained telomeric repeats in vertebrates ([90, 91]). The intense telomeric signal may be the result of an additional amplification of telomeric repeats either before or after the rearrangement, or, in the case of *N. binotatus*, could have originated from a relatively recent pericentric inversion. The failure to detect ITSs in the majority of the remaining species does not necessarily mean, that inversions did not occur as it is possible that the residual traces of ITSs have been lost or reduced to such a low copy number as to be undetectable by FISH analyses. The telomeric FISH also provided the interesting evidence that the mechanism of Rb translocations differs significantly between species with reduced  $2n$  (*N. ruppelli* and *S. notostigma*). While *N. ruppelli* possessed several huge pericentromeric ITSs, none were found in *S. notostigma*. As described by Slijepcevic [92], the mechanism of Rb translocations can be either 1) associated with a loss of telomeric sequences prior to fusion or 2) with their preservation in otherwise inactivated telomeres. Moreover, there is also the possibility that 3) some degenerate telomere-like sequences may become part of the centromeric heterochromatin and subsequently expand along this region as a result of the action of a variety of amplification mechanisms [92, 93]. We suggest that a combination of scenarios 2) and 3) apply in *N. ruppelli*, while *S. notostigma* followed the first scenario, hence residual telomeric sequences were absent at the fusion points. The assumption of amplified centromeric ITSs in *N. ruppelli* is based on their remarkably stronger signal compared to native telomeres and on their C-positive character. ITSs often co-localize with heterochromatin blocks [87, 88, 94] and large, mostly centromeric ITSs similar to those in *N. ruppelli* (sometimes referred to as heterochromatic ITSs, or “het-ITSs”), have previously been described in other fishes as well as in a variety



of other organisms [88, 89]. Interestingly, additional ITSs were found to be associated with the 45S rDNA cluster in *N. ruppelli* as confirmed by FISH and CDD banding. This association has been previously described in Anguilliformes, Mugiliformes, Salmoniformes and Syngnathiformes [89] and was believed to play a role in the silencing of additional 45S rDNA copies [95]. This seems unlikely in *N. ruppelli*, however, as the telomeric repeats perfectly match with the entire region of the only pair of 45S rDNA. Alternatively, the mechanism of rDNA silencing could be more complex or prone to leakage of rDNA expression in some way. Finally, large ITS-like blocks covering entire p-arms of some monoarmed chromosomes as observed in *N. ruppelli* and *S. notostigma* bring another example of enormous nemacheilid cytogenetic variability.

#### Genomic organization and distribution of rDNA clusters

Mapping of tandemly-arrayed repetitive sequences has proven to be an important tool for karyotype analysis [59] and this is especially true for ribosomal RNA genes. The rDNA phenotypes are often species-specific and have been used as cytotaxonomic markers [96]. However, a number of reports demonstrating extensive inter/intra-specific variability of these markers is still growing in fishes [97–100], other animal groups [101] and plants [102]. Here, we point to the conservative NOR phenotype, presented by one pair bearing 45S rDNA signals in 15 out of 19 nemacheilid species. Although the possibility of interspecific homeology of NOR-bearing chromosomes is rather unlikely, definitive proof based, for instance, on the approach described by Milhomem et al. [103] is missing. From all our samples we documented multiple 45S rDNA sites only in *P. elongata* (Fig. 2). Subsequent analysis made by silver staining detecting only NORs actively transcribed in the preceding metaphase [104] revealed not more than six loci (data not shown), thus, some extra loci are either nonfunctional or silenced.

We observed a conservative NOR phenotype of one major rDNA bearing pair – a pattern found in more than 70 % of examined fish species to date [76]. In contrast, we detected a considerable variability in the pattern of 5S rDNA ranging from two to 20 sites (Fig. 2). The presence of a single pair of both rDNA clusters is thought to be the plesiomorphic condition in teleost fishes, whereas two or more chromosome pairs bearing either 45S or 5S rDNA sites represent a derived condition [76, 105]. In our study, only *B. barbatula* and *N. binotatus* exhibited karyotypes with the ancestral  $2n = 50$  together with one pair of both rDNA clusters and in *B. barbatula*, our results confirmed the previously reported NOR phenotype based on silver staining [15]. In the remaining two species exhibiting the characteristic

teleost rDNA phenotype the karyotypes were derived (*N. ruppelli* and *S. notostigma*). A variable 5S rDNA pattern in combination with a conservative NOR phenotype has been observed in some fish groups [70] while other fish groups have shown the opposite situation (variable 45S and conservative 5S rDNA; [106]).

The 45S rDNA site has a predominantly terminal position on the different chromosomes of the analysed species, while the 5S rDNA is located almost exclusively in the pericentromeric regions or it covers entire p-arms of monoarmed chromosomes. Pericentromeric or, more generally, interstitial position of 5S rDNA appears to be universal among fishes [107].

In fishes, the chromosome locations of both rDNA multigene families are usually on different chromosomes, perhaps due to 1) the elimination of possible rearrangements between both multigene families and 2) to allow rDNA clusters to evolve independently [105, 108]. On the other hand, exceptions with syntenic location or direct co-localization of both rDNA clusters (or their linkage to other multigene families) has already been documented in a variety of vertebrates [109, 110], including reports from several fish groups [111] as well as in loaches of the family Cobitidae [98], a sister lineage to nemacheilids. This pattern is rather patchily distributed across the phylogenetic trees and was also evidenced in our study. In *N. ruppelli*, the 5S rDNA loci occupied the pericentromeric region of a big m chromosome while the 45S rDNA was situated terminally on the q-arm of the same chromosome. In *P. brevis*, a similar association was observed in one pair of big st elements. Moreover, direct co-localization of rDNA clusters was observed in two species: one pair in *P. zonalternans* and from four to six co-localized sites in *P. elongata*. Such a rare situation has probably no evolutionary advantage as both classes of rRNA genes are transcribed by different RNA polymerases [109]. Therefore, this constitution is a possible consequence of recent genome instability and reshuffling as typically observed in hybridization events [100].

In all species analysed here, a size polymorphism in the homologous 45S rDNA sites was apparent. Such an observation is relatively common among fishes and is attributed to the processes of unequal crossing-over or the amplification of adjacent heterochromatin [112]. We also observed an intraspecific polymorphism in terms of the number of rDNA sites present (*S. corica*, *S. hypsiura*, *S. notostigma*) and a polymorphism in the presence/absence of rDNA site on one homologous chromosome in *S. notostigma* (5S rDNA and 45S rDNA), *S. lendlii* (female, 45S rDNA) as well as for both females of *P. pictilis* (5S rDNA). Unfortunately, the limited number of specimens available in our sample is insufficient to conclusively determine either



fixation or heterogeneity of this feature in the population. Similar heterozygous constitutions of rDNA FISH signals have been commonly observed in several species of fishes (e.g., [112, 113]) including some from Cobitidae [74, 97, 98]. The lack of signal on one of the homologues may be a direct consequence of sequence elimination due to unequal crossing-overs, often related to a process of concerted evolution in tandemly-repeated genes [114] or by the activities of repetitive DNA such as TEs [59, 115]. Finally, we also observed the polymorphism caused by rDNA loci inversion in *P. zonalternans* and *P. elongata*. This feature, present in Cobitidae [98], suggests a strikingly similar dynamics of rDNA loci in these closely related loach families as well as another clue about the contribution of inversions to the karyotype differentiation of river loaches.

Our study has revealed an extensive dispersion of multiplied sites of 5S rDNA and also of 45S rDNA in nemacheilids. The dominance of the ancestral  $2n = 50$  karyotype in Nemacheilidae refutes chromosomal rearrangements as the trigger mechanism for this dispersion, but amplification and dispersion of 5S rDNA clusters may also be caused by transposition and unequal crossing-over or ectopic recombination between various tandemly-arrayed sequences in adjacent heterochromatin [102, 115, 116]. Thus, rDNA clusters themselves can provide a substrate for non-homologous recombination, thereby promoting chromosomal rearrangements [101]. A significant fraction of the rDNA units in animals are interrupted by TEs highly specialized for insertion into conserved sites within the rRNA genes [114, 117] and recent studies suggested that they might cause rDNA mobility [118–120]. Co-localization of non-LTR RTEs of the Rex family with rDNA followed by a subsequent expansion of rDNA sites have been uncovered by FISH analyses for 5S [94] and 45S rDNA [121, 122]. It is tempting to hypothesize that a similar mechanism could cause the amplification of 5S/45S rDNA in other fish species with documented extensive rDNA dispersion. In our study, we have found the non-LTR retrotransposon L1-2\_DR element, from the Tx1 clade (L1 lineage) – inserted close to a coding region of 5S rDNA in *S. pridi*. This element has been previously described in zebrafish [123].

Since the karyotype of *S. pridi* exhibit a large number of 5S rDNA loci (18), the L1-2\_DR may have been inserted into the NTS of both analysed 5S variants and subsequently retrotransposed to other chromosomal loci. RTEs of this L1 family preferentially jump into AT-rich regions [123], therefore the AT-rich pericentromeric heterochromatin of *S. pridi* located adjacent to 5S rDNA could serve as a primary location for this mechanism. Alternatively and/or as secondary consequences,

the L1-2\_DR (or other TEs) could provide the substrate for non-homologous (ectopic) recombination between centromeres of several chromosomes in *S. pridi* yielding to a dispersion of 5S rDNA to other sites. Both hypotheses deserve further investigation regarding the localization of L1-2\_DR elements on the chromosomes of *S. pridi* and also the investigation of possible rDNA/TEs association in other river loaches through FISH analysis. However, we can not rule out the hypothesis, that L1-2\_DR elements are just following the spread of 5S rDNA and not driving it (for additional note, see Additional file 1: Supplementary Discussion).

The variation observed in the distribution of 5S rDNA sites implies a complex microevolutionary mechanism behind the organization of nemacheilid genomes. The final questions are: whether or not a dispersion of 5S rDNA is only a byproduct of rapid genomic change, is there any possible contribution to the host genome worth maintaining such a high number of copies, or are the excessive copies most likely sentenced to pseudogenization and elimination? Could an extensively elevated number of rDNA loci somehow contribute to the speciation process? We are still far from understanding this but some indications have come from studies on 45S rDNA in notothenoid fishes [111] and humans [124]. According to Pisano and Ghigliotti [111] the differential pattern of the rDNA phenotype could have a possible adaptive significance in subzero temperatures. Furthermore, the study of Gibbons et al. [124] shows that 45S rDNA dosage is correlated with mitochondrial DNA abundance and with the expression of some chromatin modifiers thereby affecting mitochondrial-related processes and changes in global gene expression. However, whether a similar correlation is true also for 5S rDNA dosage remains an open question (but see [125]). Thus, such an explanation does not yet fit our hypotheses about the mechanisms behind nemacheilid radiation success, although, it does suggest a frame in which to evaluate the contribution of multiple 5S rDNA to adaptation and speciation processes.

Conclusively, our data suggest frequent changes of 5S rDNA phenotypes in contrast to the stable pattern of 45S rDNA. Extensive variability of 5S rDNA loci may be regarded as an indicator of significant intragenomic processes [115, 116] and thus can be viewed in the context of an incipient stage of speciation, where evolutionary changes driven by the dynamics of repetitive DNA are currently in action [59]. This process can be also related to extreme ecological conditions possibly resulting in (re)activation of TEs [122]. As documented in several animal and plant species, elevated activity of TEs may contribute to adaptation to a new environment [126, 127]. Furthermore, the processes of transposition and/or ectopic recombination were not likely

restricted only to regions of 5S rDNA. Numerous studies have documented the involvement of TEs in chromosomal rearrangements [59, 115, 126, 128]. We therefore conjecture that TEs might also contribute to the dynamics of nemacheilid genomes in this way.

#### Phylogenetic and ecological inferences

We have used a phylogenetic tree to show the relationships between the analysed individuals. When mapped on this tree, the observed cytogenetic characteristics did not reflect the phylogenetic pattern, suggesting that certain cytogenetic character stages, like a lowered number of chromosomes, did not occur in closely related, but in non-related species. Therefore the parallel occurrence of cytogenetic character stages in two species is not the result of a single evolutionary event, but of convergence or parallel evolution. Our study has revealed a high variability in cytogenetic characters with almost none of them producing a phylogenetic signal. Therefore, a vast number of independent events with no general direction must have happened to cause the observed cytogenetic variability. The frequent occurrence of independent cytogenetic changes as revealed by the phylogenetic reconstruction further emphasises the high mutational activity of the nemacheilid genome at the cytogenetic level.

In contrast to the general observation of independent cytogenetic events, one of the variable cytogenetic characters did show an interesting pattern. The highest numbers of 5S rDNA loci (up to 20 sites) were almost exclusively observed in local endemics or inhabitants of small, fragmented habitats (*P. brevis*, *P. elongata*, *P. sp.*, *S. hypsiura* and *S. pridii* – see Fig. 2). This produces a comparably small effective population size and therefore a small gene pool for the species, encouraging the establishment of new chromosomal patterns through genetic drift, meiotic drive and inbreeding [60]. In *P. brevis* the actual population size is quite large, but as it occurs only in a single lake, it can be assumed that the species has undergone through a serious bottleneck during the colonization of this area.

#### Conclusions

Our data provides important information regarding the karyotype differentiation trends in Nemacheilidae. The majority of surveyed species showed the karyotype characteristics common for teleost fishes – e.g.,  $2n = 50$  chromosomes with a slightly changing centromere position, a single pair of NOR and its association with GC-rich blocks of heterochromatin. However, a number of deviations were also apparent – e.g., reduced  $2n$  in two species, atypical locations of GC-rich heterochromatin (e.g., in 5S rDNA sites), cases of multiple rDNA sites and the presence of putative sex chromosomes. While

conventional staining showed prevailing uniformity of the nemacheilid karyotypical macrostructure, analysis at the molecular-cytogenetic level revealed much more variability and greater diversity than previously expected. An increased number of 5S rDNA sites were observed, especially in species with a small effective population size. The mechanisms responsible for such intense dynamics can possibly be attributed to the presence of repetitive sequences and could contribute to enormous success of Nemacheilidae in their colonization and exploitation of new niches, as well as with their adaptation processes. Our study presents river loaches as a new attractive model fish group for investigating the dynamics of cytogenetic markers in association with evolutionary and ecological questions. Importantly, we have also introduced a new non-invasive technique for obtaining chromosome spreads for molecular-cytogenetics protocols.

#### Availability of supporting data

All the supporting data are included as additional files.

#### Additional files

**Additional file 1: Supplementary Methods 1.** Taxonomic identification of nemacheilids. **Supplementary Methods 2.** Preparation of chromosomes from regenerating fin tissue. **Supplementary Methods 3.** PCR conditions of 5S and 45S rDNA amplification. **Supplementary Methods 4.** PCR conditions of *RAG1*, *IRBP* and *cyt b* amplification. **Supplementary Discussion.** Possible functional consequences of excessive 5S rDNA copies. (PDF 181 kb)

**Additional file 2: Figure S1.** Mitotic metaphases of selected nemacheilid species after C-banding or DAPI-staining. (A,D,C,F,G,H,I,J,M,O,P,Q) DAPI staining; (D,E,K,L,N) C-banding improved with DAPI counterstaining. Metaphases from both methods are converted to inverted pictures. (A) *B. barbatula*, (B) *L. costata*, (C,D) *M. guentheri* (E) *N. binotatus*, (F) *P. pictilis*, (G) *P. zonaltemans*, (H) *P. brevis*, (I) *P. sp.*, (J) *P. elongata*, (K) *P. lucidorsum*, (L) *S. bolavenensis*, (M) *S. corica*, (N) *S. hypsiura*, (O) *S. pridii*, (P) *S. savona*, (Q) *S. lendlii*. Arrows depicts whole-armed heterochromatin, arrowheads denote interstitial heterochromatin, the asterisk indicates C-positive NORs (as rare feature among species under study). For comparison of banding patterns between both methods, see pics. C and D. Note that several species share marked interstitial heterochromatic sites indicating the remnants of putative chromosomal rearrangements (e.g., pericentric inversion) (A,E,L,M,Q). Of particular interest are the completely heterochromatic arms in m-sm chromosomes occurring in a subset of species (C,D,L,M,P,Q). Note also heterochromatic p-arms in some st-a chromosomes (C,D,E,O,P). Bar = 10  $\mu$ m. (ZIP 4276 kb)

**Additional file 3: Table S1.** Primer sequences used in this study. (PDF 221 kb)

**Additional file 4: Table S2.** GenBank accession numbers of *cyt b*, *IRBP* and *RAG1* sequences of nemacheilids and one botiid species (*B. lohachata*). (XLSX 17 kb)

**Additional file 5: Table S3.** GenBank accession numbers of 5S and 28S rRNA sequences of four nemacheilids (*P. elongata*, *S. bolavenensis*, *S. corica*, *S. fasciolata*) and one botiid species (*B. almarhae*). (XLSX 14 kb)

**Additional file 6: Figure S2.** Sequence alignment of cloned 5S rDNA fragments from *S. pridii*. Nucleotide sequences (5'-3') obtained from both specimens (A7548, A7549) corresponding to the short (A) and long (B) variant of 5S rDNA, containing partial 5S rDNA coding sequence (green), partial sequence of L1-2\_DR non-LTR retrotransposon (in red) and a



putative non-transcribed spacer (NTS) (rest of the sequence). In the short fragment (A), the consensus sequence is shown for specimen no. A7548 and only base changes according to this sequence are shown for the specimen no. A7549. Dots indicate the upper consensus sequence. Sequence of the long fragment (B) was assembled only from specimen no. A7548. (PDF 111 kb)

**Additional file 7: Figure S3.** Karyotypes arranged from Giemsa-stained chromosomes and dual-colour FISH showing 5S and 45S rDNA sites. Giemsa-stained karyotypes (left column) and dual-colour FISH (right column) with 45S rDNA (red, arrows) and 5S rDNA (green, arrowheads) probes on (A,B) *L. costata*, (C,D) *M. guentheri*, (E,F) *N. binotatus*, (G,H) *P. pictilis*, (I,J) *P. brevis*, (K,L) *P. lucidorsum*, (M,N) *S. bolavenensis*, (O,P) *S. corica*, (Q,R) *S. hypsiura*, (S,T) *S. pridii*, (U,V) *S. lendlii*, (W) *S. savona*. The FISH chromosomes were counterstained with DAPI and the images were converted to grayscale. Inset (D) – chromosome pair 18 from *M. guentheri* female showing absence of heterochromatic p-arm in contrast to a single homologue in the male karyotype. Inset (V) depicts the absence of a 45S rDNA site on one homologue in female (pair 3). In *P. brevis* (J), note the syntenical association of both rDNAs on pair 13. Note also the intense size polymorphism in *S. bolavenensis* (pair 1) (N) and *S. corica* (pair 7) (P). Additional polymorphic rDNA sites from the other specimen are boxed for *S. corica* (pairs 7 and 17) (P) and *S. hypsiura* (pair 18) (R). Bar = 10 µm. (ZIP 2482 kb)

**Additional file 8: Figure S4.** Karyotypes of *S. notostigma* after different cytogenetic protocols. (A-D) karyomorph with 44 chromosomes, (E,F) karyomorph with 48 chromosomes. (A,E) conventional Giemsa staining, (C) C-banding, (B,D,F) dual-colour FISH with 45S rDNA (red, arrows) and 5S rDNA (green, arrowheads) probes. Arrangement of st-a chromosome pairs 18 and 19 (E,F) demonstrates a putative origin (centric fusion) of metacentric chromosome pair 2 (A-D). Note also chromosome pairs heterozygous for presence/absence of 45S rDNA site (pair 12) (D) or 5S rDNA site (pair 22) (F). Finally, notice conspicuous regions of constitutive heterochromatin located in centromeres of metacentric pairs 1 and 2 and those located intercalarily on q-arms of sm chromosome pairs 11, 13, 14, 15, 17. Bar = 10 µm. (TIF 540 kb)

**Additional file 9: Table S4.** Distribution of AT- and GC-rich sites and its relation to constitutive heterochromatin and rDNA regions in nemacheilid genomes as inferred from C-banding, DAPI- and CMA3-stainings. Species order reflects their phylogenetic relationships. (XLSX 13 kb)

**Additional file 10: Figure S5.** Mitotic metaphases of selected nemacheilid species after CDD banding. (A) *L. costata*, (B) *P. zonalternans*, (C) *P. sp.*, (D) *P. lucidorsum*, (E) *S. fasciolata*, (F) *S. hypsiura*, (G) *S. notostigma* (karyomorph with 48 chromosomes) (H) *S. pridii*, (I) *S. savona*, (J) *S. lendlii*. Pictures were pseudocoloured in red (for CMA<sub>3</sub>) and green (for DAPI). Bar = 10 µm. (TIF 2549 kb)

**Additional file 11: Figure S6.** Karyotypes of *P. zonalternans* and *P. elongata* after Giemsa staining and dual-colour (5S/45S) rDNA FISH. 45S rDNA (red, arrows) and 5S rDNA (green, arrowheads) probes on (A,B) *P. zonalternans* and (C,D) *P. elongata*. Insets – chromosomes showing co-localization of 45S and 5S rDNA – *P. zonalternans*, pair 12 (B); *P. elongata* pairs 4, 12 (D). For clarity, chromosomes are arranged as separated images for each rDNA probe. Note also the heterozygosity for inverted 45S rDNA locus – *P. zonalternans*, pair 10 (B); *P. elongata*, pair 5 (D). The asterisk denotes a missing chromatid in one homologue of chromosome pair 25 in *P. elongata* (D). Bar = 10 µm. (TIF 522 kb)

**Additional file 12: Figure S7.** Mitotic metaphases of selected nemacheilid species after TSA FISH with telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> probe. (A) *L. costata*, (B) *P. brevis*, (C) *P. lucidorsum*, (D) *S. notostigma* (karyomorph with 48 chromosomes). Chromosomes with the telomeric repeat probe (green) are counterstained with DAPI, pseudocoloured in red for better contrast. Bar = 10 µm. (TIF 785 kb)

#### Abbreviations

AT: Adenine-thymine; CMA<sub>3</sub>: Chromomycin A<sub>3</sub>; BSA: Bovine serum albumin; *cyt b*: Cytochrome b; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; DAPI/CMA<sub>3</sub><sup>+/−</sup>: DAPI/CMA<sub>3</sub> positive/negative signals; FISH: Fluorescence in situ hybridization; FITC: Fluorescein isothiocyanate; GC: Guanine-cytosine; GIRI: Genetic information research institute; het-ITSs: Heterochromatic

interstitial telomeric sequences; IAPG: Institute of Animal Physiology and Genetics; IGS: Intergenic spacer; *IRBP*: Interphotoreceptor retinoid-binding protein; ITSs: Interstitial telomeric sequences; LTR: long terminal repeat; NF: Nombre fundamental; NOR: Nucleolar organizer region; NTS: Non-transcribed spacer; PCR: Polymerase chain reaction; *RAG1*: Recombination-activating gene 1; rDNA: Ribosomal DNA; RTEs: Retrotransposable elements; SSC: Standard saline buffer; TES: Transposable elements; TSA: Tyramid signal amplification; 2n: Diploid chromosome number.

#### Competing interests

There are no competing interests to declare.

#### Authors' contributions

AS prepared chromosome preparations, performed all C-banding, CDD-banding procedures, designed and performed probe preparations and FISH experiments and co-drafted the manuscript. JB managed, raised and identified specimens material and contributed to chromosome preparations. VŠ managed the specimens material and performed all phylogenetic analyses. MA performed digital processing of all images. RS partly contributed to 5S rDNA probe preparation, design of FISH experiments and digital processing of images. PR designed the study and co-drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

We would like to thank J. Freyhof, R. Hoyer, G. Ott, I. Seidel and K. Udomritthiruji for their help obtaining specimens. We are also grateful to K. Ocálewicz and M.B. Cioffi for useful discussions and inspiring comments and further to A.-M. Dion-Côté and C. S. A. Pereira for technical suggestions. We are thankful also to J. Čechová, P. Šejnohová and Š. Pelikánová for laboratory assistance and to C. Johnson for reading the manuscript and language corrections. The study was carried out with the financial support from the Czech Science Foundation (grant no. 206/08/0637) and with the institutional support RVO: 67985904.

#### Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, Liběchov 277 21, Czech Republic. <sup>2</sup>Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic. <sup>3</sup>Department of Ecology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic. <sup>4</sup>Research Institute for Limnology, University of Innsbruck, Mondseestraße 9, A-5310 Mondsee, Austria.

Received: 9 June 2015 Accepted: 4 November 2015

Published online: 14 November 2015

#### References

- Nelson JS. Fishes of the world. 4th ed. Hoboken: Wiley; 2006.
- Saitoh K, Sado T, Doosey MH, Bart Jr HL, Inoue JG, Nishida M, et al. Evidence from mitochondrial genomics supports the lower Mesozoic of South Asia as the time and place of basal divergence of cypriniform fishes (Actinopterygii: Ostariophysii). *Zool J Linn Soc.* 2011;161:633–62.
- Kottelat M. Conspectus cobitidum: an inventory of loaches of the world (Teleostei: Cypriniformes: Cobitoidei). *Raffles Bull Zool.* 2012;Suppl 26:1–199.
- Bohlen J, Völker M, Rábová M, Ráb P. Note on the banded karyotype of the enigmatic South Asian loach *Vaillantella maassi* (Cypriniformes: Vaillantellidae). *Ichthyol Res.* 2008;55:82–4.
- Šlechtová V, Bohlen J, Freyhof J, Ráb P. Molecular phylogeny of the Southeast Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of polyploidy in their evolution. *Mol Phylogenet Evol.* 2006;39:529–41.
- Saitoh K, Chen W-J, Mayden RL. Extensive hybridization and tetraploidy in spined loach fish. *Mol Phylogenet Evol.* 2010;56:1001–10.
- Arai R. Fish karyotypes: a check list. 1st ed. Tokyo: Springer Japan; 2011.
- Vasil'eva ED, Vasil'ev VP. Sibling species in genus *Cobitis* (Cobitidae). *Cobitis rossomerdionalis* sp. nova. *J Ichthyol.* 1998;38:580–90.
- Bohlen J, Ritterbusch D. Which factors affect sex ratio of spined loach (genus *Cobitis*) in lake Müggelsee? *Environ Biol Fishes.* 2000;59:347–52.

10. Bohlen J, Ráb P. Species and hybrid richness in spined loaches of the genus *Cobitis* (Teleostei: Cobitidae), with a checklist of European forms and suggestions for conservation. *J Fish Biol.* 2001;59(Suppl A):75–89.
11. Bănărescu P. Zoogeography of fresh waters, Distribution and dispersal of freshwater animals in North America and Eurasia, vol. 2. Wiesbaden: AULA-Verlag GmbH; 1992.
12. Gaffaroglu M, Karasu M, Unal S. Karyotype of river loach *Turcinoemacheilus kosswigi* Bănărescu and Nalbant, 1964 (Cypriniformes, Balitoridae) from the Euphrates river, Turkey. *J Agric Sci Technol.* 2012;14:821–6.
13. Kumar R, Sahoo PK, Vishwanath W, Barat A. Karyotype of a new loach *Schistura obliquofascia* and a mahseer *Puntius chelynooides* from Kumaun Hills of Himalaya. *Cytologia.* 2014;79:243–6.
14. Esmaeili HR, Pirvar Z, Ebrahimi M, Geiger MF. Karyological and molecular analysis of three endemic loaches (Actinopterygii: Cobitoidea) from Kor River basin, Iran. *Mol Biol Res Commun.* 2015;4:1–13.
15. Boroní A. Chromosome banding studies of *Noemacheilus barbatulus* (Linnaeus, 1758) from Poland. *Caryologia.* 1995;48:239–46.
16. Mazik EY, Toktosunov AT. The karyotypes of three species of loaches of the genus *Nemacheilus* Hasselt (Cypriniformes, Cobitidae). *Tsitologiya.* 1984;26:960–2.
17. Suzuki A. Chromosome and DNA studies of eight species in the family Cobitidae (Pisces, Cypriniformes). *La Kromosoma* II. 1992;67/68:2275–82.
18. Khuda-Bukhsh AR, Chanda T, Barat A. Karyomorphology and evolution in some Indian hillstream fishes with particular reference to polyploidy in some species. In: Uyeno T, Arai R, Taniuchi T, Matsuura K, editors. Indo-Pacific fish biology. Tokyo: Ichthyological Society of Japan; 1986. p. 886–98.
19. Yu XJ, Zhou T, Li YC, Li K, Zhou M, editors. Chromosomes of Chinese freshwater fishes. Beijing: Science Press; 1989 (In Chinese).
20. Cui J, Ren X, Yu Q. Nuclear DNA content variation in fishes. *Cytologia.* 1991;56:425–9.
21. Collares-Pereira MJ, Madeira JM, Ráb P. Spontaneous triploidy in the stone loach *Noemacheilus barbatulus* (Balitoridae). *Copeia.* 1995;2:483–4.
22. Völker M, Sonnenberg R, Ráb P, Kullmann H. Karyotype differentiation in *Chromaphysemon* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). II: cytogenetic and mitochondrial DNA analyses demonstrate karyotype differentiation and its evolutionary direction in *C. riggenbachi*. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115:70–83.
23. Völker M, Ráb P. Direct chromosome preparation from regenerating fin tissue. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, de Almeida Toledo LF, editors. Fish cytogenetic techniques: Ray-Fin fishes and chondrichthyans. Enfield: CRC Press, Inc.; 2015. p. 37–41. ISBN 9781482211986.
24. Haaf T, Schmid M. An early stage of ZZ/ZW sex chromosomes differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma.* 1984;89:37–41.
25. Behr W, Honikel K, Hartmann G. Interaction of the RNA polymerase inhibitor chromomycin with DNA. *Eur J Biochem.* 1969;9:82–92.
26. Kapuściński J, Szer W. Interactions of 4',6-diamidino-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1979;6:3519–34.
27. Mayr B, Ráb P, Kalat M. Localisation of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica.* 1985;67:51–6.
28. Sola L, Rossi AR, Iaselli V, Rasch EM, Monaco PJ. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A<sub>3</sub> and silver staining. *Cytogenet Cell Genet.* 1992;60:229–35.
29. Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 1980;36:1014–5.
30. Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.* 1964;52:201–20.
31. Graham DE. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. *Anal Biochem.* 1978;85:609–13.
32. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403–10. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Accessed 23 Apr 2014.
33. Neusser M. Karyotypenentwicklung, genomorganisation und zellkernarchitektur der neuweltaffen, PhD Thesis. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2004.
34. Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:4780.
35. Cremer M, Grasser F, Lanctôt C, Müller S, Neusser M, Zinner R, et al. Multicolor 3D fluorescence *in situ* hybridization for imaging interphase chromosomes. *Methods Mol Biol.* 2008;463:205–39.
36. Šlechťová V, Bohlen J, Tan HH. Families of Cobitoidea (Teleostei; Cypriniformes) as revealed from nuclear genetic data and the position of the mysterious genera *Barbucca*, *Psilorhynchus*, *Serpenticobitis* and *Vaillantella*. *Mol Phylogenet Evol.* 2007;44:1358–65.
37. Chen W-J, Miya M, Saitoh K, Mayden RL. Phylogenetic utility of two existing and four novel nuclear gene loci in reconstructing Tree of Life of ray-finned fishes: the order Cypriniformes (Ostariophysi) as a case study. *Gene.* 2008;423:125–34.
38. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/96/NT. *Nucleic Acids Res.* 1999;41:95–8. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Accessed 21 Apr 2014.
39. Farris JS, Källrjö M, Kluge AG, Butt C. Testing significance of incongruence. *Cladistics.* 1994;10:315–9.
40. Swofford DL. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), v. 4.0 b10. Sunderland: Sinauer Associates; 2002.
41. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank Nucleic Acids Res. 2012;41:D36–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Accessed 9 May 2015.
42. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19:1572–4.
43. Jurka J, Kapitonov VV, Pavlíček A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res.* 2005;110:462–7. [www.girinst.org](http://www.girinst.org). Accessed 23 Apr 2014.
44. Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:7049–53.
45. Bănărescu P, Nalbant TT. A general classification of Nemacheilinae with description of two new genera (Teleostei: Cypriniformes: Cobitidae). *Travaux du Museum d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa"*, vol. 35. 1995. p. 429–96.
46. Prokofiev AM. Morphological classification of loaches (Nemacheilinae). *J Ichthyol.* 2010;50:827–913.
47. Kottelat M. Indochinese Nemacheilines, a revision of nemacheiline loaches (Pisces: Cypriniformes) of Thailand, Burma, Laos, Cambodia and southern Viet Nam. München: Pfeil; 1990. p. 1–262.
48. Vasil'ev VP. Evolutionary karyology of fishes. Moscow: Nauka Press; 1985 (In Russian).
49. Rishi KK, Sharma MP, Mankoti R. Somatic chromosomes of three Indian teleosts. *Matsya.* 1977;3:6–9.
50. Kim IS, Lee EH, Son YM. Morphological variation and geographic distribution of two species of Nemacheiline loaches (Pisces, Cobitidae) from Korea. *Korean J Zool.* 1988;31:283–94 (In Korean with English abstract).
51. Klinkhardt M, Tesche M, Greven H. Database of fish chromosomes. Magdeburg: Westarp Wissenschaften; 1995.
52. Mank JE, Avise JC. Phylogenetic conservation of chromosome numbers in Actinopterygian fishes. *Genetica.* 2006;127:321–7.
53. Ohno S. Evolution by gene duplication. New York: Springer; 1970.
54. Kohn M, Höggel J, Vogel W, Minich P, Kehr-Swatzki H, Graves JAM, et al. Reconstruction of a 450-My-old ancestral vertebrate protokaryotype. *Trends Genet.* 2006;22:203–10.
55. Matthey R. L' evolution de la formule chromosomiale chez les vertebrees. *Experientia.* 1945;1:50–6. 78–86.
56. Hoffmann AA, Rieseberg LH. Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? *Annu Rev Ecol Syst.* 2008;39:21–42.
57. Faria R, Navarro A. Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol Evol.* 2010;25:660–9.
58. Guerrero RF, Kirkpatrick M. Local adaptation and the evolution of chromosome fusions. *Evolution.* 2014;68:2747–56.
59. Cioffi MB, Bertollo LAC. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: Garrido-Ramos MA, editor. Repetitive DNA, Genome Dyn, vol. 7. 2012. p. 197–221.
60. King M. Species evolution: the role of chromosome change. Cambridge: University Press; 1993.
61. Hale DW, Greenbaum IF. Synopsis of a chromosomal pair heterozygous for a pericentric inversion and the presence of a heterochromatic short arm. *Cytogenet Cell Genet.* 1988;48:55–7.
62. Völker M, Sonnenberg R, Ráb P, Kullmann H. Karyotype differentiation in *Chromaphysemon* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). III:



- extensive karyotypic variability associated with low mitochondrial haplotype differentiation in *C. bivittatum*. *Cytogenet Genome Res.* 2007;116:116–26.
63. Schmid M, Guttenbach M. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma.* 1988;97:101–14.
  64. Ráb P, Rábová M, Reed KM, Phillips RB. Chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the primitive semionotiform fish, longnose gar *Lepisosteus osseus*. *Chromosome Res.* 1999;7:475–80.
  65. Fontana F, Tagliavini J, Congiu L. Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives. *Genetica.* 2001;111:359–73.
  66. Pendás AM, Morán P, García-Vázquez E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet Cell Genet.* 1993;63:128–30.
  67. Morescalchi MA, Liguori I, Rocco L, Stingo V. Karyotypic characterization and genomic organization of the 5S rDNA in *Erpetoichthys calabaricus* (Osteichthyes, Polypteridae). *Genetica.* 2007;131:209–16.
  68. Deiana AM, Cau A, Salvadori S, Coluccia E, Cannas R, Milia A, et al. Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Perciformes, Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome. *Chromosome Res.* 2000;8:213–8.
  69. Affonso PRAM, Galetti Jr PM. Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica.* 2005;123:227–33.
  70. de Lima-Filho PA, Bertollo LAC, Gioffi MB, Costa GWWF, Molina WF. Karyotype divergence and spreading of 5S rDNA sequences between genomes of two species: darter and emerald gobies (*Ctenogobius*, Gobiidae). *Cytogenet Genome Res.* 2014;142:197–203.
  71. Caputo V, Marchegiani F, Sorice M, Olmo E. Heterochromatin heterogeneity and chromosome variability in four species of gobiid fishes (Perciformes: Gobiidae). *Cytogenet Cell Genet.* 1997;79:266–71.
  72. Ene AC. Chromosomal polymorphism in the goby *Neogobius eurycephalus* (Perciformes: Gobiidae). *Mar Biol.* 2003;142:583–8.
  73. Morescalchi MA, Stingo V, Capriglione T. Cytogenetic analysis in *Polypterus ornatipinnis* (Actinopterygii, Cladistia, Polypteridae) and 5S rDNA. *Mar Genomics.* 2011;4:25–31.
  74. Rábová M, Ráb P, Boroň A, Bohlen J, Janko K, Šlechťová V, et al. Cytogenetics of bisexual species and their asexual hybrid clones in European spined loaches, genus *Cobitis*. I. Karyotypes and extensive polymorphism of major ribosomal sites in four parental species. Abstracts of 16th European colloquium on animal cytogenetics and gene mapping. *Cytogenet Genome Res.* 2004;106:1–24.
  75. Gromicho M, Ozouf-Costaz C, Collares-Pereira MJ. Lack of correspondence between CMA<sub>3</sub>-, Ag-positive signals and 28S rDNA loci in two Iberian minnows (Teleostei, Cyprinidae) evidenced by sequential banding. *Cytogenet Genome Res.* 2005;109:507–11.
  76. Gornung E. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: a review of research. *Cytogenet Genome Res.* 2013;141:90–102.
  77. Hastie ND, Allshire RC. Human telomeres: fusion and interstitial sites. *Trends Genet.* 1989;5:326–31.
  78. Redi CA, Garagna S, Della Valle G, Bottiroli G, Dell'Orto P, Viale G, et al. Differences in the organization and chromosomal allocation of satellite DNA between the European long tailed house mice *Mus domesticus* and *Mus musculus*. *Chromosoma.* 1990;99:11–7.
  79. Molina WF, Galetti Jr PM. Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5 s rRNA genes. *Genet Mol Biol.* 2002;25:373–7.
  80. Rosa KO, Ziemniczak K, de Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, et al. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol Fish.* 2012;22:739–49.
  81. Morán P, Martínez JL, García-Vázquez E, Pendás AM. Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet Cell Genet.* 1996;75:145–50.
  82. Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture.* 2002;208:191–364.
  83. Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotoxicological considerations. *Chromosome Res.* 2000;8:603–13.
  84. Centofante L, Bertollo LAC, Moreira-Filho O. Cytogenetic characterization and description of an XXXY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res.* 2006;112:320–4.
  85. de Oliveira RR, Feldberg E, dos Anjos MB, Zuanon J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XXXY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> and Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica.* 2008;134:243–9.
  86. Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F. Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma.* 1999;108:173–80.
  87. Meyne J, Baker JR, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, et al. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma.* 1990;99:3–10.
  88. Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res.* 2008;122:219–28.
  89. Ocallewicz K. Telomeres in fishes. *Cytogenet Genome Res.* 2013;141:114–25.
  90. Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y. Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leptosoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas.* 1999;131:15–21.
  91. Ocallewicz K, Furgala-Selezniow G, Szmyt M, Lisboa R, Kucinski M, Lejk AM, et al. Pericentromeric location of the telomeric DNA sequences on the European grayling chromosomes. *Genetica.* 2013;141:409–16.
  92. Slijepcevic P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma.* 1998;107:136–40.
  93. Garrido-Ramos MA, de la Herrán R, Rejón CR, Rejón CR. A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenet Cell Genet.* 1998;83:3–9.
  94. Gioffi MB, Martins C, Bertollo LAC. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol Biol.* 2010;10:271.
  95. Guillén AKZ, Hirai Y, Tanoue T, Hirai H. Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees. *Chromosome Res.* 2004;12:225–37.
  96. Amemiya CT, Gold JR. Chromosomal NORs as taxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes. *Genetica.* 1988;76:81–90.
  97. Rábová M, Ráb P, Ozouf-Costaz C. Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in a loach fish, *Cobitis vardarensis* (Ostariophysi, Cobitidae) detected by different banding techniques and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetica.* 2001;111:413–22.
  98. Boron A, Ozouf-Costaz C, Coutanceau J-P, Woroniecka K. Gene mapping of 28S and 5S rDNA sites in the spined loach *Cobitis taenia* (Pisces, Cobitidae) from a diploid population and a diploid-tetraploid population. *Genetica.* 2006;128:71–9.
  99. Gromicho M, Coutanceau J-P, Ozouf-Costaz C, Collares-Pereira MJ. Contrast between extensive variation of 28S rDNA and stability of 5S rDNA and telomeric repeats in the diploid-polyploid *Squalius alburnoides* complex and in its maternal ancestor *Squalius pyrenaicus* (Teleostei, Cyprinidae). *Chromosome Res.* 2006;14:297–306.
  100. Pereira CSA, Aboim MA, Ráb P, Collares-Pereira MJ. Introgressive hybridization as a promoter of genome reshuffling in natural homoploid fish hybrids (Cyprinidae, Leuciscinae). *Hereditas.* 2014;112:343–50.
  101. Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJP, Britton-Davidian J. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol.* 2011;11:124.
  102. Pedrosa-Harand A, de Almeida CCS, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor Appl Genet.* 2006;112:924–33.
  103. Milhomem SSR, Scacchetti PC, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA, Pansonato-Alves JC, O'Brien PCM, et al. Are NORs always located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnatus* fishes (Gymnotiformes). *PLoS One.* 2013;8:e55608.
  104. Miller DA, Dev VG, Tantravahi R, Miller O. Suppression of human nucleolar organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp Cell Res.* 1976;101:235–43.
  105. Martins C, Wasko AP. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR, editor. *Focus on genome research*. Hauppauge: Nova; 2004. p. 335–63.
  106. Mantovani M, Abel LDS, Moreira-Filho O. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica.* 2005;123:211–6.

107. Martins C, Galetti Jr PM. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*. 2001;111:439–46.
108. Martins C, Galetti Jr PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Lepomis* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res*. 1999;7:363–7.
109. Drouin G, de Sá MM. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol*. 1995;12:481–93.
110. Rebordinos L, Cross I, Merlo A. High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: state of the art. *Cytogenet Genome Res*. 2013;141:103–13.
111. Pisano E, Ghigliotti L. Ribosomal genes in notothenioid fishes: focus on the chromosomal organisation. *Mar Genomics*. 2009;2:75–80.
112. Collares-Pereira MJ, Ráb P. NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces: Cyprinidae) – re-examination by FISH. *Genetica*. 1999;105:301–3.
113. Tigano C, Rocco L, Ferrito V, Costagliola D, Pappalardo AM, Stingo V. Chromosomal mapping and molecular characterization of ribosomal RNA genes in *Lebias fasciata* (Teleostei, Cyprinodontidae). *Genetica*. 2004;121:95–100.
114. Eickbush TH, Eickbush DG. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*. 2007;175:477–85.
115. Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res*. 2008;120:351–7.
116. Raskina O, Belyayev A, Nevo E. Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:14818–23.
117. Zhang X, Eickbush MT, Eickbush TH. Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics*. 2008;180:1617–26.
118. da Silva M, Matoso DA, Vicari MR, de Almeida MC, Margarido VP, Artoni RF. Physical mapping of 5S rDNA in two species of knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguayensis* (Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res*. 2011;134:303–7.
119. Nakajima RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Venere PC, Martins C. Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *BMC Evol Biol*. 2012;12:198.
120. Costa GWWF, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF. Transposable elements in fish chromosomes: a study in the marine *Cobia* species. *Cytogenet Genome Res*. 2013;141:126–32.
121. Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, et al. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*. 2013;141:329–36.
122. Symonová R, Majtánová Z, Sember A, Staaks GBO, Bohlen J, Freyhof J, et al. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evol Biol*. 2013;13:42.
123. Ichihyanagi K, Nishihara H, Duvernell DD, Okada N. Acquisition of endonuclease specificity during evolution of L1 retrotransposon. *Mol Biol Evol*. 2007;24:2009–15.
124. Gibbons JG, Branco AT, Yu S, Lemos B. Ribosomal DNA copy number is coupled with gene expression variation and mitochondrial abundance in humans. *Nat Commun*. 2014;5:4850.
125. Gibbons JG, Branco AT, Godinho SA, Yu S, Lemos B. Concerted copy number variation balances ribosomal DNA dosage in human and mouse genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:2485–90.
126. Chénais B, Caruso A, Hiard S, Casse N. The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: from genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. *Gene*. 2012;509:7–15.
127. Casacuberta E, González J. The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Mol Ecol*. 2013;22:1503–17.
128. Ozouf-Costaz C, Brandt J, Körting C, Pisano E, Bonillo C, Coutanceau J-P, et al. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. *Antarct Sci*. 2004;16:51–7.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



1 **Additional file 1**

2 **Supplementary Methods**

3 **1) Taxonomic identification of nemacheilids**

4 Specimens were identified following:

5 [1] Bănărescu P, Nalbant TT. A general classification of Nemacheilinae with description of  
6 two new genera (Teleostei: Cypriniformes: Cobitidae). Travaux du Museum d'Histoire  
7 Naturelle "Grigore Antipa". 1995;35:429–96.

8

9 [2] Bohlen J, Šlechtová V: A new genus and two new species of loaches (Teleostei:  
10 Nemacheilidae) from Myanmar. Ichthyol Explor Freshw. 2011;22:1–10.

11

12 [3] Bohlen J, Šlechtová, V, Udomritthiruj K. *Schistura hypsiura*, a new species of loach  
13 (Cobitoidea: Nemacheilidae) from South-West Myanmar. Raffles Bull Zool. 2014;62:21–  
14 7.

15

16 [4] Kottelat M. Indochinese Nemacheilines, a revision of nemacheiline loaches (Pisces:  
17 Cypriniformes) of Thailand, Burma, Laos, Cambodia and southern Viet Nam. Pfeil,  
18 München. 1990;1–262.

19

20 [5] Kottelat M. Fishes of Laos. Wildlife Heritage Trust: Colombo; 2001

21

22 [6] Menon AGK. The fauna of India and adjacent countries. Pisces. Vol. IV. Teleostei –  
23 Cobitoidea. Part 1. Homalopteridae. Zoological Survey of India, Calcutta. 1987;1–260.

24

25 [7] Singer RA, Page LM. Revision of the zipper loaches, *Acanthocobitis* and *Paracanthocobitis*  
26 (Teleostei: Nemacheilidae), with descriptions of five new species. *Copeia*. 2015;103:378–  
27 401.

28 [8] Vidthayanon C: *Schistura pridii*, a new nemacheiline loach (Teleostei: Balitoridae) from  
29 Upper Chao Phraya drainage, northern Thailand. *Ichthyol Explor Freshw*. 2003;14:307–10.

30

## 31 **2) Preparation of chromosomes from regenerating fin tissue**

32 Briefly, the posterior margin of the caudal fin was cut off and the tissue was used for DNA  
33 extraction. Three weeks later, the regenerated tissue of the fin was collected again and  
34 subsequently incubated in Ringer solution [9] with combined mitostatic (0.025% colchicine)  
35 and hypotonic effect (2h, RT). Next, three rounds of cold fixation with methanol:acetic acid 3:1  
36 (v/v) were performed (25 min at 4°C each). Occasionally, the last fixation step was prolonged  
37 overnight. The fixed fin tissue was minced in 50% acetic acid. The resulting suspension was  
38 dropped onto pre-heated slides (50°C) and excess removed after 20 sec. This non-invasive  
39 technique developed by [10] enabled us to examine very rare and/or very small-sized species  
40 included in the study without sacrificing the individuals.

41

42 [9] Ogawa M, Yagasaki M, Yamazaki F: The effect of prolactin on water influx in isolated gills  
43 of the goldfish, *Carassius auratus* L. *Comp Biochem Physiol*. 1973;44A:1177–83.

44 [10] Völker M, Sonnenberg R, Ráb P, Kullmann H. Karyotype differentiation in  
45 *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). II: cytogenetic  
46 and mitochondrial DNA analyses demonstrate karyotype differentiation and its evolutionary  
47 direction in *C. riggenbachi*. *Cytogenet Genome Res*. 2006;115:70–83.

48

49



50 **3) PCR conditions of 5S and 45S rDNA amplification**

51 Thermal profiles were based on [11] (for 5S rDNA) and [12] (for 45S rDNA). A 50 µl PCR  
52 reaction mix was prepared with 10 µM of each set of primers, 1x Taq buffer with MgCl<sub>2</sub>, 100  
53 ng of template DNA, 2.5U Taq polymerase Unis (Top Bio, Prague, Czech Republic) and 10  
54 mM of each dNTP (Top Bio). Desired fragments were obtained after 35 cycles of amplification  
55 with annealing at 55°C (for 5S rDNA) or 34 cycles with annealing at 53°C (for 45S).

56

57 [11] Alves-Costa FA, Martins C, de Matos FDC, Foresti F, Oliveira C, Wasko AP. 5S rDNA  
58 characterization in twelve Sciaenidae fish species (Teleostei, Perciformes): Depicting gene  
59 diversity and molecular markers. Genet Mol Biol. 2008;31:303–7.

60 [12] Zhang Q, Cooper RK, Tiersch TR. Chromosomal location of the 28S ribosomal RNA gene  
61 of channel catfish by *in situ* polymerase chain reaction. J Fish Biol. 2000;56:388–97.

62

63 **4) PCR conditions of *RAG1*, *IRBP* and *cyt b* amplification**

64 PCR amplifications of *cyt b*, *IRBP* and *RAG1* were performed in 25 µl reaction volumes of 10  
65 mM Tris-HCl, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% of Triton X-100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM TMA  
66 oxalate (PCR enhancer), containing 5 nmol of each nucleotide, 1.25 U of *Taq* polymerase (all  
67 chemicals by Top-Bio) and 12.5 pmol of each primer.

68 The PCR reaction profile for *cyt b* and *RAG1* (carried out on MJ Research  
69 thermocycler) included 5 min of initial denaturation at 95°C, touch-down profile of 1 min at  
70 94°C, 1 min 30 s at 60-55°C (1°C/cycle) and 2 min at 72°C, followed by 30 cycles with  
71 annealing temperature held at 54°C. The reaction was completed by final extension at 72°C  
72 for 7 min. The amplification of *IRBP* consisted of 2 min of initial denaturation at 95°C  
73 followed by 35 cycles each including denaturation step at 94°C for 30s, a primer annealing  
74 step at 59°C and 54°C for primer combinations 101F+1162R and 109F and 1001R,

75 respectively for 30s, and elongation at 72°C for 45s. The PCR was completed by a final  
76 elongation step of 5 min at 72°C.

77

## 78 **Supplementary Discussion**

### 79 **Possible functional consequences of excessive 5S rDNA copies**

80 If so many 5S rDNA copies are present: how is expression regulated in an unbalanced ratio  
81 with 45S rDNA clusters? Although retrotransposed 5S rDNA was proven to stay potentially  
82 functionable [13], there is a high probability that FISH could also label some of the pseudogenic  
83 variants, commonly occurring among different fish species [14]. Alternatively, centromeric  
84 satellite sequences derived from 5S rDNA have been reported in some fishes [15].

85

86 [13] Drouin G: Expressed retrotransposed 5S rRNA genes in the mouse and rat genomes.  
87 Genome. 2000;43:213-5.

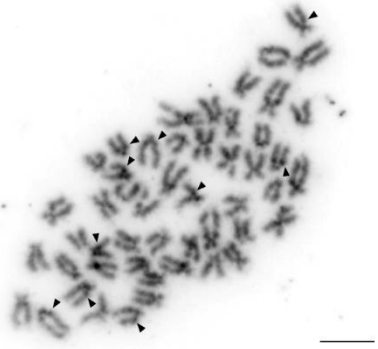
88

89 [14] Martins C, Wasko AP: Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish  
90 genome. In: Williams CR, editor. Focus on genome research. Hauppauge: Nova Science  
91 Publishers; 2004. p.335–63.

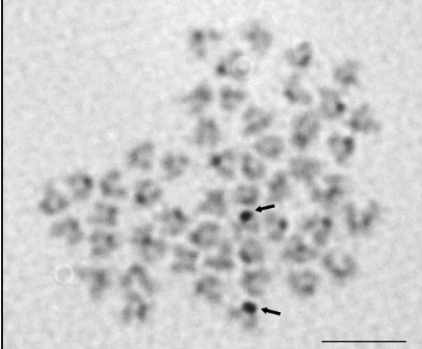
92

93 [15] Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PM Jr. A tandemly repetitive  
94 centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae)  
95 is derived from 5S rDNA. Genetica. 2006;127:133-41.

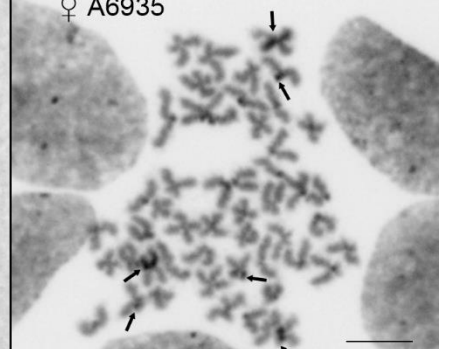
**A** *Barbatula barbatula* A8393



**B** *Lefua costata* ♀ A6943



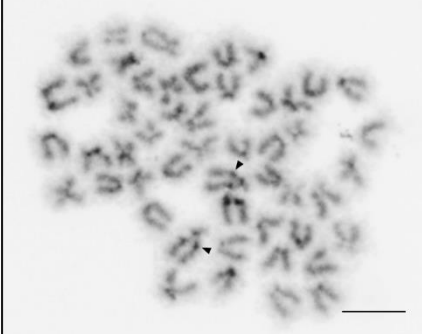
**C** *Mesonoemacheilus guentheri*  
♀ A6935



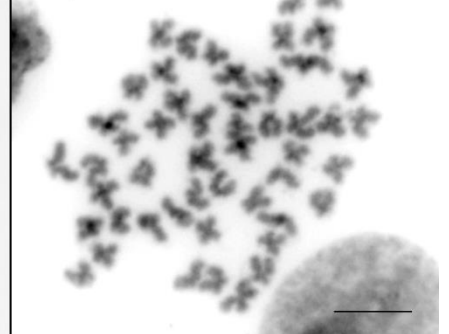
**D** *Mesonoemacheilus guentheri*  
♀ A6935



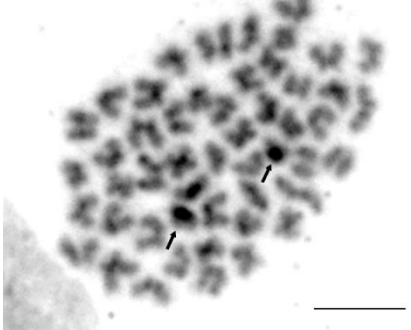
**E** *Nemacheilus binotatus*  
♂ A6926



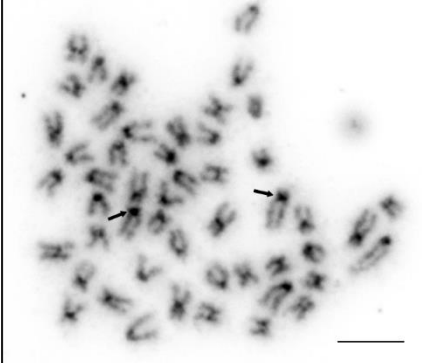
**F** *Paracanthocobitis pictilis*  
♀ A6941



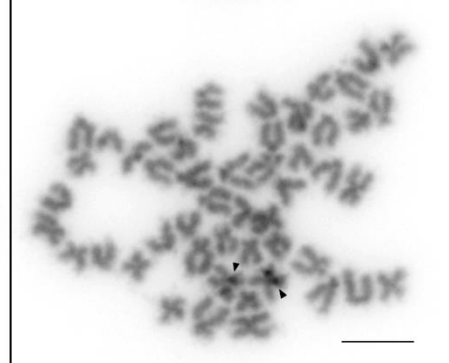
**G** *Paracanthocobitis zonalternans*  
♀ A5332



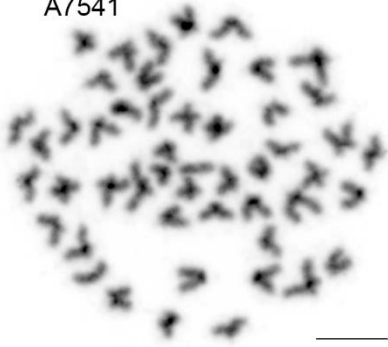
**H** *Petruichthys brevis* ♀ A4184



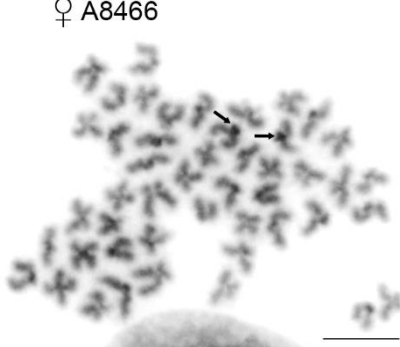
**I** *Physoschistura* sp. A7546



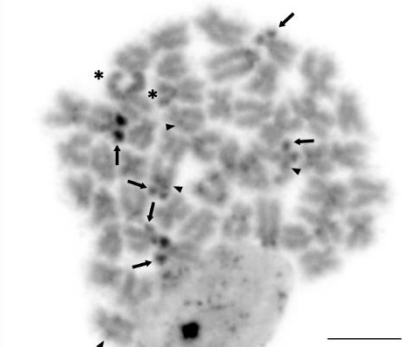
**J** *Physoschistura elongata*  
A7541



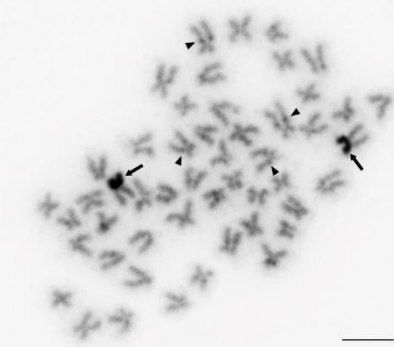
**K** *Pteronemacheilus lucidorsum*  
♀ A8466



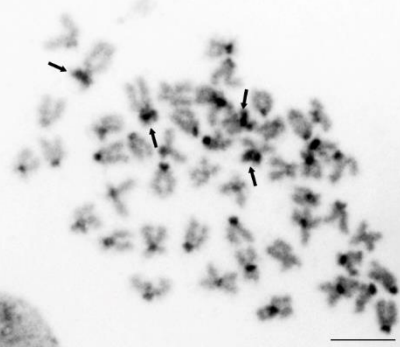
**L** *Schistura bolavenensis* A4618



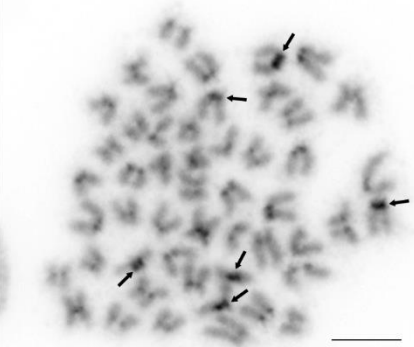
**M** *Schistura corica* ♀ A6948



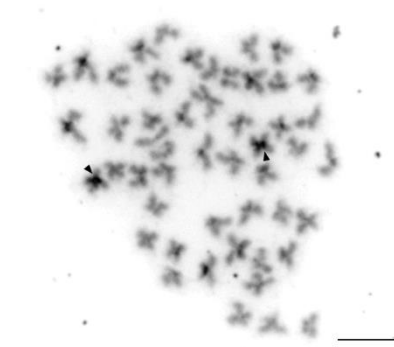
**N** *Schistura hypsiura* ♂ A6222



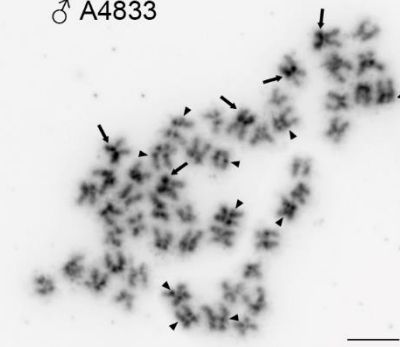
**O** *Schistura pridii* A7549



**P** *Schistura savona* A7532



**Q** *Seminemacheilus lendlii*  
♂ A4833



### **Cytochrome b**

Primer Name	Sequence 5'-3'	Direction	Reference
Glu L.Ca14337-14359:	GAA GAA CCA CCG TTG TTA TTC AA	F	[16]
Thr H.Ca15568-15548:	ACC TCC RAT CTY CGG ATT ACA	R	[16]

### **RAG 1**

Primer Name	Sequence 5'-3'	Direction	Reference
RAG-1F	AGC TGT AGT CAG TAY CAC AAR ATG	F	[17]
RAG-Rv1	TCC TGR AAG ATY TTG TAG AA	R	[18]

### **IRBP**

Primer Name	Sequence 5'-3'	Direction	Reference
IRBP 101F	TCM TGG ACA AYT ACT GCT CAC C	F	[19]
IRBP 109F	AAC TAC TGC TCR CCA GAA AAR C	F	[19]
IRBP 1001R	GGA AAT GCA TAG TTG TCT GCA A	R	[19]
IRBP 1162R	TGG TGG WCT TYA GGC ACT TGT	R	[19]

### **5S rRNA**

Primer Name	Sequence 5'-3'	Direction	Reference
5SA	TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC	F	[20]
5SB	CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC	R	[20]

### **28S rRNA**

Primer Name	Sequence 5'-3'	Direction	Reference
28SA	AAA CTC TGG TGG AGG TCC GT	F	[21]
28SB	CTT ACC AAA AGT GGC CCA CTA	R	[21]

- [16] Šlechtová V, Bohlen J, Freyhof J, Ráb P. Molecular phylogeny of the Southeast Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of polyploidy in their evolution. *Mol Phylogenet Evol.* 2006;39:529-41.
- [17] Quenouille B, Bermingham E, Planes S: Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei : Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2004;31:66-88.
- [18] Šlechtová V, Bohlen J, Tan HH: Families of Cobitoidea (Teleostei; Cypriniformes) as revealed from nuclear genetic data and the position of the mysterious genera *Barbucca*, *Psilorhynchus*, *Serpenticobitis* and *Vaillantella*. *Mol Phylogenet Evol.* 2007;44:1358-65.
- [19] Chen, W-J, Miya M, Saitoh K, Mayden RL: Phylogenetic utility of two existing and four novel nuclear gene loci in reconstructing Tree of Life of ray-finned fishes: The order Cypriniformes (Ostariophysi) as a case study. *Gene.* 2008;423:125-34.
- [20] Martins C, Galetti PM: Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.* 1999;7:363-7.
- [21] Naito E, Dewa K, Yamanouchi H, Kominami R: Ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene typing for species identification. *Journal of Forensic Science.* 1992;37:396–403.

Table S2 GenBank accession numbers of *cyt b*, *IRBP* and *RAG1* sequences.

Voucher ID	Taxon	GenBank Acc. No. <i>IRBP</i> 2	GenBank Acc. No. <i>RAG</i> 1	GenBank Acc. No. <i>cytochrome b</i>			
A4184	<i>Petruichthys brevis</i>	BankIt1797300 A4184	KP738491	BankIt1797337 A4184	KP738531	BankIt1797562 A4184	KP738571
A4185	<i>Petruichthys brevis</i>	BankIt1797300 A4185	KP738492	BankIt1797337 A4185	KP738532	BankIt1797562 A4185	KP738572
A4341	<i>Nemachilichthys ruppelli</i>	BankIt1797300 A4341	KP738493	BankIt1797337 A4341	KP738533	BankIt1797562 A4341	KP738573
A4345	<i>Nemachilichthys ruppelli</i>	BankIt1797300 A4345	KP738494	BankIt1797337 A4345	KP738534	BankIt1797562 A4345	KP738574
A4618	<i>Schistura bolavenensis</i>	BankIt1797300 A4618	KP738495	BankIt1797337 A4618	KP738535	BankIt1797562 A4618	KP738575
A4620	<i>Schistura bolavenensis</i>	BankIt1797300 A4620	KP738496	BankIt1797337 A4620	KP738536	BankIt1797562 A4620	KP738576
A4833	<i>Seminemacheilus lendlii</i>	BankIt1797300 A4833	KP738497	BankIt1797337 A4833	KP738537	BankIt1797562 A4833	KP738577
A4834	<i>Seminemacheilus lendlii</i>	BankIt1797300 A4834	KP738498	BankIt1797337 A4834	KP738538	BankIt1797562 A4834	KP738578
A5300	<i>Schistura fasciolata</i>	BankIt1797300 A5300	KP738499	BankIt1797337 A5300	KP738539	BankIt1797562 A5300	KP738579
A5301	<i>Schistura fasciolata</i>	BankIt1797300 A5301	KP738500	BankIt1797337 A5301	KP738540	BankIt1797562 A5301	KP738580
A5302	<i>Schistura fasciolata</i>	BankIt1797300 A5302	KP738501	BankIt1797337 A5302	KP738541	BankIt1797562 A5302	KP738581
A5331	<i>Paracanthocobitis zonalternans</i>	BankIt1797300 A5331	KP738502	BankIt1797337 A5331	KP738542	BankIt1797562 A5331	KP738582
A5332	<i>Paracanthocobitis zonalternans</i>	BankIt1797300 A5332	KP738503	BankIt1797337 A5332	KP738543	BankIt1797562 A5332	KP738583
A6922	<i>Schistura hypsiura</i>	BankIt1797300 A6922	KP738504	BankIt1797337 A6922	KP738544	BankIt1797562 A6922	KP738584
A6925	<i>Schistura hypsiura</i>	BankIt1797300 A6925	KP738505	BankIt1797337 A6925	KP738545	BankIt1797562 A6925	KP738585
A6926	<i>Nemacheilus binotatus</i>	BankIt1797300 A6926	KP738506	BankIt1797337 A6926	KP738546	BankIt1797562 A6926	KP738586
A6927	<i>Nemacheilus binotatus</i>	BankIt1797300 A6927	KP738507	BankIt1797337 A6927	KP738547	BankIt1797562 A6927	KP738587
A6935	<i>Mesonoemacheilus guentheri</i>	BankIt1797300 A6935	KP738508	BankIt1797337 A6935	KP738548	BankIt1797562 A6935	KP738588
A6940	<i>Paracanthocobitis pictilis</i>	BankIt1797300 A6940	KP738509	BankIt1797337 A6940	KP738549	BankIt1797562 A6940	KP738589
A6941	<i>Paracanthocobitis pictilis</i>	BankIt1797300 A6941	KP738510	BankIt1797337 A6941	KP738550	BankIt1797562 A6941	KP738590
A6942	<i>Lefua costata</i>	BankIt1797300 A6942	KP738511	BankIt1797337 A6942	KP738551	BankIt1797562 A6942	KP738591
A6945	<i>Schistura corica</i>	BankIt1797300 A6945	KP738512	BankIt1797337 A6945	KP738552	BankIt1797562 A6945	KP738592
A6948	<i>Schistura corica</i>	BankIt1797300 A6948	KP738513	BankIt1797337 A6948	KP738553	BankIt1797562 A6948	KP738593
A6953	<i>Schistura corica</i>	BankIt1797300 A6953	KP738514	BankIt1797337 A6953	KP738554	BankIt1797562 A6953	KP738594
A7519	<i>Schistura notostigma</i>	BankIt1797300 A7519	KP738515	BankIt1797337 A7519	KP738555	BankIt1797562 A7519	KP738595
A7520	<i>Schistura notostigma</i>	BankIt1797300 A7520	KP738516	BankIt1797337 A7520	KP738556	BankIt1797562 A7520	KP738596
A7521	<i>Schistura notostigma</i>	BankIt1797300 A7521	KP738517	BankIt1797337 A7521	KP738557	BankIt1797562 A7521	KP738597
A7530	<i>Schistura savona</i>	BankIt1797300 A7530	KP738518	BankIt1797337 A7530	KP738558	BankIt1797562 A7530	KP738598
A7532	<i>Schistura savona</i>	BankIt1797300 A7532	KP738519	BankIt1797337 A7532	KP738559	BankIt1797562 A7532	KP738599
A7545	<i>Physoschistura</i> sp.	BankIt1797300 A7545	KP738520	BankIt1797337 A7545	KP738560	BankIt1797562 A7545	KP738600
A7546	<i>Physoschistura</i> sp.	BankIt1797300 A7546	KP738521	BankIt1797337 A7546	KP738561	BankIt1797562 A7546	KP738601
A7548	<i>Schistura pridii</i>	BankIt1797300 A7548	KP738522	BankIt1797337 A7548	KP738562	BankIt1797562 A7548	KP738602
A7549	<i>Schistura pridii</i>	BankIt1797300 A7549	KP738523	BankIt1797337 A7549	KP738563	BankIt1797562 A7549	KP738603
A8393	<i>Barbatula barbatula</i>	BankIt1797300 A8393	KP738524	BankIt1797337 A8393	KP738564	BankIt1797562 A8393	KP738604
A8394	<i>Barbatula barbatula</i>	BankIt1797300 A8394	KP738525	BankIt1797337 A8394	KP738565	BankIt1797562 A8394	KP738605
A8465	<i>Pteronemacheilus lucidorsum</i>	BankIt1797300 A8465	KP738526	BankIt1797337 A8465	KP738566	BankIt1797562 A8465	KP738606
A8466	<i>Pteronemacheilus lucidorsum</i>	BankIt1797300 A8466	KP738527	BankIt1797337 A8466	KP738567	BankIt1797562 A8466	KP738607
A7541	<i>Physoschistura elongata</i>	BankIt1797300 A7541	KP738528	BankIt1797337 A7541	KP738568	BankIt1797562 A7541	KP738608
A7542	<i>Physoschistura elongata</i>	BankIt1797300 A7542	KP738529	BankIt1797337 A7542	KP738569	BankIt1797562 A7542	KP738609
A0054	<i>Botia lohachata</i>	BankIt1797300 A0054	KP738530	BankIt1797337 A0054	KP738570		<b>AY887793*</b>

\*Note: *Botia lohachata* *cytochrome b* has been already deposited to GenBank in 2006 and published in: Šlechtová V, Bohlen J, Freyhof J, Ráb P. Molecular phylogeny of the Southeast Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of polyploidy in their evolution. Mol Phylogenet Evol. 2006;39:529–41.

**Table S3** GenBank accession numbers of 5S and 28S rRNA sequences.

<b>Voucher ID</b>	<b>Taxon</b>		<b>GenBank Acc. No. 5SrDNA</b>		<b>GenBank Acc. No. 45S rDNA</b>
A0425	<i>Botia almorhae</i>	BankIt1823064	KR611604	BankIt1823059	KR611600
A7541	<i>Physoschistura elongata</i>			BankIt1823061	KR611601
A4619	<i>Schistura bolavenensis</i>			BankIt1822868	KR611599
A6952	<i>Schistura corica</i>			BankIt1823062	KR611602
A5301	<i>Schistura fasciolata</i>			BankIt1823063	KR611603



A

Schistura pridii A7548 short GTTCGGGCTG GTTAGTACTT GGATGGGAGA CCGCCTGGGA ATACCAGGTG CTGTAAGCCT TTATCATT  
Schistura pridii A7549 ..... Y..... R.....

Schistura pridii A7548 short TGGCTTTCCT TGATTTTCGTT TTCAACTGAA TT.....TTTAAAG AGCCTGCAGG TCACCGCCTC TTTCGCTTAC  
Schistura pridii A7549 ..... ..

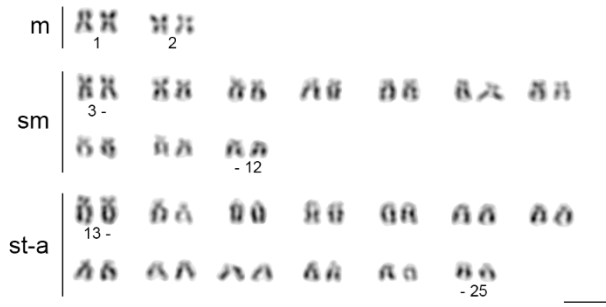
Schistura pridii A7548 short GGCCATACCA GCCTGA  
Schistura pridii A7549 .....

---

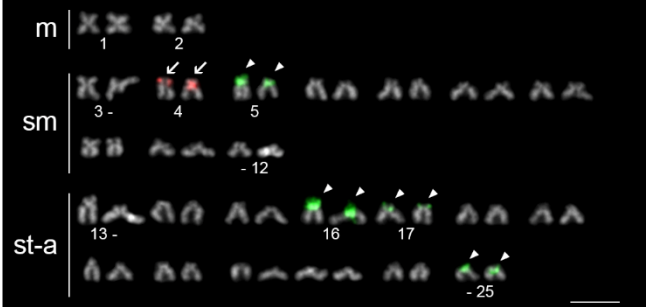
B

Schistura pridii A7548 GYTTCGGGCTG GTYAGTRCTT GGATGGGAGA CCRCCCTGGGA ATACYRGGTG CTGTAAGCCT TTATCATT  
Schistura pridii A7548 TGGCWTTTCCT TGATTTTCGTT TTCAAYTKAT GCCMTTCGCC TACAGGCTCA GTKTTMATTT WTTCATCTCC  
Schistura pridii A7548 ATGCCTAGAC AGCCCAGTGA CTGTTGCTGA RCGAWGTGAG GCTTTTCAA AATCAACGAA ATSAAAGGAT  
Schistura pridii A7548 GAAAGGCATC ATTCCGACTW WGGAWAAACK ARTSGGATAC GCAAAGAAYR AAAACATKW AAAATAATCT  
Schistura pridii A7548 AAAACKCAGT TRTGCTCGCC GCGTCATTC TSRASCGGGC AAGTAAACGG GACATCTGAC GARTGAGAAC  
Schistura pridii A7548 CMTCAWGGGA GTCCCAGGTR AAAGTAAMAT KTTTCTTCCT AATATTAAGC CTGCTCTTGG GACATTCCAA  
Schistura pridii A7548 AMAGAAACCC AAGCAGTGGC WTGAAGGGGA AGAGTCGCRT GGTAGCCGTC CAGCTCTTGG CTAGCTAGGA  
Schistura pridii A7548 WT.....TTTAAAR AKCCTGCAGG TCACMGCCTC TTTCGCTTAC GGCCATACCA GCCTGA

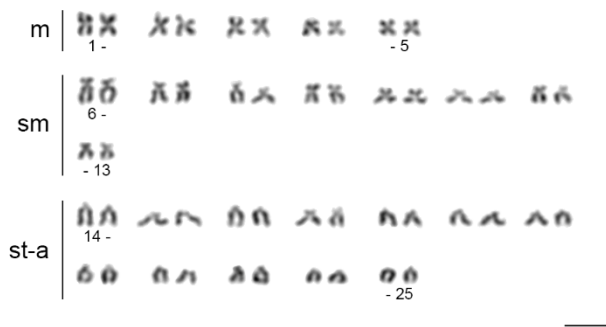
**A** *Lefua costata* ♀ A6942



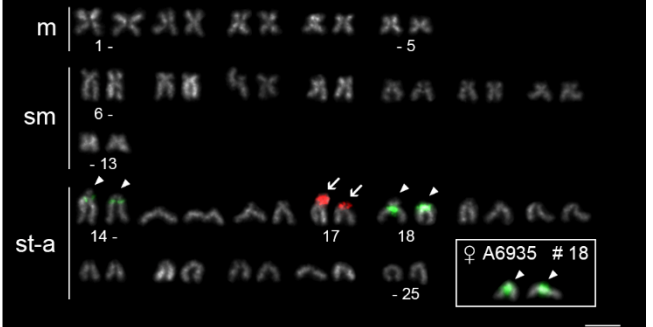
**B** *Lefua costata* ♀ A6942



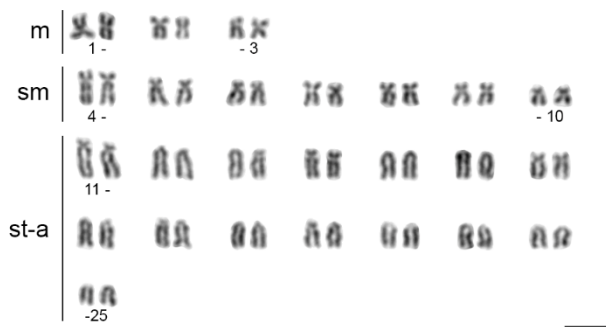
**C** *Mesonoemacheilus guentheri* ♀ A6935



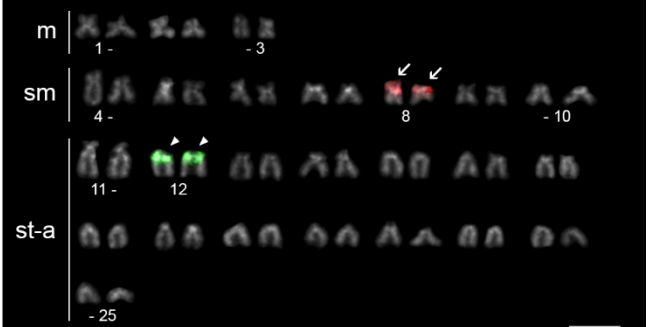
**D** *Mesonoemacheilus guentheri* ♂ A6934



**E** *Nemacheilus binotatus* ♀ A6927



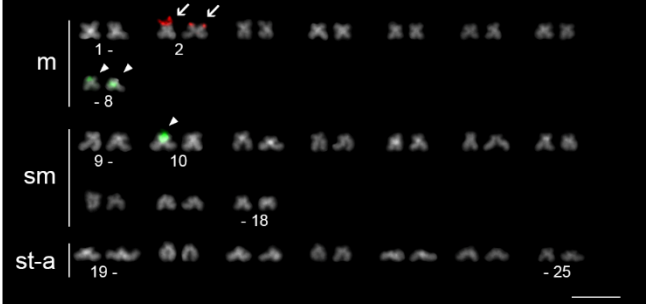
**F** *Nemacheilus binotatus* ♂ A6926

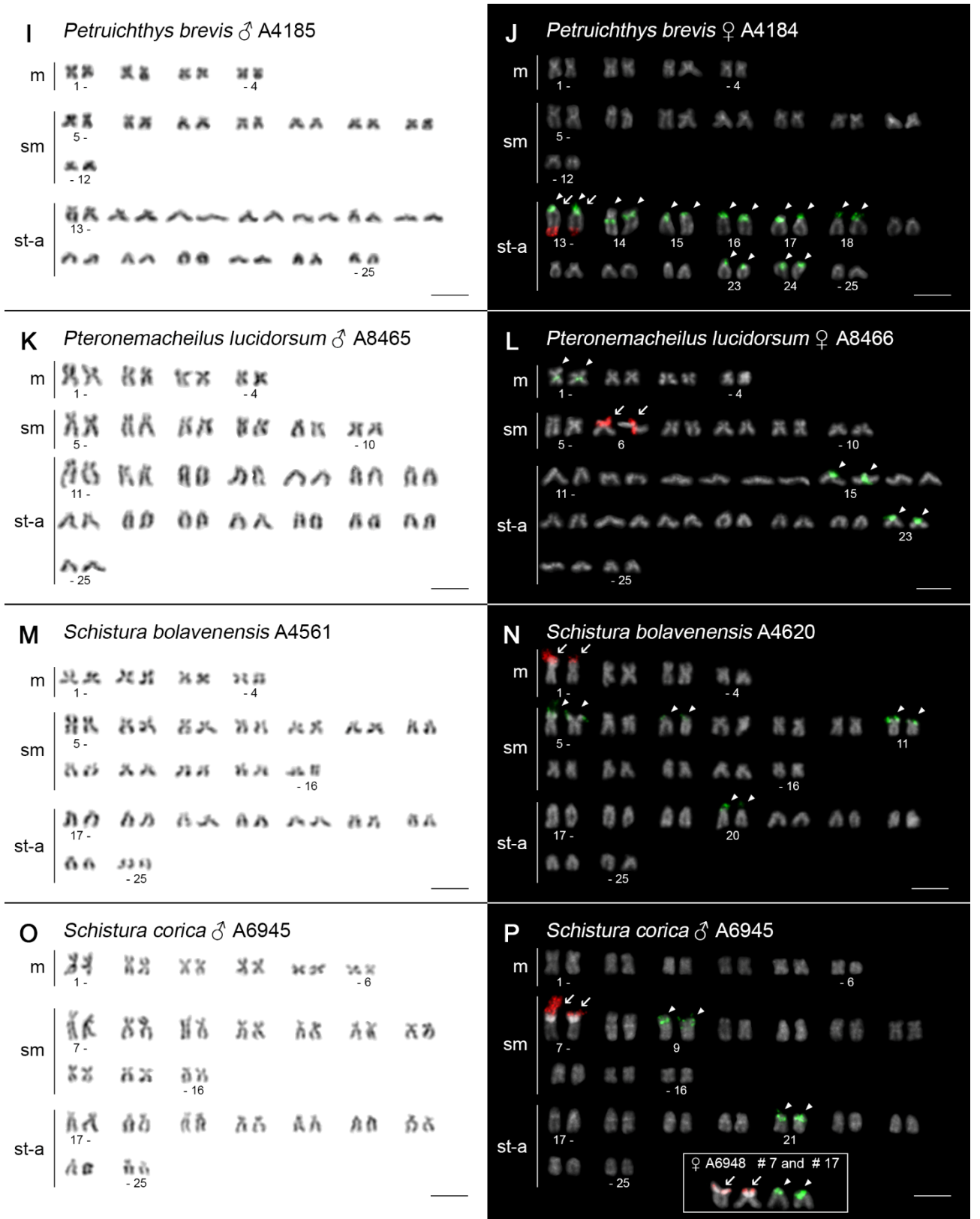


**G** *Paracanthocobitis pictilis* ♀ A6941



**H** *Paracanthocobitis pictilis* ♂ A6940

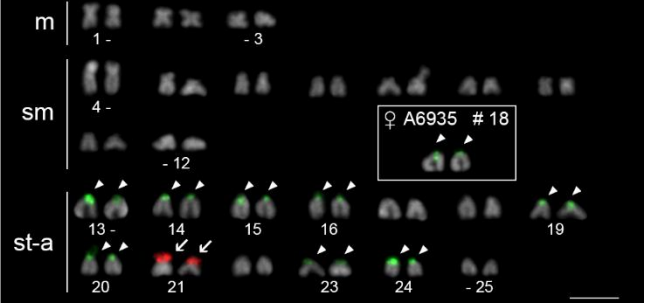




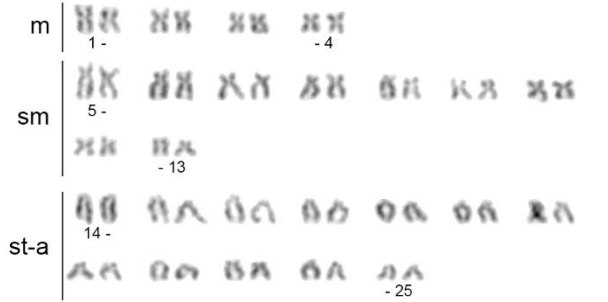
**Q** *Schistura hypsiura* ♂ A6222



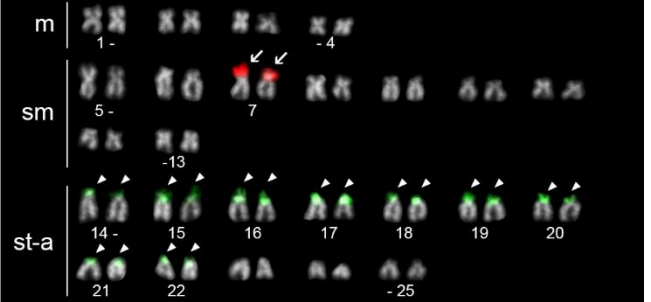
**R** *Schistura hypsiura* A6925



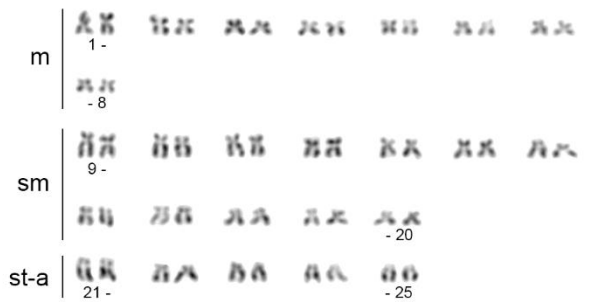
**S** *Schistura pridii* A7549



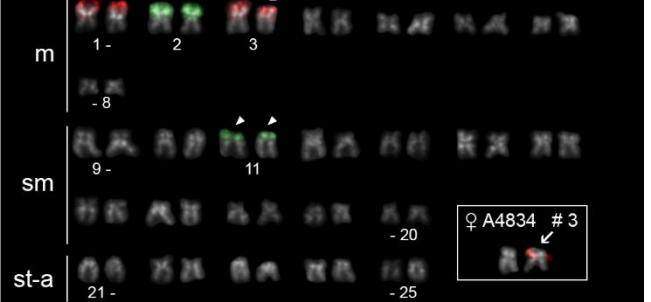
**T** *Schistura pridii* A7548



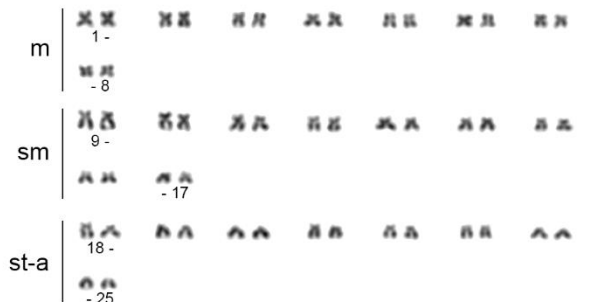
**U** *Seminemacheilus lendlii* ♂ A4833

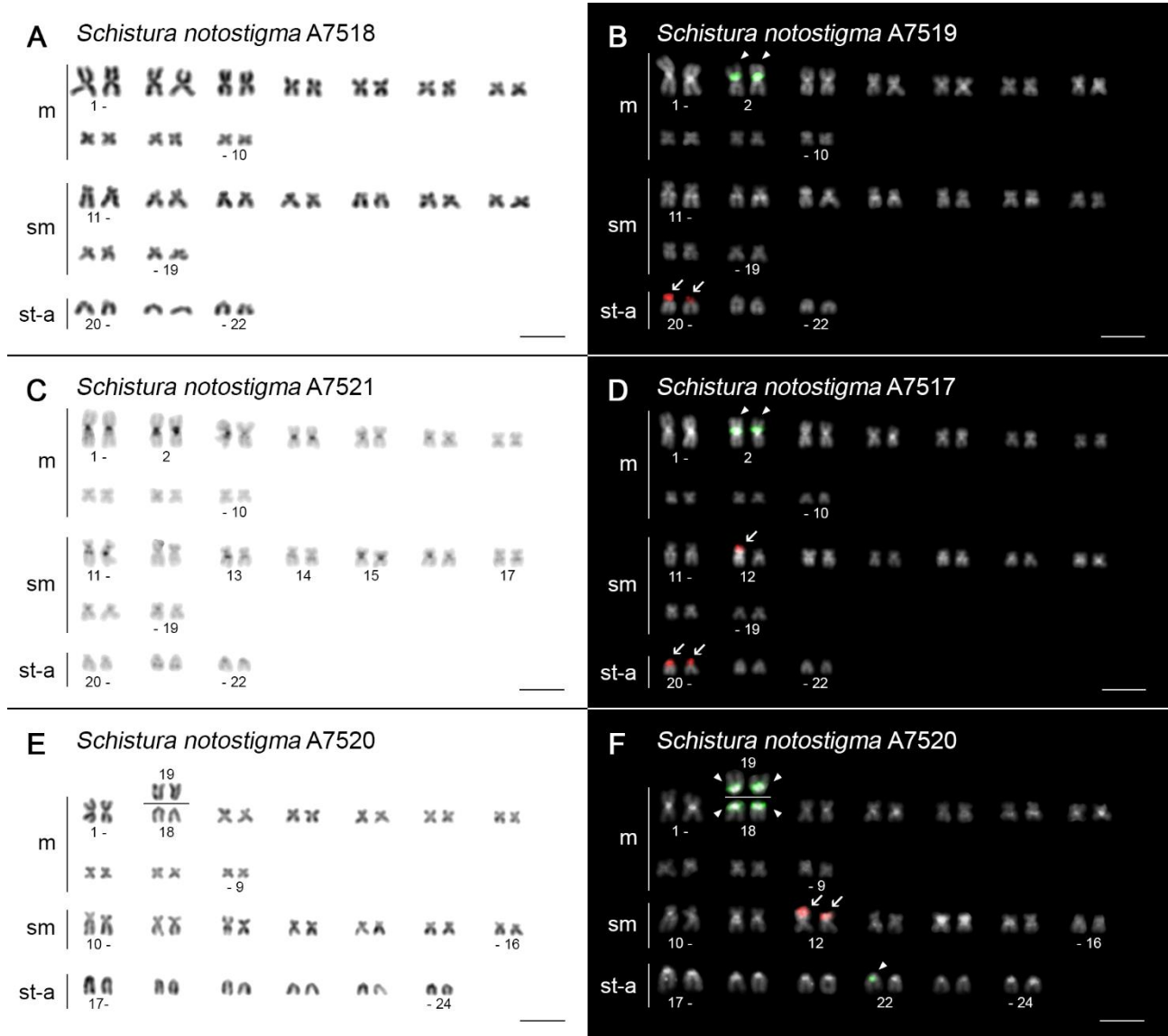


**V** *Seminemacheilus lendlii* ♂ A4833



**W** *Schistura savona* A7530

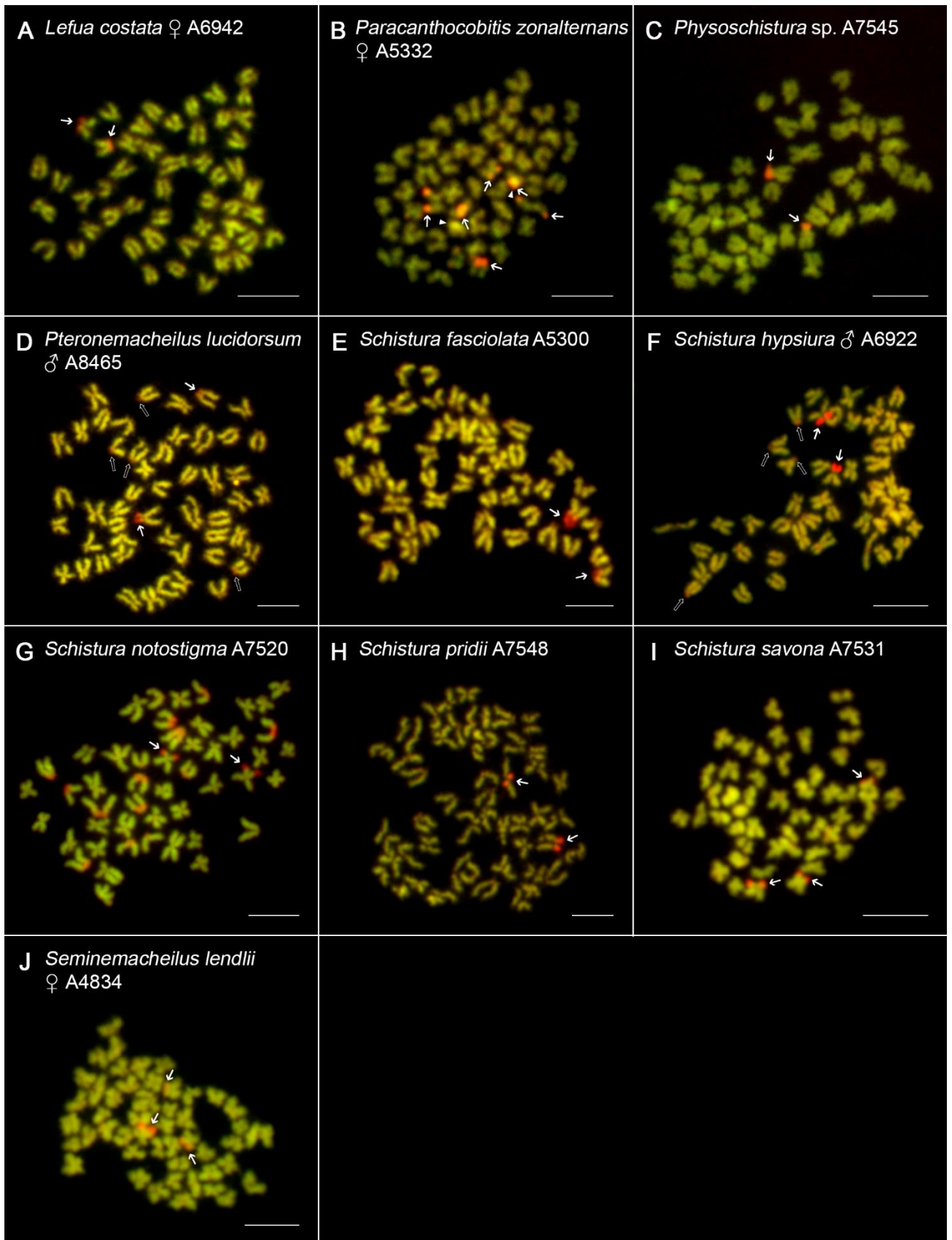




**Table S4** Distribution of AT- and GC-rich sites and its relation to constitutive heterochromatin and rDNA regions in nemacheilid genomes.

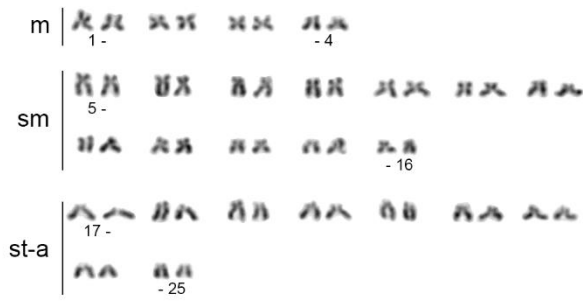
Species	C-banding	DAPI <sup>+</sup> sites	CMA <sub>3</sub> <sup>+</sup> sites	GC-rich 45S rDNA	GC-rich 5S rDNA
<i>Petruichtys brevis</i>	not analysed	centromeres + some p-arms (st)	2 signals (45S)	+	-
<i>Physoschistura</i> sp.	not analysed	huge interstitial bands (1 pair m)	2 signals (45S)	+	-
<i>Schistura pridii</i>	centromeres + some p-arms (st)	congruent with C-banding	2 signals (45S)	+	-
<i>Pteronemacheilus lucidorsum</i>	some centromeres + some p-arms (st)	congruent with C-banding	4 - 6 signals (45S + some 5S/other regions ?)	+	* inc
<i>Schistura corica</i>	whole arms (1 pair m, adjacent to 45S rDNA), interstitial bands (1 - 2 pairs st)	congruent with C-banding	all centromeres + 45S + 5S/other regions	+	+
<i>Seminemacheilus lendlii</i>	not analysed	centromeres, many interstitial bands, whole arms (3 pairs m-sm)	3 signals in female (45S)	+	-
<i>Schistura notostigma</i> (2n = 44)	huge pericentromeric regions (4 pairs m), other centromeres + interstitial (up to 4 pairs st, q-arms)	congruent with C-banding	6 signals (45S + 5S + other regions)	+	+
<i>Schistura notostigma</i> (2n = 48)	not analysed	some centromeres + interstitial (up to 2 pairs) + some p-arms st-a	14 - 15 signals (45S + 5S + other regions)	+	+
<i>Physoschistura elongata</i>	not analysed	majority of centromeres	45S + some 5S + other regions	+	+
<i>Schistura hypsiura</i>	whole arms (2 pairs sm + some st-a) + some centromeres	congruent with C-banding	4 - 8 (45S + some 5S/other regions ?)	+	* inc
<i>Mesonoemacheilus guentheri</i>	whole arms (1 pair m, 1 - 2 pairs st, p-arms) + some centromeres	congruent with C-banding	4 signals (some 5S + 45S)	+	+
<i>Nemachilichthys rueppelli</i>	huge pericentromeric regions (5 - 6 pairs m), interstitial (1 pair sm), whole-arms (coinciding with NOR, 1 pair sm) + some centromeres	congruent with C-banding except NOR regions	4 signals (5S + 45S)	+	+
<i>Paracanthocobitis zonalternans</i>	not analysed	centromeres + some p-arms (st)	6-8 signals (45S + some 5S)	+	+
<i>Paracanthocobitis pictilis</i>	not analysed	some centromeres	3-5 signals (5S + 45S)	+	* inc
<i>Schistura savona</i>	not analysed	huge pericentromeric regions (1 pair m), some p-arms (st) + centromeres	3 signals (45S)	+	-
<i>Nemacheilus binotatus</i>	not analysed	interstitial bands (coinciding with ITS, 1 pair st) + some centromeres	4 signals (45S + ITS)	+	-
<i>Schistura fasciolata</i>	pericentromeric regions (X, Y1) + some centromeres	congruent with C-banding	2 signals (45S)	+	-
<i>Schistura bolavenensis</i>	whole arms (3 pairs sm), interstitial (1 - 2 pairs sm) + NOR (1 pair m)	congruent with C-banding except NOR regions	5 - 6 signals (45S + other regions)	+	-
<i>Barbatula barbatula</i>	not analysed	interstitial bands (4 - 5 pairs st) + some centromeres	4 signals (5S + 45S)	+	+
<i>Lefua costata</i>	centromeres + some p-arms (st)	congruent with C-banding	2 signals (45S)	+	-

\*inc = inconclusive results

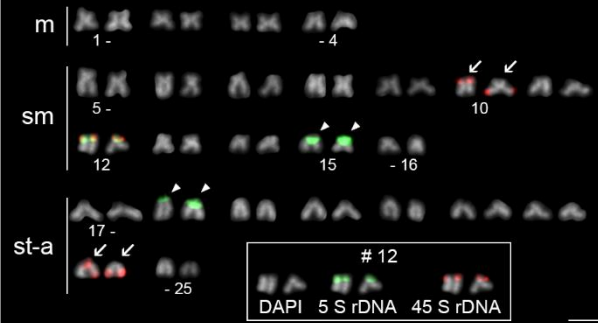




**A** *Paracanthocobitis zonalternans* ♂ A5331



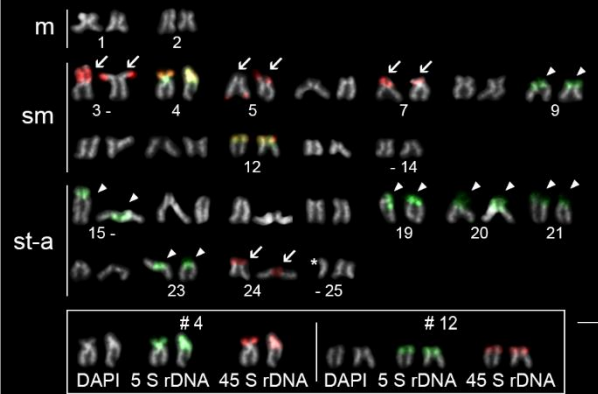
**B** *Paracanthocobitis zonalternans* ♂ A5331



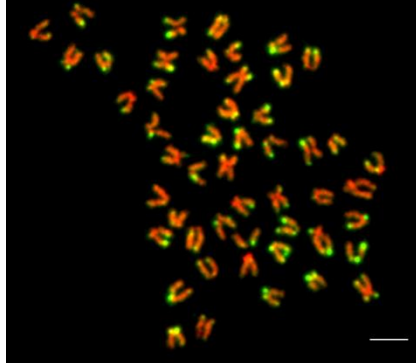
**C** *Physoschistura elongata* A7541



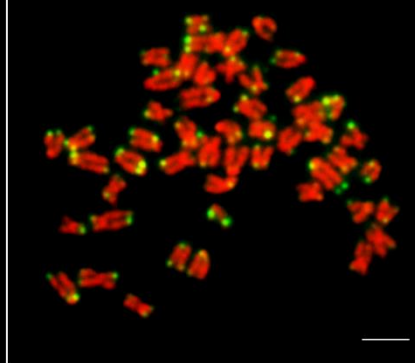
**D** *Physoschistura elongata* A7542



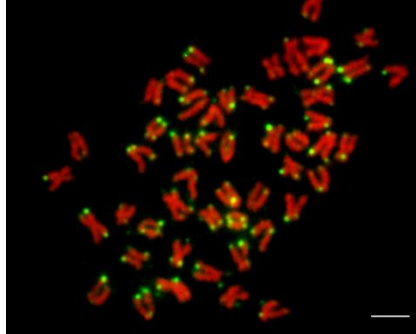
**A** *Lefua costata* ♀ A6943



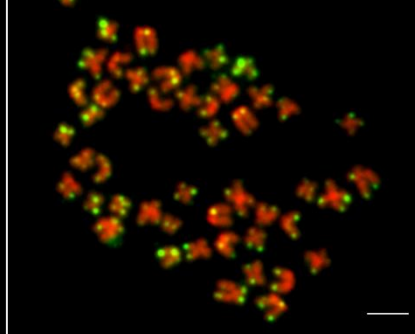
**B** *Petruiichthys brevis* A4186



**C** *Pteronemacheilus lucidorsum*  
♂ A8465



**D** *Schistura notostigma* A7520





## **Publikace 2 (Symonová et al. 2013b)**

Symonová R, Majtánová Z, **Sember A**, Staaks GBO, Bohlen J, Freyhof J, Rábová M, Ráb P. 2013. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress - activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evol Biol.* 13:42.

**IF**<sub>2013</sub>: 3,285

**Příspěvek autora:** experimenty FISH s fragmenty 18S rDNA a retrotranspozónem *Rex1*

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications

Radka Symonová<sup>1\*</sup>, Zuzana Majtánová<sup>1</sup>, Alexandr Sember<sup>1</sup>, Georg BO Staaks<sup>2</sup>, Jörg Bohlen<sup>1</sup>, Jörg Freyhof<sup>2</sup>, Marie Rábová<sup>1</sup> and Petr Ráb<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Sympatric species pairs are particularly common in freshwater fishes associated with postglacial lakes in northern temperate environments. The nature of divergences between co-occurring sympatric species, factors contributing to reproductive isolation and modes of genome evolution is a much debated topic in evolutionary biology addressed by various experimental tools. To the best of our knowledge, nobody approached this field using molecular cytogenetics. We examined chromosomes and genomes of one postglacial species pair, sympatric European winter-spawning *Coregonus albula* and the local endemic dwarf-sized spring-spawning *C. fontanae*, both originating in Lake Stechlin. We have employed molecular cytogenetic tools to identify the genomic differences between the two species of the sympatric pair on the sub-chromosomal level of resolution.

**Results:** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiments consistently revealed a distinct variation in the copy number of loci of the major ribosomal DNA (the 45S unit) between *C. albula* and *C. fontanae* genomes. In *C. fontanae*, up to 40 chromosomes were identified to bear a part of the major ribosomal DNA, while in *C. albula* only 8–10 chromosomes possessed these genes. To determine mechanisms how such extensive genome alternation might have arisen, a PCR screening for retrotransposons from genomic DNA of both species was performed. The amplified retrotransposon *Rex1* was used as a probe for FISH mapping onto chromosomes of both species. These experiments showed a clear co-localization of the ribosomal DNA and the retrotransposon *Rex1* in a pericentromeric region of one or two acrocentric chromosomes in both species.

**Conclusion:** We demonstrated genomic consequences of a rapid ecological speciation on the level undetectable by neither sequence nor karyotype analysis. We provide indirect evidence that ribosomal DNA probably utilized the spreading mechanism of retrotransposons subsequently affecting recombination rates in both genomes, thus, leading to a rapid genome divergence. We attribute these extensive genome re-arrangements associated with speciation event to stress-induced retrotransposons (re)activation. Such causal interplay between genome differentiation, retrotransposons (re)activation and environmental conditions may become a topic to be explored in a broader genomic context in future evolutionary studies.

\* Correspondence: radka.symonova@natur.cuni.cz

<sup>1</sup>Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, Liběchov 277 21, Czech Republic  
Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Intra-lacustrine fish speciation as an example of ecological speciation is a much debated topic in evolutionary biology addressed by various experimental tools, mostly in complex systems with a number of species, in particular in ancient freshwater lakes [1]. In Europe, with its comparatively depauperate fish fauna, issues of adaptive radiation and ecological speciation in fishes are highly relevant in temperate postglacial lakes (originating after the last glaciation i.e. 12–15 kyrs BP). To assess potential modes of speciation in fishes, numerous model systems are available [2], among which one of the best groups with a robust knowledge on adaptive speciation and complex speciation patterns in postglacial lakes are coregonine fishes (Coregoninae, [3]) [4–6]. Within coregonines, their numerous sympatric species pairs and recent species flocks [7–9] are of particular importance [10]. In *Coregonus*, based on extensive genetic and population genetic [11], phylogenetic, biogeographic, morphological and eco-physiological data, six potential modes of speciation have been proposed [12]. However, none of these approaches utilized cytogenetic data despite salmonid fishes, to which coregonines belong, being one of the best karyologically studied fish groups in terms of the number of species, populations, individuals and material (adults and embryos) examined. Available cytogenetic data demonstrate that salmonids include two basic karyotypes – the high chromosome number  $2n \sim 80$  (type A and its derivatives) and the low chromosome number  $2n \sim 60$  (type B and its derivatives) – co-occurring in all recognized salmonid phylogenetic lineages (except graylings, Thymallinae), including whitefish, ciscoes and innconu (Coregoninae). Species with the type B karyotypes have in common either prominent anadromous behaviour and/or are found in lacustrine environments and are likely products of intra-lacustrine speciation (for review [13]). Such apparent parallelism might be explained by specific life history strategies leading in both types of environments to small effective population sizes, thus, enabling increased probability of fixation of genic or chromosomal mutations. Observed evolution of chromosome number in salmonids is likely affected by selection for increased or decreased genetic recombination rate as proposed by Quimseyh [14], explaining high variability in chromosome numbers in mammals based on fundamental numbers (NF, chromosome arms number).

In this study, we examined chromosomes and genomes of the sympatric species *Coregonus albula* and *C. fontanae* in the dimictic Lake Stechlin, northern Germany to test whether the above outlined parallelism on karyotype differentiation in intralacustrine species pairs can also be observed in incipient speciation processes in young postglacial lakes. Both species are pelagic zooplanktivores, but they differ considerably in their size, spawning time

[15] and temperature-dependent metabolic physiological adaptations [16]. Up to now, *C. fontanae* has not yet been subjected to any cytogenetic analysis as opposed to *C. albula* (see [17] and references therein). The level of genetic differentiation between *C. albula* and *C. fontanae* tested by combined analyses of mitochondrial DNA and microsatellite loci showed a weak differentiation ( $F_{ST} = 0-0.008$ ) between these two species when compared with another sympatric species pair *C. albula* and *C. lucinensis* [18]. Further population genetic analyses based on 1244 polymorphic AFLP loci demonstrated a lower differentiation between allopatric than sympatric populations of the *C. albula* complex and suggested a rather complex colonization history than simple sympatric speciation [6]. Therefore, we have employed a novel approach in this field to explore the up to now neglected aspects of genome evolution in this species pair and used different parts of ribosomal DNA of the 45S rDNA unit as cytotoxic markers.

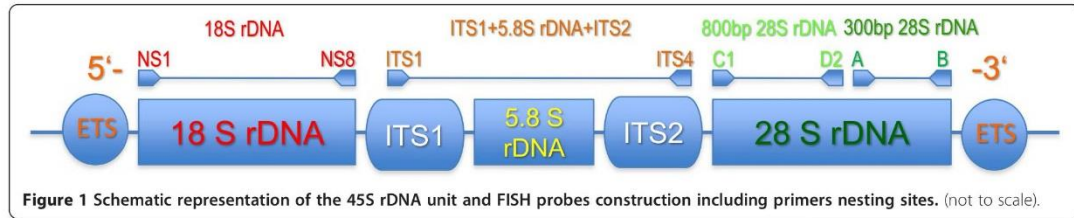
At the first stage of this study, we have employed conventional methods of karyotype analysis (Giemsa and Ag staining, CMA<sub>3</sub> and DAPI fluorescence). At the second stage, we have performed molecular cytogenetic analyses (CGH and FISH with various rDNA fragments and non-LTR retrotransposons as probes) to identify any differences between chromosomal complements of these two species on the sub-chromosomal level of resolution since the karyotype analyses showed no significant differences. At the third stage, we performed molecular biological analyses of the 45S ribosomal RNA genes and the *Rex1* non-LTR retrotransposon. Furthermore, we discuss these results in the context of populations of small effective sizes under extreme stress conditions under which retrotransposons (re)activation could have contributed to accelerated speciation. The major cluster of ribosomal RNA genes is expressed as the 45S transcriptional unit (Figure 1). This unit consists of 18S, 5.8S and 28S rDNA genes, separated by internal transcribed spacers (ITS1, ITS2) and surrounded by external transcribed spacers (ETS). The 45S rDNA units are arranged in tandem repetitions with high copy numbers [19,20] therefore, they represent a useful cytotoxic marker. The individual units are separated by intergenic spacers (IGS) [21,22]. The structure and the order of genes within the unit are highly conserved among Eukaryota [23]. Different parts of the 45S transcriptional unit display different mutational rates. The most conserved region is the 18S rRNA gene and the most variable are ITSs [23].

## Results

### Karyotyping and comparative cytogenetics

Karyotypes of both examined ciscoes were very similar ( $2n = 80$  in both species) and both belong to the





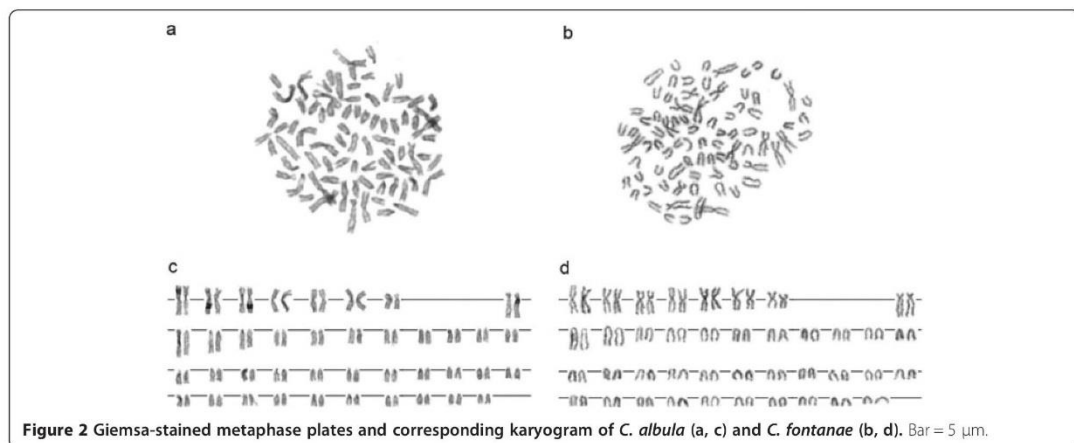
karyotype category A *sensu* [13]. They both had 8 pairs of meta- (m) to submetacentric (sm) and 32 pairs of acrocentric (a) chromosomes (both sexes in *C. fontanae*, only males in *C. albula* were available). The NF was 96 in both species (Figure 2a-d). The sequential Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>, particularly specific for CG rich regions) and DAPI (specific for AT rich regions) stainings revealed in both species a varying number of 6–8 sites with CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> signals. The signals occurred at telomeric regions of 3–4 metacentric chromosomes and at pericentromeric regions of 3–4 acrocentric/submetacentric chromosomes (Figure 3a, b). In some nuclei, several other weakly CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> regions not corresponding to DAPI<sup>-</sup> signals mostly with pericentromeric locations were observed (Figure 3a). This variability occurs on the inter-individual as well as on the intra-individual level.

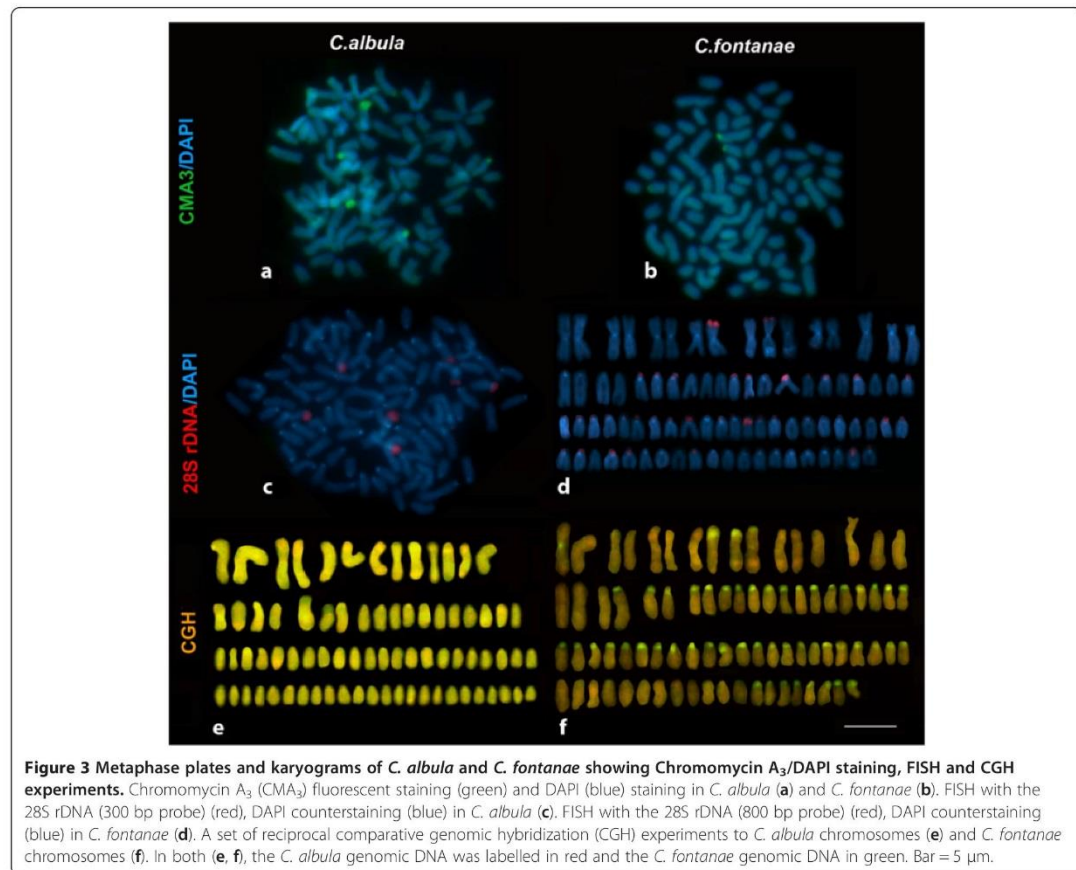
**Cytogenetic mapping of ribosomal DNA and comparative genomic hybridization (CGH)**

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with 28S ribosomal DNA (rDNA) probes derived from two non-overlapping regions of the 28S rRNA gene of both species (an 800 bp region adjacent towards the 5'-end of the 28S rDNA gene and a 300 bp region adjacent towards the 3'-end) showed strikingly different results.

FISH using the shorter fragment as a probe revealed the presence of 6–10 chromosomes in both *C. albula* and *C. fontanae* bearing such sequences distributed similarly as the CMA<sub>3</sub>/DAPI<sup>-</sup> (Figure 3c for *C. albula* only). FISH with the longer fragment revealed bright signals on 6–10 chromosomes in *C. albula* (shown in colocalization with *Rex1* retrotransposon, Figure 4c) but up to 40 signals (varying numbers) on chromosomes in *C. fontanae* (Figure 3d). Most of the signals of the 800 bp probe of the 28S rDNA in *C. fontanae* were localized in the AT rich (i.e. DAPI<sup>+</sup>) centromeric or pericentromeric regions of acrocentric chromosomes. Two signals of the 800 bp 28S rDNA probe corresponded to the major NOR sites evidenced also by the 300 bp rDNA and the CMA<sub>3</sub>/DAPI<sup>-</sup> staining that were localized in telomeric regions of two large metacentric chromosomes (Figure 3d).

To verify these striking differences between *C. albula* and *C. fontanae*, we carried out a set of reciprocal comparative genomic hybridization (CGH) experiments. A mixture of the whole genome DNA (gDNA) of both *C. albula* and *C. fontanae* was hybridized simultaneously to both *C. fontanae* and *C. albula* chromosomes. This resulted in nearly no significant differences on *C. albula* chromosomes, i.e. a balanced hybridization of both gDNA probes was observed (Figure 3e). While signal of the *C. fontanae* gDNA when *in situ* compared with the





**Figure 3** Metaphase plates and karyograms of *C. albula* and *C. fontanae* showing Chromomycin A<sub>3</sub>/DAPI staining, FISH and CGH experiments. Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) fluorescent staining (green) and DAPI (blue) staining in *C. albula* (a) and *C. fontanae* (b). FISH with the 28S rDNA (300 bp probe) (red), DAPI counterstaining (blue) in *C. albula* (c). FISH with the 28S rDNA (800 bp probe) (red), DAPI counterstaining (blue) in *C. fontanae* (d). A set of reciprocal comparative genomic hybridization (CGH) experiments to *C. albula* chromosomes (e) and *C. fontanae* chromosomes (f). In both (e, f), the *C. albula* genomic DNA was labelled in red and the *C. fontanae* genomic DNA in green. Bar = 5 μm.

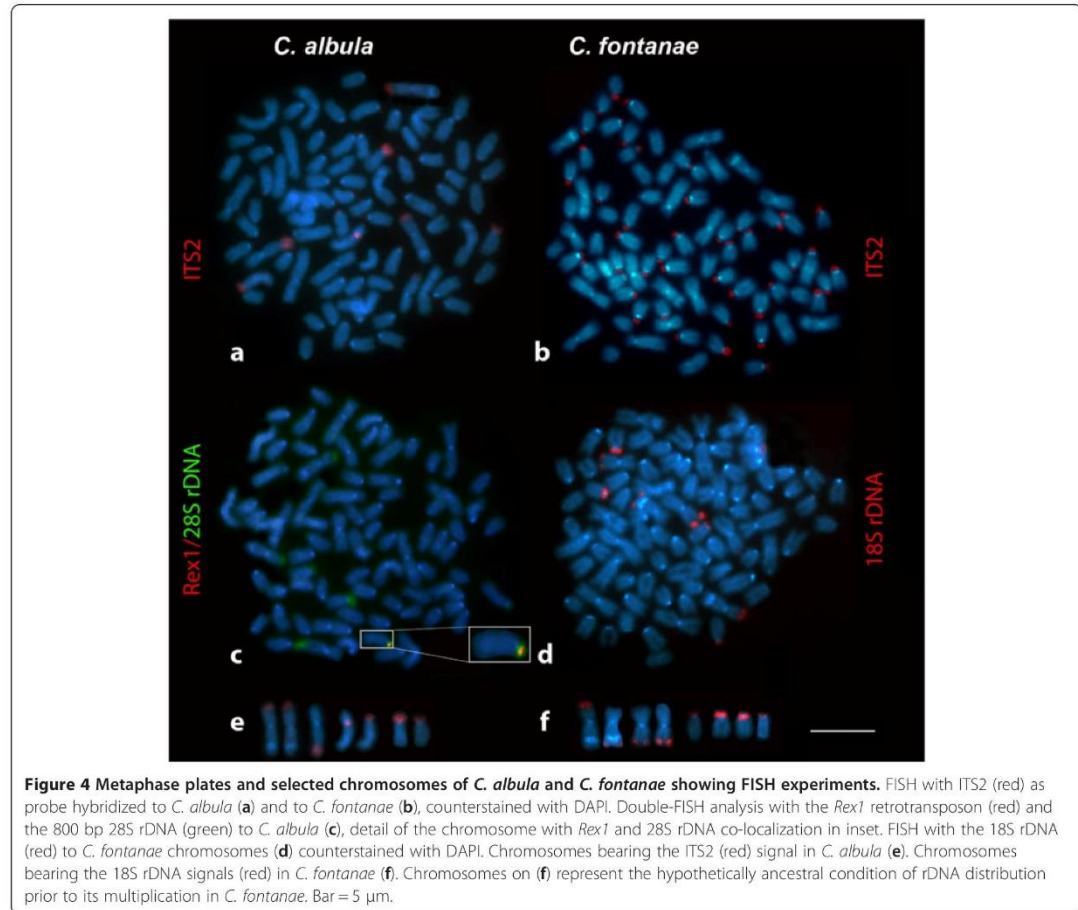
*C. albula* gDNA onto *C. fontanae* chromosomes was distinctly overrepresented in mostly pericentromeric regions of about 40 chromosomes (green signals in Figure 3f). This pattern corresponded to results of the FISH experiment with 800 bp 28S rDNA to *C. fontanae* chromosomes.

To assess quantitative differences in the distribution of the whole 45S rDNA unit in both species, a further set of comparative FISH experiments with a cocktail of the 18S rDNA and ITS1-ITS2 (including 5.8S rDNA) as probes amplified from both of the genomes were performed to *C. albula* and *C. fontanae* chromosomes. In the genome of *C. albula*, both the ITS1 and ITS2 were present in 6–12 signals with a varying number of signals (Figure 4a). In the genome of *C. fontanae*, both the ITS1 and ITS2 were multiplied to the same extent as the 800 bp 28S rDNA part, i.e. a varying number of approximately 40 signals (Figure 4b). The subsequent FISH experiment with the 18S rDNA in both species showed the number of 6–10 signals (Figure 4d for

*C. fontanae* only). The typical chromosomes bearing rDNA signals in the unamplified condition (i.e. ITS1-ITS2 and 28S rDNA in *C. albula* and 18S rDNA in *C. fontanae*) are shown in Figures 4e-f. There is a reproducible difference in location of one of the 28S rDNA in *C. fontanae* (when compared with *C. albula*) related to a distinct DAPI<sup>+</sup> band on a large metacentric chromosome pair (Figure 4f). In *C. albula*, the rDNA signal was always located on the opposite arm than the DAPI<sup>+</sup> band occurred (Figure 4e). In *C. fontanae*, one signal is located on the same arm and one signal is on the opposite one (Figure 4f). The construction of the FISH probes used in this study is visualized in Figure 1.

#### Molecular characterization of multiplied rDNA sites

To determine mechanisms how such extensive multiplication of parts of rRNA genes in *C. fontanae* might have arisen, a PCR screening for non-LTR retrotransposons in genomic DNA of both species was performed. Retrotransposons of the *Rex* family are known to have



invaded fish genomes in multiple lineages [24] and to also insert into rDNA, particularly in fishes [25]. Therefore, the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* were tested in this study. FISH with the *Rex3* and *Rex6* retroelements yielded inconclusive results. The *Rex1* element, as a probe hybridized to chromosomes of *C. albula* and *C. fontanae*, typically showed a dispersed pattern of signals on all chromosomes with a distinct accumulation in a pericentromeric region of one single acrocentric chromosome. Co-hybridization of the *Rex1* element with the 800 bp 28S rDNA probe in a double-FISH experiment showed co-localization of these two probes typically on one (exceptionally two to several), mostly acrocentric chromosomes in both *C. albula* and *C. fontanae* (Figure 4c for *C. albula* only, detail of the co-localization in inset). The *Rex1* signal with a distinctly weaker intensity occurred dispersed also on other sites corresponding to the NOR loci in both genomes. The sequences of the *Rex1* derived from

the *C. albula* and *C. fontanae* genome were deposited in GenBank under the accession numbers JQ731754 and JQ731760, respectively.

Sequencing of the 18S and 28S rDNA, as well as ITS1 and ITS2 (deposited in GenBank under accession numbers JQ731749-JQ731753 and JQ731755-JQ731759) yielded no significant differences in these genes between *C. albula* and *C. fontanae*.

#### Discussion

Our findings of extensive genomic re-arrangements of a substantial fraction of the 45S rDNA unit in the *C. fontanae* genome when compared with the situation in *C. albula* are in strong contrast with previously reported low genetic differentiation between these two species [6,18].

Our results indicate that in the genome of *C. fontanae* next to the complete 6–10 NOR loci corresponding to similar number of NOR-bearing chromosomes in *C. albula*,



up to 30 supernumerary and incomplete NOR loci occur. This is supported by results of the sequential fluorescent staining (CMA<sub>3</sub> and DAPI), showing about 6–8 signals in karyotypes of both species, although on chromosomes of *C. fontanae* the signals were slightly weaker. However, these supernumerary sites in *C. fontanae* were not represented by repeating of the complete 45S rDNA unit (i.e. 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2, 28S rDNA)<sub>n</sub> but only by a part including probably complete ITS1 and ITS2 and a part of the 28S rDNA adjacent to the ITS2, i.e. the 5' end of the 28S rDNA gene (the region of 5.8S rDNA was not investigated separately).

Most of the supernumerary signals of the 45S rDNA in chromosomes of *C. fontanae* were localized in the AT rich pericentromeric regions as well as the major accumulation of the *Rex1* retrotransposon on both *C. albula* and *C. fontanae* chromosomes. This is in accordance with findings of other authors describing accumulations of transposable elements in centromeric heterochromatin e.g. in genome of humans [26] and in a cichlid fish *Cichla kelberi* [27,28]. TEs in fishes generally tend to insert to heterochromatic areas of chromosomes ([29]; reviewed by [30]). There are also records of specific integration of some non-LTR retrotransposons at the rRNA genes found in most animal phyla (summarized by [31]), in insects *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori* [32] or in the fish *Erythrinus erythrinus*, where *Rex3* retrotransposons were found in the 5S rRNA genes [25].

In the above-mentioned *E. erythrinus* fish, a similar multiplication of rRNA genes was described [25]. In that case, four karyomorphs of *E. erythrinus* differ in their chromosomal number, karyotype, presence or absence of heteromorphic sex chromosomes and numbers of 5S rDNA loci. The karyomorph A in *E. erythrinus* showed only two 5S rDNA loci, while in the karyomorph D, 21–22 5S rDNA loci could be observed. All 5S rDNA sites co-localized with the *Rex3* retrotransposon. On the other hand, no changes in the heterochromatin and 18S rDNA patterns were found between these two karyomorphs [25]. Such two karyomorphs within a single species *E. erythrinus* may be seen as an incipient stage of a speciation event. This situation can thus represent an initial stage, later resulting in the condition observed in morphologically [15], ecologically and physiologically [33,34] diverged species pair *C. fontanae* and *C. albula* described in this study. A similar observation of extremely multiplied NOR sites (46 and 49 countable FISH signals), however, without any further detailed analysis, were reported in brook char *Salvelinus fontinalis* (Salmonidae) [35].

In salmonid fishes, TEs have been studied intensively [30,36,37]. Microarray studies showed that transcription of rainbow trout transposons is activated by external

stimuli, such as toxicity, stress and bacterial antigens [38]. In the oligotrophic Lake Stechlin, the food availability for coregonines was extremely limited and the size at maturity and the maximal size of *C. albula* are far behind the other populations of this species in adjacent lakes in northern Germany [39]. *C. fontanae* is the smallest species of the genus *Coregonus* in Europe [8]. Raising both species in the laboratory demonstrated that both grew much larger if supported with unlimited food (unpublished obs., Freyhof). Therefore, it can be speculated that both species, especially *C. fontanae*, live in an extreme permanent starvation in the Lake Stechlin. It can be also hypothesized that the spring-spawning habit of *C. fontanae* might have originated simply by the shift of sexual maturity in the part of the population that has not been able to attain sexual maturity in autumn due to the lower food intake and hence environmental starvation stress.

#### **Link between environmental stress and chromatin modification/regulation**

Effects of stress on the genome can result in important perturbations creating new combinations better compatible with survival (summarized by [40]; more recently reviewed by [41]). After the discovery of transposable elements (TE) more than 50 years ago, their mutagenic effect had been increasingly viewed in association with rapid genome reorganizations by the creation of new regulation patterns and chromosome restructuring during last years [41]. Stress activated mobilization of these elements by failure of epigenetic silencing (the host defence model of repressing the movement of mobile elements; [42,43]) can lead to (re)activation of mobile elements and consequently to major and rapid genome alterations [40,41,44,45].

Barbara McClintock [46] already considered TE as a source of hypermutagenicity creating viable and fertile individuals from a stressed population under risk of extinction. Moreover, she originally named TE “controlling elements” due to their ability to alter gene activity and genome structure [47].

#### **TE-mediated genome rearrangements as a factor in speciation**

With growing evidence for the importance of TEs in the genome evolution, the role of TE-mediated genome changes in the speciation by their possible contribution to pre- and post-mating reproductive isolation formation has been increasingly taken into account and discussed generally in eukaryotes [48,49], *Drosophila* [50], fishes [51], mammals [52], and plants [53]. However, lack of experimental data makes it difficult to prove this possibility (reviewed by [51,54,55]). On the other hand, [41] provides an overview of TE transposition bursts



concomitant with radiation periods in seven cases. The same authors also discuss TE-induced rapid speciation associated with the ability of TEs to induce chromosomal rearrangements. Therefore, the sympatric species pair *C. albula* and *C. fontanae* in the context of other congeneric coregonine species and their variable evolutionary history in the Eurasian post-glacial lakes appears to be a suitable model system for exploring mechanisms of genomic differentiation and speciation with or without TE contribution.

In a very similar, but North American study system (lake whitefish species pairs, *Coregonus* spp.), [56] next generation sequencing (NGS) showed that TEs appeared to be highly expressed in hybrids between two recently diverged species. This may be potentially the mechanism responsible for post-zygotic reproductive isolation. Moreover, NGS can be viewed as a useful tool complementary with molecular cytogenetic approach presented in this study enabling confirmation of here documented results and search for other candidate groups of TEs involved in the genome re-arrangements and accelerated speciation.

## Conclusion

In the sympatric species pair *C. albula* and *C. fontanae*, we encounter a complex situation involving several evolutionary phenomena and factors. Firstly, a rapid ecological speciation event with an unclear sympatric scenario, i.e. the derived species *C. fontanae* fully differentiated from *C. albula* physiologically, ecologically and morphologically within about 12 – 14 kyrs in the newly colonized Stechlin Lake after the last glacier retreated [15]. Secondly, genetic differentiation of these two species remained weak as the combined analyses of mtDNA and microsatellite loci [18] showed, as well as major karyotypic and chromosomal markers presented in this study. This is in contrast with extensive genome re-arrangements in a large proportion of the 45S rDNA cassette in *C. fontanae* when compared with its most likely ancestral species – *C. albula*. The genome re-arrangements are exhibited as a distinct loci number differences and relocation of variable number (about 30) AT rich pericentromeric regions in *C. fontanae*. The molecular mechanism behind these re-arrangements might be a retrotransposition of a part of the 45S rDNA unit mediated by retrotransposons. Retrotransposonal activity can be mobilized under certain conditions (stress, environmental changes) and cause rapid and extensive structural changes to the host genome. These structural genomic differences in *C. fontanae* accumulated to pericentromeric heterochromatin in almost half of the chromosome complement. This might then have been acting as a partial but permanent reproductive barrier by hampering recombination, thus, enabling and accelerating

the morphological, ecological and physiological differentiation of *C. fontanae*. Moreover, interspecific hybridization between the old and the newly arising species might have activated retrotransposonal activity in hybrids resulting in hybrid sterility or unviability as reviewed by [51]. The population genetic parameters of this speciation event, favouring fixation of the re-arranged genomes, remain to be elucidated in detail, but small effective population size is a good hypothesis to be tested.

## Methods

### Materials

For this study, we had 12 individuals of *Coregonus albula* (Linnaeus, 1758) and 16 individuals of *C. fontanae* [15], both from Lake Stechlin (northern Germany, Brandenburg, 53° 10' N; 13° 02' E). All fish were raised in the laboratory under identical conditions as described by [33,34]. In *C. albula*, 3 individuals (samples alb 1, 2 and 5, males only) yielded metaphases usable for down-stream FISH and CGH experiments. In *C. fontanae*, 3 individuals also (samples font 2, 5 and 7, both males and females) yielded usable chromosome preparations. Of all studied individuals, we isolated genomic DNA from fin clips and muscles. All tissue and DNA samples, including cell suspensions and chromosome preparations, are deposited in the Laboratory of Fish Genetics of the Institute of Animal Physiology and Genetics (IAPG). This study was covered by the "Valid Animal Use Protocols" Nr. CZ 00221 at the IAPG issued by the Czech Ministry of Agriculture on 10 June 2009.

### Chromosome preparations

Metaphases were prepared according to [57] with slight modifications. Briefly, the fish were injected with 0.1% colchicine solution (w/v, SIGMA), 1 ml/100 g body weight, for 45 minutes then sacrificed by overdose of anaesthetic 0.5% Phenoxyethanol (v/v, SIGMA). Kidneys were removed, dissected in 0.075 M KCl and the cell suspension free of tissue fragments was hypotonized for 8 min in 0.075 M KCl, fixed in methanol: acetic acid 3:1 (v/v) fixative, washed twice in fixative, and finally spread onto slides (Superfrost quality). Mitotic activity was not stimulated because these fish showed extremely high sensitivity to agents increasing mitotic rate. Simultaneously, the blood (around 0.5 ml) was collected from all analysed individuals by fine heparinized syringe for leukocyte culture according to the protocol of [58]. Briefly, partly washed leukocytes were cultivated in 5 ml of a complete medium composed of TC 199 (SIGMA, St. Louis, MO, USA), 10% FBS Superior (Biochrom, Berlin, Germany), 0.5% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA), 1% Kanamycin monosulfate (SIGMA), 1% LPS (SIGMA), 0.2% PHA H15 (Remel, Lenexa, KS, USA) and 0.175 µl Mercaptoethanol (SIGMA) at 19.5°C for 6–7 days,

then 2 drops of the 0.1% colchicine were added for 45 minutes at RT and cells harvested as for the direct preparation described above.

**Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH)**

Probes for *in situ* hybridization experiments were produced either by PCR (FISH probes) or directly from the genomic DNA (CGH probes). Probes were indirectly labelled with haptens (biotin and digoxigenin) by means of nick translation (whole genomic DNA and FISH probe longer than 600 bp) using the Roche Nick Translation Mix (Roche, Mannheim, Germany; Cat.No. 11745808910) according to the manufacturer's instructions. Shorter DNA fragments were labelled by PCR using the Roche PCR DIG Labeling Mix (Cat.No. 11585550910). The biotin-dUTP labelled probes (Roche, Cat. No. 11093070910) were detected by either the Invitrogen Cy<sup>TM</sup>3-Streptavidin (Invitrogen, San Diego, CA, USA;

Cat.No. 43–4315) or by the FITC-Streptavidin (Cat.No. 43–4311). The digoxigenin-dUTP labelled probes (Roche, Cat.No. 11093088910) were detected by either the Roche Anti-Digoxigenin-Fluorescein (Cat.No. 11207741910) or by the Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Cat.No. 11207750910). An unlabelled DNA competitor for suppression of nonspecific hybridization of fragment size of 100–200 bp was added with 20-fold the concentration of the DNA probe in CGH experiments. The CGH DNA probe concentration was 1 ug per reaction for both genomes compared. An aging of chromosome preparations at 37°C for 3 hours was carried out prior to each of the hybridization experiment. Pepsinization, hybridization and detection were carried out under conditions as described by [59].

All rDNA FISH probes were constructed using published, mostly generally used PCR primer sets of the 45S rDNA unit to cover its major regions and to map them physically onto chromosomes.

**Table 1 PCR primers used in this study**

Name	Region of DNA/FISH probe	Primer sequence (5'to3')	Ref.
28S A	3' end of the 28S rDNA involving the regions A and B, F primer	AAA CTC TGG TGG AGG TCC GT	[61]
28S B	Internally nested in the regions A and B of the 28S rDNA, R primer	CTT ACC AAA AGT GGC CCA CTA	[61]
28S C1	5' end of the 28S rDNA adjacent to the ITS2, F primer	ACC CGC TGA ATT TAA GCA T	[62]
28S D2	Internally nested in the region C3 involving D2, C2, D1, C1, R primer	TCC GTG TTT CAA GAC GGG	[63]
ITS1	3' end of the 18S rDNA adjacent to the ITS1, F primer	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	[64]
ITS2	3' end of the 5.8S rDNA adjacent to the ITS2, R primer	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	[64]
ITS3	5' end of the 5.8S rDNA adjacent to the ITS1, F primer	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	[64]
ITS4	5' end of the 28S rDNA adjacent to the ITS2, R primer	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	[64]
NS1	5' end of the 18S rDNA F primer	GTA GTC ATA TGC TTG TCT	[64]
NS2	18 S rDNA R primer	GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC	[64]
NS3	18 S rDNA F primer	GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC	[64]
NS4	18 S rDNA R primer	CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG	[64]
NS5	18 S rDNA F primer	AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G	[64]
NS6	18 S rDNA R primer	GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC	[64]
NS7	18 S rDNA F primer	GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC	[64]
NS8	3' end of the 18S rDNA R primer	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	[64]
RTX1F1	Rex1 F primer	TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC	[28]
RTX1R3	Rex1 R primer	TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC	[28]
RTX3F1	Rex3 F primer	TAC GGA GAA AAC CCA TTT CG	[65]
RTX3F2	Rex3 F primer	AAC ACC TTG GCT GCG CCT AG	[65]
RTX3F3	Rex3 F primer	CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG	[28]
RTX3R1	Rex3 R primer	AAA GTT CCT CGG TGG CAA GG	[65]
RTX3R2	Rex3 R primer	CCR GGG GTG GAT GAR RTC CGC CC	[65]
RTX3R3	Rex3 R primer	TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT	[28]
RTX6F	Rex6 F primer	TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCA C	[28]
RTX6R	Rex6 R primer	GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGG G	[28]



### PCR amplification of FISH probes and the analysis of the 45S rDNA unit

All primer sets used in this study are summarized in Table 1. Primers nesting within the 45S rDNA unit relevant for this study are shown in Figure 1. Thermal profiles were used according to references given in Table 1. FISH probes were constructed from PCR conducted on the respective species as they were later hybridized. All sequences used in this study as FISH probe or in the molecular-biological analyses of the 45S rDNA unit were deposited in the GenBank [60] under accession numbers JQ731749 - JQ731760.

### Cloning, sequencing and sequences analysis

PCR products were cloned using the QIAGEN PCR Cloning Kit and QIAGEN EZ Competent Cells (Qiagen, Hilden, Germany); the plasmids were isolated from the cells with Qia PREP Spin Miniprep Kit according to the manufacturer's instructions. The primary PCR products were first sequenced on the ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Foster City, CA, USA) using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Furthermore, cloned DNA fragments that were later applied as FISH probes were commercially sequenced by Macrogen (Seoul, South Korea). The commercially obtained sequences were subjected to online megablast or discontinuous megablast [66] searches at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) [67], where their similarity to the sequences deposited in the GenBank databases was checked.

### Microscopy and image processing

Chromosome preparations were analysed with the Provis AX70 Olympus microscope equipped with standard fluorescence filter sets. Gray-scale hybridization signals on chromosomes and/or DAPI counterstained chromosomes were captured by the CCD camera (DP30W Olympus). Using the Olympus Acquisition Software, black and white images were pseudo-coloured and superimposed with the software MicroImage. The colour images have been analyzed and processed with Adobe Photoshop, Version CS5. The chromosomes were classified using the nomenclature proposed by [68]. Karyotypes based on the Giemsa-stained chromosomes were produced using the IKAROS (Metasystems) software. Chromosomal formulas were formed according to [69].

### Abbreviations

AFLP: Amplified fragment length polymorphism; CGH: Comparative genomic hybridization; CMA<sub>3</sub>: Chromomycin A<sub>3</sub>; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; DAPI/CMA<sub>3</sub><sup>+/−</sup>: DAPI/CMA<sub>3</sub> positive/negative signals; FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; IAPG: Institute of animal physiology and genetics; kyrs BP: Thousand years before present; NF: "Nombre fundamental" chromosome arm number; NGS: Next generation sequencing; NOR: Nucleolar organizer DNA; rDNA: Ribosomal DNA; TE: Transposable elements; 2n: Diploid chromosome number.

### Competing interests

There are no competing interests to declare.

### Authors' contributions

RS designed and performed experiments FISH and CGH and co-drafted the manuscript, ZM and AS performed FISH experiments, ZM performed PCRs and sequenced PCR products and co-drafted the manuscript, GS and JF collected and raised material, JB and RS prepared chromosome preparations, MR partly contributed to digital processing of images, PR designed the study and co-drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

This study was supported in parts by the projects No. 523/08/0824 and No. P506/11/P596 of the Grant Agency of the Czech Republic, No. LC06073 Biodiversity Research of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and No. IRP IAPG AV0Z 50450515. This study is a part of the series "Chromosome evolution in Salmonidae".

### Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, Liběchov 277 21, Czech Republic. <sup>2</sup>Leibniz-Institut of Freshwater Biology and Inland Fisheries, Müggelseedamm 310, Berlin 12587, Germany.

Received: 29 May 2012 Accepted: 11 February 2013

Published: 14 February 2013

### References

1. Cristescu ME, Adamowicz SJ, Vaillant JJ, Haffner DG: **Ancient lakes revisited: from the ecology to the genetics of speciation.** *Mol Ecol* 2010, **19**:4837–4851.
2. Schluter D: **Ecological speciation in postglacial fishes.** *Philos T Roy Soc B* 1996, **351**:807–814.
3. Nelson JS: *Fishes of the world*. 4th edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2006.
4. Bodaly RA, Vuorinen J, Ward RD, Luczynski M, Reist JD: **Genetic comparison of new and old world coregonid fishes.** *J Fish Biol* 1991, **38**:37–51.
5. Hudson AG, Vonlanthen P, Seehausen O: **Rapid parallel adaptive radiations from a single hybridogenetic ancestral population.** *P Roy Soc B-Biol* 2011, **278**:58–66.
6. Mehner T, Pohlmann K, Elkin C, Monaghan MT, Nitz B, Freyhof J: **Genetic population structure of sympatric and allopatric populations of Baltic ciscoes (*coregonus albus* complex, teleostei, coregonidae).** *BMC Evol Biol* 2010, **10**:85.
7. Douglas MR, Brunner PC, Bernatchez L: **Do assemblages of *coregonus* (teleostei: salmoniformes) in the central alpine region of Europe represent species flocks?** *Mol Ecol* 1999, **8**:589–603.
8. Kottelat M, Jöng F: *Handbook of European Freshwater Fishes*. Cornol, Switzerland: Publications Kottelat; 2007.
9. Vonlanthen P, Roy D, Hudson AG, Largiadèr CR, Bittner D, Seehausen O: **Divergence along a steep ecological gradient in lake whitefish (*coregonus* sp.).** *J Evolution Biol* 2009, **22**:498–514.
10. Taylor EB: **Species pairs of north temperate freshwater fishes: evolution, taxonomy, and conservation.** *Rev Fish Biol Fisher* 1999, **9**:299–324.
11. Vuorinen J, Himberg M, Lankinen P: **Genetic differentiation in *coregonus albus* (salmonidae) populations in Finland.** *Hereditas* 1981, **94**:113–121.
12. Hudson AG, Vonlanthen P, Müller R, Seehausen O: **Review: the geography of speciation and adaptive radiation in coregonines.** *Adv Limnol* 2007, **60**:111–146.
13. Phillips R, Ráb P: **Chromosome evolution in the salmonidae (pisces): an update.** *Biol Rev* 2001, **76**:1–25.
14. Quimsey MB: **Evolution of number and morphology of mammalian chromosomes.** *J Hered* 1994, **85**:455–465.
15. Schulz M, Freyhof J: ***Coregonus fontanae*, a new spring-spawning Cisco from lake stechlin, northern Germany (salmoniformes: coregonidae).** *Ichthyol Explor Fresh* 2003, **14**:209–216.
16. Ohlberger J, Mehner T, Staaks G, Hoelke F: **Is ecological segregation in a pair of sympatric coregonines supported by divergent feeding efficiencies?** *Can J Fish Aquat Sci* 2008, **65**:2105–2113.

17. Jankun M, Martinez P, Pardo BG, Kirtiklis L, Rab P, Rabova M, Sanchez L: **Ribosomal genes in coregonid fishes (*coregonus lavaretus*, *C. Albula* and *C. Peled*) (salmonidae): single and multiple nucleolus organizer regions.** *Heredity* 2001, **87**:672–679.
18. Schulz M, Freyhof J, Saint-Laurent R, Østbye K, Mehner T, Bernatchez L: **Evidence for independent origin of two spring-spawning ciscoes (Salmoniformes: Coregonidae) in Germany.** *J Fish Biol* 2006, **68**:119–135.
19. Swarzacher HG, Wachtler F: **The nucleolus.** *Anat Embryol* 1993, **188**:515–536.
20. Wachtler F, Stahl A: **The nucleolus: a structural and functional interpretation.** *Micron* 1993, **24**:473–505.
21. Moss T, Stefanovsky VY: **Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I.** *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 1994, **50**:25–66.
22. Wang S, Zhao M, Li T: **Complete sequence of the 10.3 kb silkworm attacus ricini rDNA repeat, determination of the transcriptional initiation site and functional analysis of the intergenic spacer.** *DNA Seq* 2003, **14**:95–101.
23. Hillis DM, Dixon MT: **Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference.** *Q Rev Biol* 1991, **66**:411–453.
24. Volff J-N, Körtling C, Scharl M: **Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes.** *Mol Biol Evol* 2000, **17**:1673–1684.
25. Cioffi MB, Martins C, Bertollo LA: **Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish.** *BMC Evol Biol* 2010, **10**:271.
26. Wong LH, Andy Choo KH: **Evolutionary dynamics of transposable elements at the centromere.** *Trends Genet* 2004, **20**:611–616.
27. Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Pinhal D, Poletto AB, Martins C: **Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *cichla kelberi* and its contribution to the knowledge of fish genomes.** *Cytogenet Genome Res* 2009, **125**:224–234.
28. Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA: **Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements.** *Cytogenet Genome Res* 2011, **133**:34–42.
29. DaSilva C, Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O, Weissenbach J, Roest Croliius H: **Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the tetradoon *nigroviridis* genome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:1636–1641.
30. Koop BF, Davidson WS: **Genomics and the Genome Duplication in Salmonids.** In *Fisheries for Global Welfare and Environment*. Edited by Tsukamoto K, Kawamura T, Takeuchi T, Beard TD Jr, Kaiser MJ. Tokyo: Terrapub; 2008:77–86.
31. Kurzynska-Kokorniak A, Jamburuthugoda VK, Bibillo A, Eickbush TH: **DNA-directed DNA polymerase and strand displacement activity of the reverse transcriptase encoded by the R2 retrotransposon.** *J Mol Biol* 2007, **374**:322–333.
32. Jakubczak JL, Xiong Y, Eickbush TH: **Type I (RI) and type II (R2) ribosomal DNA insertions of *drosophila melanogaster* are retrotransposable elements close to those of *bombix mori*.** *J Mol Biol* 1990, **212**:37–52.
33. Ohlberger J, Mehner T, Staaks G, Höcker F: **Temperature-related physiological adaptations promote ecological divergence in a sympatric species pair of temperate freshwater fish. *Coregonus* spp.** *Funct Ecol* 2008, **22**:501–508.
34. Ohlberger J, Staaks G, Petzoldt T, Mehner T, Höcker F: **Physiological specialization by thermal adaptation drives ecological divergence in a sympatric fish species pair.** *Evol Ecol Res* 2008, **10**:1173–1185.
35. Fujiwara A, Abe S, Yamahara E, Yamazaki F, Yoshida MC: **Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes.** *Chromosome Res* 1998, **6**:463–471.
36. Matveev V, Okada N: **Retrotransposons of salmonid fishes (actinopterygii: salmonidae) and their evolution.** *Gene* 2008, **434**:16–28.
37. De Boer JG, Yazawa R, Davidson WS, Koop BF: **Burst and horizontal evolution of DNA transposons in the speciation of pseudotetraploid salmonids.** *BMC Genomics* 2007, **8**:422.
38. Krasnov A, Koskinen H, Afanasyev A, Mölsä H: **Transcribed Tc1-like transposons in salmonid fish.** *BMC Genomics* 2005, **6**:107.
39. Helland IP, Harrod C, Freyhof J, Mehner T: **Co-existence of a pair of pelagic planktivorous coregonid fishes.** *Evol Ecol Res* 2008, **10**:373–390.
40. Arnault C, Dufournel I: **Genome and stresses: reactions against aggressions, behaviour of transposable elements.** *Genetica* 1994, **93**:149–160.
41. Rebollo R, Horard B, Hubert B, Vieira C: **Jumping genes and epigenetics: towards new species.** *Gene* 2010, **454**:1–7.
42. Bestor TH, Tycko B: **Creation of genomic methylation patterns.** *Nat Genet* 1996, **12**:363–367.
43. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH: **Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites.** *Trends Genet* 1997, **13**:335–340.
44. Wichman HA, Van Den Bussche RA, Hamilton MJ, Baker RJ: **Transposable elements and the evolution of genome organization in mammals.** *Genetica* 1992, **86**:287–293.
45. Blémont C: **A brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution.** *Genetics* 2010, **186**:1085–1093.
46. McClintock B: **The significance of responses of the genome to challenge.** *Science* 1984, **226**:792–801.
47. McClintock B: **Mutable loci in maize.** *Carnegie Inst Wash Yrbk* 1949, **48**:142–154.
48. Hurst GDD, Werren JH: **The role of selfish elements in eukaryotic evolution.** *Nat Rev Genet* 2001, **2**:597–606.
49. Hua-Van A, Le Rouzic A, Boutin TS, Filée J, Capy P: **The struggle for life of the genome's selfish architects.** *Biol Direct* 2011, **6**:19.
50. Vieira C, Lepetit D, Dumont S, Blémont C: **Wake up of transposable elements following *drosophila simulans* worldwide colonization.** *Mol Biol Evol* 1999, **16**:1251–1255.
51. Volff JN: **Genome evolution and biodiversity in teleost fish.** *Heredity* 2005, **94**:280–294.
52. Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volff J-N: **Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates.** *Chromosome Res* 2008, **16**:203–215.
53. Noor MAF, Chang AS: **Evolutionary genetics: jumping into a New species.** *Curr Biol* 2006, **16**:R890–R892.
54. Hurst GDD, Schilthuisen M: **Selfish genetic elements and speciation.** *Heredity* 1998, **80**:2–8.
55. Kazazian HH Jr: **Mobile elements: drivers of genome evolution.** *Science* 2004, **303**:1626–1632.
56. Renaut S, Nolte AW, Bernatchez L: **Mining transcriptome sequences towards identifying adaptive single nucleotide polymorphisms in lake whitefish species pairs (*coregonus* spp. Salmonidae).** *Mol Ecol* 2010, **19**(Suppl.1):115–131.
57. Ráb P, Roth P: **Cold-blooded vertebrates.** In *Methods of chromosome analysis*. Edited by Balicek P, Forejt J, Rubes J. Brno: Cytogenet Sect Cs Biol Soc Publishers; 1988:115–124.
58. Fujiwara A, Nishida-Umehara C, Sakamoto T, Okamoto N, Nakayama I, Abe S: **Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation.** *Genetica* 2001, **111**:77–89.
59. Cremer M, Grasser F, Lanctôt C, Müller S, Neusser M, Zinner R, Solovei I, Cremer T: **Multicolor 3D Fluorescence *In Situ* Hybridization for Imaging Interphase Chromosomes.** In *The Nucleus: Volume I: Nuclei and Subnuclear Components, Methods in Molecular Biology™*, Volume Chapter 15, Volume 463. Edited by Hancock R: Humana Press; 2008:205–239. Springer Protocols. *Database GenBank*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
60. Zhang Q, Cooper RK, Tiersch TR: **Chromosomal location of the 28S ribosomal RNA gene of channel catfish by *in situ* polymerase chain reaction.** *J Fish Biol* 2000, **56**:388–397.
61. Dayrat B, Tillier A, Lecointre G, Tillier S: **New clades of euthyneuran gastropods (mollusca) from 28S rRNA sequences.** *Mol Phylogenet Evol* 2001, **19**:225–235.
62. Chombard C, Boury-Esnault N, Tillier S: **Reassessment of homology of morphological characters in tetractinellid sponges based on molecular data.** *Syst Biol* 1998, **47**:351–366.
63. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW: **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Edited by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. New York: Academic Press Inc; 1990:315–322.

65. Volf JN, Körting C, Meyer A, Scharl M: **Evolution and discontinuous distribution of Rex3 retrotransposons in fish.** *Mol Biol Evol* 2001, **18**:427–431.
66. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: **Basic local alignment search tool.** *J Mol Biol* 1990, **215**:403–410.
67. *National Center for Biotechnology Information.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.
68. Levan AK, Fredga K, Sandberg AA: **Nomenclature for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas* 1964, **52**:201–220.
69. Matthey R: **L'évolution de la formule chromosomale chez les vertébrés.** *Experientia* 1945, **1**:50–56.

doi:10.1186/1471-2148-13-42

**Cite this article as:** Symonová *et al.*: Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evolutionary Biology* 2013 **13**:42.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



### **Publikace 3 (Symonová et al. 2013a)**

Symonová R, Flajšhans M, **Sember A**, Havelka M, Gela D, Kořínková T, Rodina M, Rábová M, Ráb P. 2013. Molecular cytogenetics in artificial hybrid and highly polyploid sturgeons: an evolutionary story narrated by repetitive sequences. *Cytogenet Genome Res.* 141:153-162; zvaný článek do Themed Issue: “Molecular Cytogenetics of Fishes”

**IF**<sub>2013</sub>: 1,839

**Příspěvek autora:** všechny *in situ* experimenty na chromozómech jeseterů zahrnující komparativní genomovou hybridizaci (CGH) a genomovou *in situ* hybridizaci (GISH), vyhodnocení dat

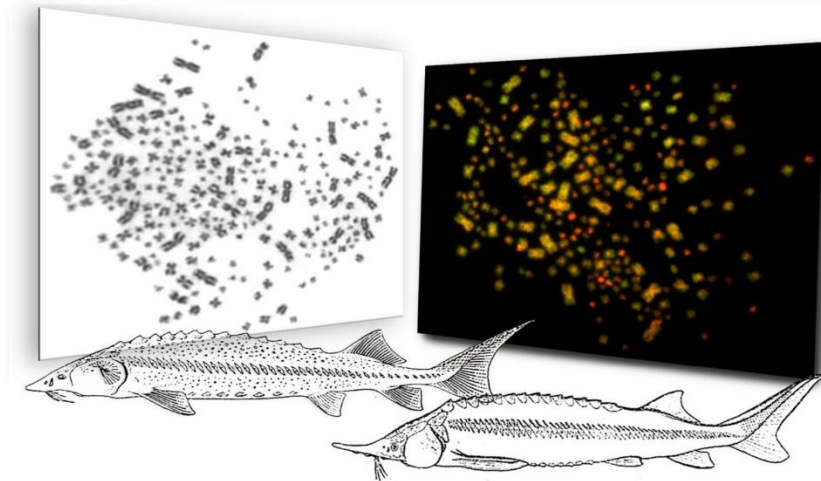


# Cytogenetic and Genome Research

## Molecular Cytogenetics of Fishes

Editor

**M.B. Cioffi**, São Carlos



S. Karger  
Medical and Scientific Publishers  
Basel · Freiburg · Paris ·  
London · New York ·  
New Delhi · Bangkok · Beijing ·  
Tokyo · Kuala Lumpur ·  
Singapore · Sydney

**KARGER**

# Molecular Cytogenetics in Artificial Hybrid and Highly Polyploid Sturgeons: An Evolutionary Story Narrated by Repetitive Sequences

R. Symonová<sup>a</sup> M. Flajšhans<sup>b</sup> A. Sember<sup>a</sup> M. Havelka<sup>b</sup> D. Gela<sup>b</sup> T. Kořínková<sup>a</sup>  
M. Rodina<sup>b</sup> M. Rábová<sup>a</sup> P. Ráb<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Liběchov, and <sup>b</sup>Faculty of Fisheries and Protection of Waters, South Bohemian Research Centre of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Vodňany, Czech Republic

## Key Words

*Acipenser* · GISH · Hybridization · Macrochromosomes · Microchromosomes · Polyploidy

## Abstract

We applied comparative genomic hybridization (CGH) and genomic in situ hybridization (GISH) to examine genomes of artificially produced sturgeon hybrids between sterlet, *Acipenser ruthenus* female (~120 chromosomes) or Russian sturgeon, *A. gueldenstaedtii* female (~240 chromosomes) and a spontaneous triploid Siberian sturgeon *A. baerii* male (~360 chromosomes), respectively. The ploidy levels of progenies were analyzed by karyotyping and flow cytometry. We found that the species-specific regions were surprisingly identifiable only on some micro- and small(er) macrochromosomes in hybrid metaphases. We hypothesize that these distinguishable regions are represented by species-specific repetitive sequences driven by more dynamic molecular evolutionary mechanisms. On larger chromosomes, GISH faintly visualized only blocks of pericentromeric and telomeric repetitive sequences, remaining regions were equally shared by both parental species. We concluded that the interspecies hybridization producing viable and even

fertile progeny is enabled by the fact that genomes of the species involved are likely divergent at the level of the repetitive sequences only and probably highly conserved in the coding sequences. These small differences of coding sequences are in concordance with previous estimations of relatedness of examined species producing artificial as well as natural hybrids. CGH and GISH represent a challenge in sturgeon cytogenetics as a valuable though technically not simple tool to discriminate chromosomes of parental species in hybrids. The potentials and drawbacks of CGH and GISH application in sturgeons are discussed and further experimental possibilities are proposed.

© 2013 S. Karger AG, Basel

Sturgeons and paddlefishes (Acipenseriformes: Acipenseridae and Polyodontidae) are bony fishes representing very basal lineages of ray-finned fishes [Nelson, 2006]. They include species exhibiting 3 evolutionary ploidy levels: palaeotetraploidy (4n, ~120 chromosomes), palaeooctaploidy (8n, ~240 chromosomes) and palaeododecaploidy (12n, ~360 chromosomes); yet, they behave as normal diploid organisms with a diploid/haploid somatic/germinal cycle over generations [Bir-

## KARGER

E-Mail karger@karger.com  
www.karger.com/cgr

© 2013 S. Karger AG, Basel  
1424-8581/13/0000-0000\$38.00/0

Radka Symonová  
Laboratory of Fish, Academy of Sciences of the Czech Republic  
Czech Academy of Sciences  
Rumburská 89, CZ-27721 Liběchov (Czech Republic)  
E-Mail symonova@natur.cuni.cz

stein et al., 1997; Birstein and DeSalle, 1998]. *Acipenseriformes* represent an ancient group still featuring very archaic characteristics (both genetic and anatomic) and therefore, being referred to as 'living fossils' [Gardiner, 1984]. Their propensity for whole-genome duplication and polyploidization expresses these archaic features [Ludwig et al., 2001; Crow et al., 2012]. Nowadays, only a fraction of their diversity (27 extant species) survives scattered throughout the Northern Hemisphere [Nelson, 2006]. The increasing anthropogenic impact onto the natural environment of Eurasian sturgeon species and populations steadily results in an elevated incidence of natural hybrids and dramatically declining natural populations of pure species during recent decades and their lower chance to reproduce [Pikitch et al., 2005; Ludwig, 2006; Tsekov et al., 2008; Dudu et al., 2011]. This poses another serious threat to the existence of pure species through extinction by hybridization of endangered populations (e.g. Ludwig et al. [2009]) together with the previous overexploiting of natural populations. Sturgeons are able to produce interspecies hybrids resulting in progeny with intermediate ploidy levels [Flajšhans and Vajcová, 2000; Vasil'eva et al., 2010; Havelka et al., 2011].

In this study, we present a molecular cytogenetic analysis of artificial hybrids of 3 *Acipenser* species, namely, between sterlet, *Acipenser ruthenus* female (~120 chromosomes) or Russian sturgeon, *A. gueldenstaedtii* female (~240 chromosomes) with a spontaneous triploid Siberian sturgeon *A. baerii* male (~360 chromosomes), respectively. The parent species are native to Eurasia. According to Birstein and Vasil'ev [1987] and Krieger et al. [2008], they belong to the Atlantic clade of the genus *Acipenser*, and at the same time, they are the most frequently bred and stocked sturgeon species in Europe.

## Materials and Methods

### Materials

The hybrid individuals resulting from the crossing experiments carried out in the hatchery of the Faculty of Fisheries and Water Protection, Vodňany [Havelka et al. in press] were used for molecular cytogenetic analyses. Among more crossing experiments, the following 2 batches of hybrids yielded chromosome preparations of sufficient quality to perform genomic *in situ* hybridization (GISH): the hybrid 4n ♀ *A. ruthenus* × 12n ♂ *A. baerii* and the hybrid 8n ♀ *A. gueldenstaedtii* × 12n ♂ *A. baerii*. In other experimental crossings, the most critical problems hampering molecular cytogenetic analyses were an insufficient chromosome spreading of metaphases with extremely high chromosome numbers (200–300 chromosomes).

### Flow Cytometry

Prior to karyotyping, the ploidy level of specimens was verified as a relative DNA content in blood cells with DAPI according to Linhart et al. [2006], using Partec CCA I cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany). Erythrocytes of the palaeotetraploid *A. ruthenus* gave a relative DNA content of 4n as the tetraploid standard.

### Blood Culturing and Chromosome Preparation

The leucocytes were cultured and chromosome spreads prepared according to the protocol of Fujiwara et al. [2001] with some modifications. Briefly, 0.2–0.5 ml of blood was collected from an anesthetized fish by puncturing the vena cava caudalis using a heparinized syringe. The leucocyte-rich plasma was used to set up primary cultures in 5 ml of the Medium 199 (Sigma, St. Louis, Mo., USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS Superior, Biochrom, Berlin, Germany), 1% Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma), LPS from *E. coli* (0.1 mg/ml of medium), PHA-P (18 µg/ml of medium; Remel, Lenexa, Kans., USA), Kanamycin (0.06 mg/ml of medium; Sigma) and 0.175 µl 10% mercaptoethanol (Sigma). After 120 h of incubation at 20°C, 5 ml of each culture was harvested using standard colchicine (2 drops of 0.1% colchicine per 5 ml of medium) and hypotonic (8 min) treatments followed by fixation in freshly prepared fixative (methanol: acetic acid 3:1, v/v), 3 times.

Some individuals were karyotyped using a direct method. These individuals were colchicized (0.1% per 100 g of body weight, for 1 h) and sacrificed by overdose of 2-phenoxyethanol anesthetics agent (Sigma). The cephalic kidney was removed, minced and the resulting cells were hypotonized for 8 min in 0.075 M KCl before being fixed in freshly prepared fixative (methanol: acetic acid 3:1, v/v). Chromosome slides were air-dried and dehydrated in an ethanol series (70, 80 and 96%, 3 min each) and kept deep frozen until analysis. Specimens were not deposited as vouchers. This study was covered by the Valid Animal Use Protocols No. CZ 00221 at the Institute of Animal Physiology and Genetics issued by the Czech Ministry of Agriculture.

### DNA Isolation

Whole genomic DNA (gDNA) of the pure species *A. ruthenus*, *A. baerii*, and *A. gueldenstaedtii* and of their hybrids were isolated from blood, muscles or fins using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

### Preparation of Probes for *in situ* Hybridizations

Labeling of the DNA probes was performed by nick translation using the Roche Nick Translation Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; cat. No. 11745808910) according to the manufacturer's instructions. The gDNAs of parental species were labeled indirectly with biotin-16-dUTP (Roche, cat. No. 11093070910) or digoxigenin-11-dUTP (Roche, cat. No. 11093088910), respectively, with a reversal labeling scheme to confirm the observed results and exclude any influence of antibodies and/or fluorochromes. The hybridization signal was detected by Anti-Digoxigenin-Rhodamine (Roche, cat. No. 11207750910) and Streptavidin-FITC (Invitrogen Life Technologies, San Diego, Calif., USA; cat. No. 43-4311). Based on the fragment size of the high molecular gDNA used, the desired fragment size of probes (200–500 bp) was achieved after 45–90 min of nick translation. For most experiments, we used 1 µg of gDNA per species and experiment. In one set of experiments, we

also tried to follow the ratio of genomes in hybrid specimens (i.e. 2:3), but we did not observe any significant difference in the resulting signal patterns. Unlabeled competitor DNA for the suppression of unspecific hybridization was prepared by amplification of the total gDNA, since large quantities of DNA were required. DNA was isolated from hybrids used for chromosome preparation in the case of comparative genomic hybridization (CGH) or from the respective pure species in the case of single-color GISH experiments. Whole genomic amplification of the gDNA isolated was performed with Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK, cat. No. 25-6600-31) and followed by sonication of amplified products (14–35 cycles, 10 pulses, 100% power) to the approximate fragment size of 100–200 bp, using the ultrasonic homogenizer Sonopuls HD 2070 (Bandelin Electronic, Berlin, Germany). To compare 2 different ways of competitor DNA fragmentation, we also cut competitor DNA by cyclic denaturation of the total hybrid gDNA at 97°C for 20 min followed by vortexing for 1 min (several cycles). However, after reaching the optimum fragment size of 100–200 bp, we recorded a rapid decrease of DNA concentration in the sample; therefore, the sonication procedure, despite also resulting in considerable losses of DNA, appeared to be a more efficient method. The competitor DNA was added with 50-fold excess of the concentration of the single gDNA probe. The probe cocktail contained 0.5 or 1 µg of labeled DNA of each species compared, 25 or 50 µg of unlabeled sonicated competitor from the corresponding hybrid DNA and 50 or 100 µg of sonicated salmon sperm DNA per slide (Sigma, cat. No. D9156) as a nonspecific competitor and DNA carrier. The hybridization mixture with DNA was precipitated in pure 96% ethanol, frozen at –20°C for at least 30 min (up to several hours), centrifuged at 13,000 RPM for 20 min, washed in 70% ethanol and air-dried at 37°C. The pellet was re-suspended in 35 µl of hybridization puffer as described by Neusser [2004].

#### Genomic *in situ* Hybridization

GISH was carried out according to the protocol used by Bi and Bogart [2006] with several modifications. After removal from the freezer and immediate dehydration in an ethanol series (70, 80 and 96%, 3 min each), slides were air-dried and then aged for 3 h at 37°C and for 30 min at 60°C. Prior to hybridization set up, chromosome preparations were incubated in 200 ng/ml DNase-free RNAse A (Top Bio, Czech Republic, cat. No. D106) in 2× SSC for 90 min at 37°C in a humid chamber. The slides were then briefly washed in 2× SSC, dehydrated in an ethanol series and air-dried. To remove remnants of cytoplasm, the slides were incubated in PBS at room temperature for 5 min and then placed into a pepsin solution (0.005% pepsin in 0.01 N HCl, w/v) at 37°C for 3 min and again dehydrated in an ethanol series. After air-drying, the slides were denatured in 75% formamide in 2× SSC at 74°C for 3 min and then immediately cooled down and dehydrated in 70% (cold), 80 and 96% ethanol (room temperature). The hybridization mixture was denatured at 86°C for 6 min and then immediately placed on ice for at least 10 min. The hybridization was allowed to proceed for at least 3 days at 37°C in a dark humid chamber. The stringent washing was done twice in 50% formamide in 2× SSC, pH 7.0 at 42°C for 5 min, 3 times in 1× SSC at 42°C for 7 min, and finally in 2× SSC at room temperature for 20 s. To block nonspecific binding sites for Streptavidin and Anti-Digoxigenin, the slides were treated with 500 µl of blocking solution containing 3% BSA (Baria, Czech Republic, cat. No. SP-5050) in 4× SSC and 0.01% Tween 20 at 37°C for 20 min. Afterwards, the first probe was detected by adding the

antibody solution (10 µl Anti-Digoxigenin-Rhodamine diluted in 150 µl 0.5% BSA in PBS or 2 µl Streptavidin-FITC diluted in 200 µl 10% FBS in PBS) and incubated at 37°C for 60 min in a dark humid chamber. The slides were then washed in 4× SSC and 0.01% Tween 4 times (7 min each) at 42°C. Afterwards, the second round of blocking took place and the second probe was detected with the respective antibody solution and then washed again as described above. Finally, chromosomes were counterstained with DAPI in mounting medium (Cambio, Cambridge, UK; cat. No. 1124-MD-50), added to the slide under a coverslip, sealed with nail polish, and stored cool and dark.

GISH and CGH results were completed by C-banding performed according to Haaf and Schmid [1984].

#### Image Analysis

Images were observed with an AX70 Olympus microscope equipped with a standard fluorescence filter set and captured with a black and white CCD camera separately for each fluorescent dye. Digital images were then pseudocolored (blue or red for DAPI, red for Rhodamine, green for FITC) and were processed in the Adobe Photoshop, version CS5. Chromosomes were classified according to Levan et al. [1964].

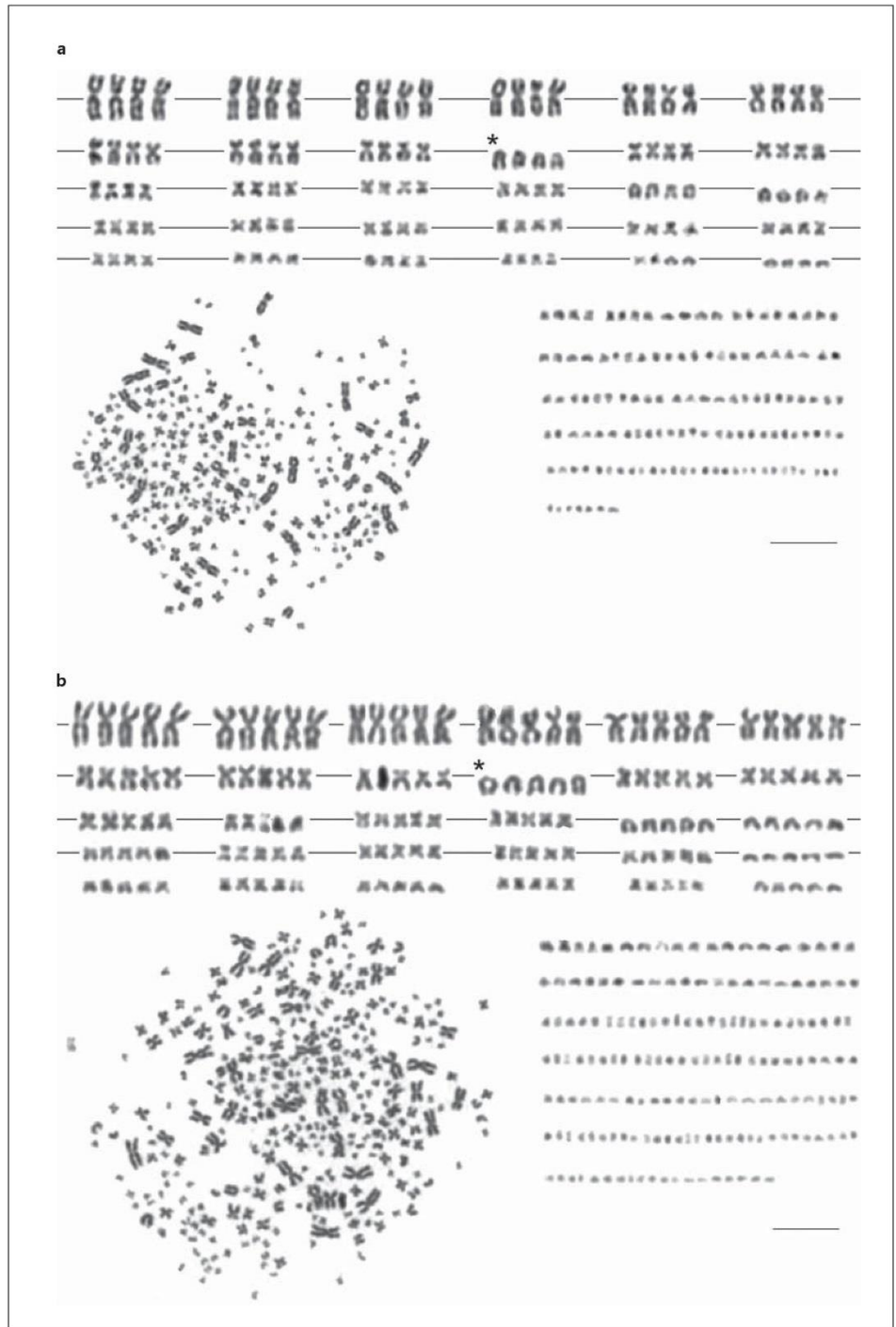
## Results

### Karyological Analyses and Chromosome Numbers in Hybrid Sturgeons

Representative Giemsa-stained metaphase chromosomes and respective karyotypes of the hybrids resulting from the 2 experimental crossings investigated are shown in figure 1. Namely, the hybrid 4n ♀ *A. ruthenus* × 12n ♂ *A. baerii* (fig.1a) with 120 macrochromosomes and approximately 129 microchromosomes and the hybrid 8n ♀ *A. gueldenstaedtii* × 12n ♂ *A. baerii* (fig.1b) with 150 macrochromosomes and approximately 186 microchromosomes. The numbers of ‘acipenseriform’ acrocentric chromosome markers (i.e. the group with the largest acrocentric chromosomes corresponding to the ploidy level, Symonová et al. [2010]) were identified to determine respective ploidy levels. The variation in the chromosome

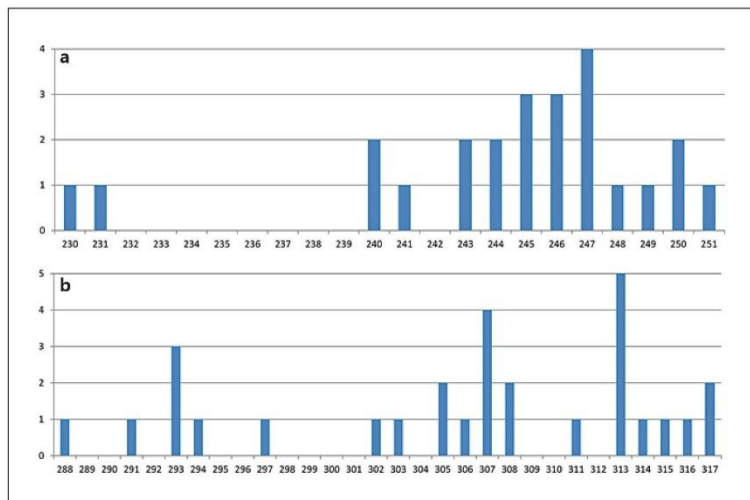
**Fig. 1.** Metaphase and the respective karyotype of the hybrid 4n ♀ *A. ruthenus* × 12n ♂ *A. baerii* (a) resulting in an 8n individual (in this metaphase) with 249 chromosomes and the hybrid 8n ♀ *A. gueldenstaedtii* × 12n ♂ *A. baerii* (b) resulting in a 10n individual (in this metaphase) with 316 chromosomes. Chromosomes of each metaphase are arranged according to their sizes as macrochromosomes (upper lines) and microchromosomes (in a single block below). The asterisk indicates the ‘acipenseriform’ chromosome markers, i.e. the group of the largest acrocentric chromosomes. Scale bars are 10 µm and refer to the karyotypes; the size of the metaphases was reduced to fit the image.





1

**Fig. 2.** Frequency of chromosome numbers in the hybrid  $4n$  ♀ *A. ruthenus* ×  $12n$  ♂ *A. baeri* (a) and  $8n$  ♀ *A. gueldenstaedtii* ×  $12n$  ♂ *A. baerii* (b). Three individuals scored in both groups. The apparently incomplete metaphases were not included as well as metaphases with numerous overlapping chromosomes preventing proper chromosome counting.



numbers of 3 individuals of each hybrid group examined are shown in figure 2a, b. The chromosome numbers ranged between 230–251 (fig. 2a) and 288–317 (fig. 2b). Several extremely low values of chromosome numbers were removed from the analyses, since they were incomplete.

#### Mapping of Parental Genomes in Hybrids Using CGH and GISH

To carry out CGH/GISH analyses in hybrid sturgeons, chromosome preparations of an extraordinary quality were essential; otherwise, no proper signal evaluation on metaphases with such extreme chromosome numbers would be possible. Therefore, we could perform GISH only in the 2 aforementioned crossing groups of artificial hybrids with the chromosome spreads of the highest quality.

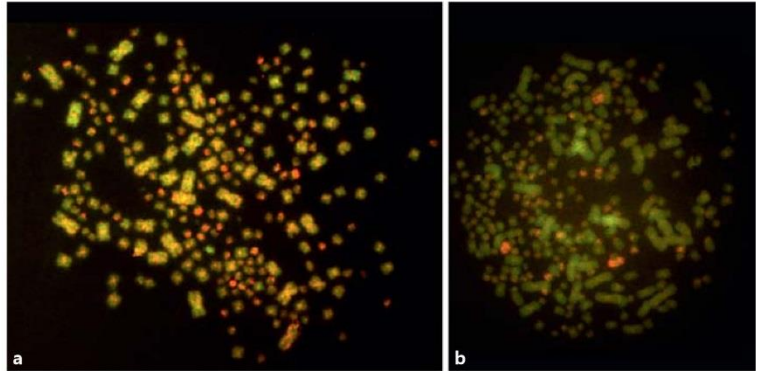
To begin with, we carried out several sets of CGH experiments with differentially labeled DNA of parental species to hybrid chromosomes with various concentrations (without competitor,  $10\times$  and  $25\times$  the concentration of the probe, respectively) of unlabeled competitor DNA derived from the tested hybrid genome. These experiments do not allow any interpretation, since a low concentration of competitor DNA derived from the hybrid genome. All chromosomes were stained with DNA of both genomes equally, and thus, the parent genomes were indistinguishable from each other in any of the hybrids (not shown). With the higher proportion of com-

petitor DNA (up to  $50\times$  the concentration of a single genome probe) derived from the hybrid genome, some species-specific bands or whole microchromosomes of respective genomes were identifiable (fig. 3a, b).

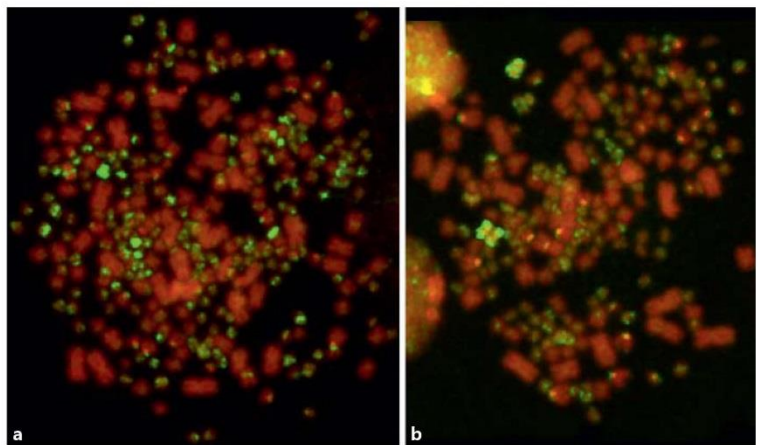
In the second stage, we performed a single-color GISH to one of the available hybrids (the crossing group 11) using the DNA of one of the parental species as the probe and DNA of another species as unlabeled competitor ( $50\times$ ) and vice versa (i.e. 2 experiments, each visualizing one of the parent species). These results confirmed the previous ones and enabled a plausible explanation and interpretation of the dual-color GISH experiments. In this set of experiments with the hybrid *A. baerii* × *A. gueldenstaedtii* ( $\sim 300$  chromosomes), the probe derived from the *A. baerii* genome clearly hybridized to nearly the entire or substantial part of more than 50 microchromosomes and small macrochromosomes. To the remaining (approximately) 100 microchromosomes and small macrochromosomes, this probe hybridized at least partially, mostly to regions of pericentromeric heterochromatin. The large macrochromosomes remained mostly without any species-specific signals. The probe derived from the *A. gueldenstaedtii* genome clearly hybridized to the entire or substantial part of more than 25 microchromosomes and small macrochromosomes. To the remaining (approximately) 50 chromosomes, this probe hybridized at least partially, mostly to pericentromeric heterochromatin regions. Moreover, the probe of *A. gueldenstaedtii* also clearly hybridized to 2 middle-



**Fig. 3.** CGH experiments to the metaphase spreads of the hybrid  $4n$  ♀ *A. ruthenus*  $\times$   $12n$  ♂ *A. baerii*; *A. ruthenus* gDNA was labeled in green and *A. baerii* gDNA in red (a) and  $8n$  ♀ *A. gueldenstaedtii*  $\times$   $12n$  ♂ *A. baerii*; *A. gueldenstaedtii* gDNA was labeled in red, *A. baerii* in green (b).



**Fig. 4.** GISH experiments to the metaphase spreads of a hybrid of the crossing  $8n$  ♀ *A. gueldenstaedtii*  $\times$   $12n$  ♂ *A. baerii*, with the *A. baerii* gDNA as probe (green signals) and the *A. gueldenstaedtii* gDNA as unlabeled competitor DNA (a) and the *A. gueldenstaedtii* gDNA as probe (green) and the *A. baerii* gDNA as unlabeled competitor (b). In both experiments, the black and white DAPI signals were visualized in the red channel to increase contrast.

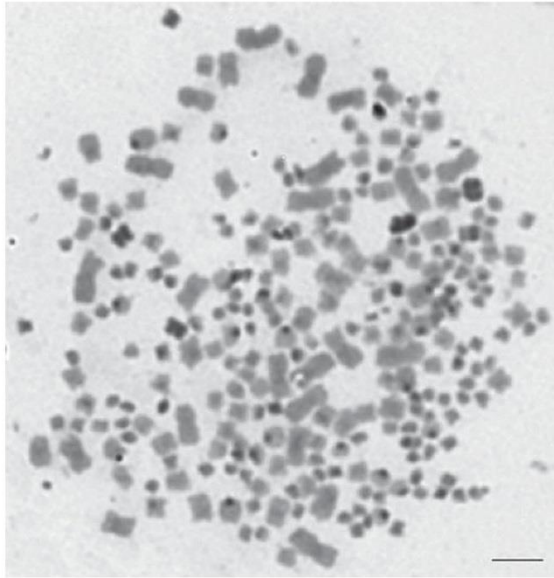


sized metacentric macrochromosomes with distinctly DAPI positive (i.e. AT-rich) regions (fig. 4b, bright green signals). The remaining macrochromosomes also appeared without distinct species-specific signals as in the previous genome. Both probes hybridized faintly only to pericentromeric and telomeric regions of some macrochromosomes (fig. 4).

These results show that specific signals of the respective parental species were detectable only on microchromosomes and small macrochromosomes (and 2 AT-rich metacentric chromosomes of the genome *A. gueldenstaedtii*), and only these chromosomes could, thus, be assigned to the respective parents. The ratio between signals of each parental genome in their hybrid approximately corresponds to the (reduced) ploidy level of parental ge-

nomes entering the experimental crossing, i.e.  $12n$  *A. baerii*  $\times$   $8n$  *A. gueldenstaedtii*. After the meiotic reduction, this ratio results in  $6n$  *A. baerii*:  $4n$  *A. gueldenstaedtii*, with the observed approximate ratio of signals 3:2.

To better identify the signals on microchromosomes and small macrochromosomes, we performed C-banding to parental (pure) species used in our experiments. C-banding in the  $8n$  *A. gueldenstaedtii* (fig. 5) well documents the distribution of repetitive sequences on small macro- and microchromosomes and over the entire length of 4 medium-sized metacentric chromosomes. These metacentric chromosomes correspond to 2 (i.e.  $4n$ , reduced set) chromosomes in the hybrid of  $8n$  ♀ *A. gueldenstaedtii*  $\times$   $12n$  ♂ *A. baerii* with distinct (green) *A. gueldenstaedtii* signal (fig. 4b).



**Fig. 5.** C-banding pattern in a pure 8n *A. gueldenstaedtii*; one of the parental species used in experimental crossings in this study. Four medium-sized metacentric macrochromosomes are distinctly stained as well as numerous smaller macrochromosomes and other microchromosomes. Scale bar = 10  $\mu$ m.

## Discussion

This study represents the first stage of research aimed at the analysis of genomic composition and origin of naturally (likely) allopolyploid sturgeons by reticulate speciation as proposed by Vasil'ev [1999, 2009], particularly those with high chromosome numbers as e.g. *A. brevirostrum* and *A. mikadoi* [ $\sim$ 360 and  $\sim$ 260 chromosomes, respectively; data on chromosome numbers have been collected by F. Fontana (<http://www.unife.it/dipartimento/biologia-evoluzione/progetti/geneweb>)] and to distinguish chromosomes of the parental species in hybrid chromosomal sets. Therefore, the initial experiments to hybrid genomes of known parental species and their ploidy level are essential prerequisites for the next stage of analysis.

Our observations indicate that the species-specific sequences on hybrid metaphases are mostly localized on micro- and small macrochromosomes. Due to the character of these signals (mostly bright spots) and their association with distinctly DAPI positive regions, we hy-

pothesize that these fractions of DNA are represented by accumulations of repetitive sequences. On the other hand, the fact that the competitor DNA blocked the species-specific probe to macrochromosomes, another fraction of repetitive sequences can be expected also on large chromosomes. Little is known about the biological significance and DNA composition (genes vs. non-coding regions) of microchromosomes when compared with macrochromosomes in fish or, generally, in cold-blooded vertebrates. Up to date, microchromosomes have been mostly explored in birds, where they exhibit high GC-content, high genes density and higher mutation and recombination rates in comparison to macrochromosomes [Hillier et al., 2004; Axelsson et al., 2005; Kuraku et al., 2006; Matsubara et al., 2012]. On the other hand, microchromosomes in the lizard *Anolis carolinensis* do not share these characteristics [Alföldi et al., 2011]. Such features of microchromosomes in sturgeons have never been analyzed. Among the closest living relatives of sturgeons, occurrence of microchromosomes is known in gars [e.g. Ráb et al., 1999], the bowfin *Amia calva* [Ohno et al., 1969] and lampreys [Caputo et al., 2011], however, mostly without any further investigations.

The character of GISH signal distribution in hybrid sturgeons confirms the assumptions of a closer phylogenetic relationship among *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii* and *A. ruthenus* proposed by Birstein and Vasil'ev [1987] and revised by Krieger et al. [2008]. Based on our results, it can also be speculated that only closely related species with low genome divergences, particularly in coding regions, can hybridize and form 'interspecies' viable and fertile hybrids. In this case, the efficacy of CGH and GISH might be considerably decreased. Moreover, the reduced rate of molecular evolution in sturgeons can also represent a factor preventing CGH and GISH from proper discrimination of species-specific sequences and chromosomes originating from the respective parental species. In sturgeons, the significantly reduced rate of molecular evolution has been recorded both in nuclear and mitochondrial genes on the level of gene and protein sequences [Krieger and Fuerst, 2002]. Further, de la Herrán et al. [2001] detected a reduced rate of molecular evolution also in an ancient satellite DNA family (otherwise rapidly evolving because of its lower functional constraints, Wichman et al. [1991]). Birstein and Vasil'ev [1987] evidenced a slow rate of karyological evolution in Acipenseriformes compared with teleost fishes. Similarly, a reduced rate of molecular evolution has also been recorded in other archaic groups (e.g. sharks and turtles) and has been



ascribed to some life-history traits shared by sturgeons (long generation time, large body size, ectothermy, low metabolic rate), summarized by Krieger and Fuerst [2002] and references therein. GISH has been routinely applied particularly in plants to discriminate parental genomes in interspecific hybrids and later modified for karyotyping plant chromosomes and phylogenetic applications based on semiquantitative analysis of GISH signals [Marková and Vyskot, 2009]. In plants, GISH utilizes genome-specific dispersed repetitive sequences, a prominent component of plant nuclear genomes [Bennetzen, 1998]. Recently, some first attempts in fishes have been performed, e.g. in a polyploid *Carassius*, [Knytl et al., 2013], diploid and polyploid *Cobitis* hybrids [Majtánová et al., 2012], in *Squalius* hybrids, [Rampin et al., 2012], and in cichlids [Valente et al., 2009]. In sturgeons, the application of GISH is highly desirable to explore the presumed allopolyploid origin of some species on the level of whole chromosome complements. However, at the same time, the application of this method is foreseen to be extremely difficult for several reasons, as opposed to e.g. *Carassius* or *Cobitis*. The high chromosome numbers preventing proper chromosome spreadings in metaphase preparations and prevailing small chromosome sizes (particularly numerous microchromosomes, frequently under-spread and overlapping each other as well as macrochromosomes, result in a biased GISH signal pattern and intensity) make application of GISH extremely difficult and demanding with respect to the quality of chromosome preparations. Moreover, including specific competitor DNA in high concentrations is inevitable, and thus, an extremely high amount of gDNA is required per experiment.

Utilization of genome-specific satellite DNA as routinely used in plants to easily distinguish parent genomes in hybrids appears not to be so straightforward in sturgeons regarding our results and the present day knowledge on sturgeon genome composition [Lanfredi et al., 2001] as well as an observed reduced rate of molecular evolution of this type of DNA in sturgeons [de la Herrán et al., 2001]. Specifically, according to Lanfredi et al. [2001], there are substantial differences in the proportion and distribution pattern of the Hind III satellite DNA family on chromosomes of *A. gueldenstaedtii* (with the highest proportion of satellite DNA), *A. baerii* (with an intermediate proportion) and *A. ruthenus* (with the lowest proportion). Moreover, Lanfredi et al. [2001] have successfully used satellite DNA derived from a single species (*A. naccarii*) as a FISH probe to 7 other species of the genera *Acipenser* and *Huso*. These results indicate that at

least some fraction of satellite DNA occurs unspecifically in more species and in various proportions and, therefore, could act as DNA blurring the genome-specific signal pattern on hybrid metaphases. In the light of results presented here, we can hypothesize that at least 2 classes of repetitive sequences may occur: one class, presumably more ancestral, with a reduced rate of molecular evolution as evidenced before and located on some micro- and on most macrochromosomes; and another class of repetitive sequences with a nonreduced, or even accelerated, rate of molecular evolution, presumably evolutionary derived and divergent in respective species. This second class of repetitive sequences may account for the species-specific differences and be located on some fraction of microchromosomes and smaller macrochromosomes as evidenced by our single-color GISH experiment. This shows that repetitive sequences represent a clue to understanding genome evolution in sturgeons. Also in plants, the importance of repetitive sequences for the GISH efficacy is based on the fact that they generally evolve faster than unique sequences and genes and make it possible to differentiate chromosomes even from closely related species [Schwarzacher et al., 1989]. However, the repetitive sequences appear to be distributed predominantly in micro- and smaller macrochromosomes in sturgeons as opposed to plants. The crucial role of repetitive sequences in the fish genome was recently summarized in detail by Cioffi and Bertollo [2012] and Vicari et al. [2010], who both underline the importance of additional investigations in this field.

Therefore, further experiments will be desirable, beginning with CGH experiments between more and less related sturgeon species to 'calibrate' the method on species on a gradient of genome divergences, optimization in terms of stringency condition during detection and involving suppression subtractive hybridization [Lukyanov et al., 2007] methods to produce more species-specific probes. Moreover, a more detailed analysis of repetitive sequences would be highly desirable to extend our knowledge on types of repetitive sequences and their localization on micro- and macrochromosomes, e.g. by using Cot1-DNA and other fractions of DNA [Trifonov et al., 2009] as FISH probes, completed by sequencing. These steps will contribute to the successful application of GISH to naturally allopolyploid individuals and species with unknown parental genomes in the future.

## Acknowledgements

This study was supported in part by the project Nos. 523/08/0824 and P506/11/P596 of the Grant Agency of the Czech Republic, and RVO 67985904. We extend our thanks to Dr. Fran-

cesco Fontana for maintaining and updating his web page on sturgeon chromosome literature 'The chromosomes of Acipenseriformes' and to Jana Čechová for her careful laboratory assistance. This study is a part of the series 'Molecular Cytogenetics of Ancient Fishes'.

## References

- Alföldi J, Di Palma F, Grabherr M, Williams C, Kong L, et al: The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature* 477:587–591 (2011).
- Axelsson E, Webster MT, Smith NG, Burt DW, Ellegren H: Comparison of the chicken and turkey genomes reveals a higher rate of nucleotide divergence on microchromosomes than macrochromosomes. *Genome Res* 15:120–125 (2005).
- Bennetzen JL: The structure and evolution of angiosperm nuclear genomes. *Curr Opin Plant Biol* 1:103–108 (1998).
- Bi K, Bogart JP: Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic in situ hybridization (GISH). *Cytogenet Genome Res* 112:307–312 (2006).
- Birstein VJ, DeSalle R: Molecular phylogeny of Acipenserinae. *Mol Phylogenet Evol* 9:141–155 (1998).
- Birstein VJ, Vasil'ev VP: Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes (Pisces): karyotypes, nucleoli, and nucleolus-organizer regions in four acipenserid species. *Genetica* 72:3–12 (1987).
- Birstein VJ, Hanner R, DeSalle R: Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. *Environ Biol Fish* 48:127–155 (1997).
- Caputo V, Giovannotti M, Cerioni PN, Splendiani A, Tagliavini J, Olmo E: Chromosomal study of a lamprey (*Lampetra zanandreae* Vladykov, 1955) (Petromyzonida: Petromyzontiformes): conventional and FISH analysis. *Chromosome Res* 19:481–491 (2011).
- Cioffi MB, Bertollo LAC: Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish, in Garrido-Ramos MA (ed): *Repetitive DNA*. *Genome Dyn* 7:197–221 (2012).
- Crow KC, Smith CD, Cheng JF, Wagner GP, Amemiya CA: An independent genome duplication inferred from Hox paralogs in the American paddlefish – a representative basal ray-finned fish and important comparative reference. *Genome Biol Evol* 4:937–953 (2012).
- de la Herrán R, Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, et al: Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. *Mol Biol Evol* 18:432–436 (2001).
- Dudu A, Suciú R, Paraschiv M, Georgescu SE, Costache M, Berrebi P: Nuclear markers of Danube sturgeons hybridization. *Int J Mol Sci* 12:6796–6809 (2011).
- Flajšhans M, Vajcová V: Odd ploidy levels in sturgeons suggest a backcross of interspecific hexaploid sturgeon hybrids to evolutionarily tetraploid and/or octaploid parental species. *Folia Zool* 49:133–138 (2000).
- Fujiwara A, Nishida-Umehara C, Sakamoto T, Okamoto N, Nakayama I, Abe S: Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. *Genetica* 111:77–89 (2001).
- Gardiner BG: Sturgeons as living fossils, in Eldredge N, Stanley SM (eds): *Living Fossils*, pp 148–152 (Springer, New York 1984).
- Haaf T, Schmid M: An early stage of ZW/ZZ sex chromosome differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma* 89:37–41 (1984).
- Havelka M, Kašpar V, Hulák M, Flajšhans M: Sturgeon genetics and cytogenetics: a review related to ploidy levels and interspecific hybridization. *Folia Zool* 60:93–103 (2011).
- Havelka M, Hulák M, Ráb P, Rábová M, Lieckfeldt D, et al: Fertility of a spontaneous triploid male Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *BMC Genetics*, submitted.
- Hillier LW, Miller W, Birney E, Warren W, Hardison RC, et al: Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432:695–716 (2004).
- Knytl M, Kalous L, Symonová R, Rylková K, Ráb P: Chromosome studies of European cyprinid fishes: cross-species painting reveals natural allotetraploid origin of a *Carassius* female with 206 chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 139:276–283 (2013).
- Krieger J, Fuerst PA: Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes. *Mol Biol Evol* 19:891–897 (2002).
- Krieger J, Hett AK, Fuerst PA, Artyukhin E, Ludwig A: The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. *J Appl Ichthyol* 24 Suppl 1:36–45 (2008).
- Kuraku S, Ishijima J, Nishida-Umehara Ch, Agata K, Kuratani S, Matsuda Y: cDNA-based gene mapping and GC<sub>3</sub> profiling in the soft-shelled turtle suggest a chromosomal size-dependent GC bias shared by sauropsids. *Chromosome Res* 14:187–202 (2006).
- Lanfredi M, Congiu L, Garrido-Ramos MA, de la Herrán R, Leis M, et al: Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Res* 9:47–52 (2001).
- Levan AK, Fredga K, Sandberg AA: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201–220 (1964).
- Linhart O, Rodina M, Flajšhans M, Mavrodiev N, Nebesářová J, et al: Studies on sperm of diploid and triploid tench (*Tinca tinca* L.). *Aquac Int* 14:9–25 (2006).
- Ludwig A: A sturgeon view on conservation genetics. *Eur J Wildlife Res* 52:3–8 (2006).
- Ludwig A, Belfiore NM, Pitra Ch, Svirsky V, Jenneckens I: Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* 158:1203–1215 (2001).
- Ludwig A, Lippold S, Debus L, Reinartz R: First evidence of hybridization between endangered sterlets (*Acipenser ruthenus*) and exotic Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) in the Danube River. *Biol Invasions* 11:753–760 (2009).
- Lukyanov SA, Rebrikov D, Budzin AA: Suppression subtractive hybridization, in Budzin A, Lukyanov S (eds): *Nucleic Acids Hybridization: Modern Applications*, pp 53–84 (Springer, Dordrecht 2007).
- Majtánová Z, Choleva L, Symonová R, Ráb P: Molecular cytogenetic identification of parental genomes in triploid hybrid spined loaches (*Cobitis*, Cypriniformes). *Chromosome Res* 20:812 (2012).
- Marková M, Vyskot B: New horizons of genomic in situ hybridization (GISH). *Cytogenet Genome Res* 126:368–375 (2009).
- Matsubara K, Kuraku S, Tarui H, Nishimura O, Nishida Ch, et al: Intra-genomic GC heterogeneity in sauropsids: evolutionary insights from cDNA mapping and GC<sub>3</sub> profiling in snake. *BMC Genomics* 13:604 (2012).
- Nelson JS: *Fishes of the World*, ed 4 (Wiley, New Jersey 2006).
- Neusser M: Karyotypeevolution, Genomorganisation und Zellkernarchitektur der Neuweltaffen. Thesis, München (2004).
- Ohno S, Muramoto J, Stenius C, Christian L, Kittrell WA, Atkin NB: Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holostean fishes. *Chromosoma* 26:35–40 (1969).
- Pikitch EK, Doukakis P, Lauck L, Chakrabarty P, Erickson D: Status, trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries. *Fish and Fisheries* 6:233–265 (2005).
- Ráb P, Rábová M, Reed KM, Phillips RB: Chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the primitive semionotiform fish, longnose gar *Lepisosteus osseus*. *Chromosome Res* 7:475–480 (1999).

- Rampin M, Bi K, Bogart JP, Collares-Pereira MJ: Identifying parental chromosomes and genomic rearrangements in animal hybrid complexes of species with small genome size using Genomic in situ Hybridization (GISH). *Comp Cytogenet* 6:287–300 (2012).
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS: In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot* 64:315–324 (1989).
- Symonová R, Flajšhans M, Gela D, Pelikánová Š, Rábová M, et al: Tetraploidy in paddlefish, *Polyodon spathula*? – 34 years later. Abstract 19th International Colloquium on Animal Cytogenetics and Gene Mapping. *Chromosome Res* 18:754 (2010).
- Trifonov VA, Vorobieva NN, Rens W: FISH with and without COT1DNA, in Liehr T (ed): *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) – Application Guide*, pp 99–109 (Springer, Berlin 2009).
- Tsekov A, Ivanova P, Angelov M, Atanasova S, Bloesch J: Natural sturgeon hybrids along Bulgarian Black Sea coast and in Danube River. *Acta Zool Bulgar* 60:311–316 (2008).
- Valente GT, Schneider CH, Gross MC, Feldberg E, Martins C: Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Res* 17:791–799 (2009).
- Vasil'ev VP: Polyploidization by reticular speciation in Acipenseriform evolution: a working hypothesis. *J Appl Ichthyol* 15:29–31 (1999).
- Vasil'ev VP: Mechanisms of polyploid evolution in fish: polyploidy in sturgeons, in Carmona R, Domezain A, García-Gallego M, Hernando JA, Rodríguez F, Ruiz-Rejón M (eds): *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons*, pp 97–117 (Springer, Dordrecht 2009).
- Vasil'eva ED, Vasil'ev VP, Ponomareva EN, Lapukhin YA: Triple hybrids obtained by artificial hybridization of the Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* with the hybrid of the starred sturgeon *A. stellatus* and the great sturgeon *A. huso* (Acipenseridae): the kind of inheritance of some morphological characters and fertility of the parental hybrid form. *J Ichthyol* 50:605–617 (2010).
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, et al: Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76:1094–1116 (2010).
- Wichman HA, Payne CT, Ryder OA, Hamilton MJ, Maltbie M, Baker RJ: Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. *J Hered* 82:369–377 (1991).

#### **Publikace 4 (Symonová et al. 2015)**

Symonová R, **Sember A**, Majtánová Z, Ráb P. 2015. Characterization of fish genomes by GISH and CGH. In: Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts), Eds: Catherine Ozouf-Costaz, Eva Pisano, Fausto Foresti, Lurdes Foresti de Almeida Toledo CRC Press, Inc., Enfield, NH 03748, USA.

**Příspěvek autora:** příspěvek k optimalizaci metod GISH a CGH u ryb a spolupráce na textu



# Fish Cytogenetic Techniques

Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans

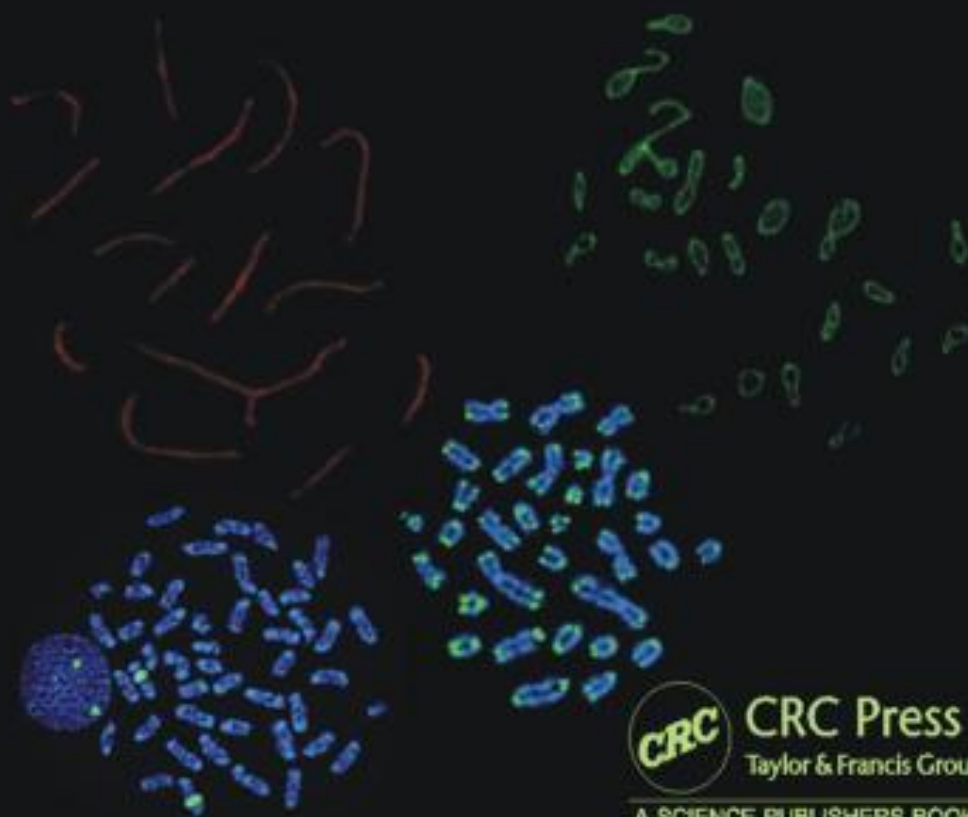
*Editors*

**Catherine Ozouf-Costaz**

**Eva Pisano**

**Fausto Foresti**

**Lurdes Foresti de Almeida Toledo**



**CRC** CRC Press  
Taylor & Francis Group  
A SCIENCE PUBLISHERS BOOK

---

# Characterization of Fish Genomes by GISH and CGH

R. Symonová,<sup>1,#,\*</sup> A. Sember,<sup>1,2</sup> Z. Majtánová<sup>1,3</sup> and P. Ráb<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, 277 21 Liběchov, Czech Republic.

<sup>2</sup>Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2, Czech Republic.

<sup>3</sup>Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic.

\*Current address: Research Institute for Limnology, University of Innsbruck, Mondseestrasse 9, A-5310 Mondsee, Austria

\*Corresponding author: [Radka.Symonova@uibk.ac.at](mailto:Radka.Symonova@uibk.ac.at)

## Principles

Using total genomic DNA (gDNA) as a probe for *in situ* hybridization (ISH) experiments is a modified FISH (fluorescence *in situ* hybridization) technique that becomes an increasingly relevant approach in non-clinical research, including fish molecular cytogenetics. GISH (genomic *in situ* hybridization) and CGH (comparative genomic hybridization) are two basic types of ISH experiments using gDNA as probes. These methods utilize DNA-DNA hybridization and sequence similarities to visualize genome specific DNA on metaphase spreads. They allow for comprehensive analysis of entire genomes:

1. In GISH the labelled gDNA of one organism is used as a probe and hybridized to target chromosomal DNA of another, usually a hybrid organism, to discriminate chromosomes originating in one of the parental species.
2. CGH enables the detection of unbalanced chromosomal rearrangements. In clinical application, one reference gDNA probe (healthy control) and one studied gDNA probe (patient, DNA from tumor cells) are cohybridized to reference metaphase spreads only. In molecular cytogenetics this method enables comparison of two differentially labelled gDNA probes on

chromosomes of one or both tested genomes (i.e., reciprocal scheme when chromosomes preparations of both genomes are available). In principle, in a typical CGH experiment, one of the compared gDNA always belongs to the genome that is identical with the genome of chromosomes tested. The experiment may be designed as intraspecies or interspecies CGH. The intraspecies design may involve a comparison of male and female gDNA to identify sex-specific chromosomes (regions) or a comparison of a tumour genome (patient) with healthy DNA (reference) on normal chromosomes. The interspecies design may involve gDNA of two or several species compared against each other. For an example and specific details in fish see Symonová et al. (2013a).

A variety of modifications of CGH and GISH exist based on the tested system and DNA/chromosome probes available, in the end blurring the differences between these two approaches. Actually, the most striking difference is in the target genome—a hybrid of compared organisms (mostly GISH) or a pure species more or less related to the compared organisms (mostly CGH). Both approaches employ an unlabelled competitor DNA, *sensu* Sealey et al. (1985) or the Cot1-DNA, *sensu* Landegent et al. (1987). Total gDNA of another species, phylogenetically not closely related, is used unlabelled and sheared (physically or enzymatically) to about 100 bp long fragments as competitor DNA to suppress hybridization of unspecific repetitive sequences, blurring the species' specific signal.

### Applications and Limitations

GISH has been routinely used especially in plant cytogenetics to discriminate parental genomes in allopolyploids, e.g., Takahashi et al. (1999), Matoba et al. (2007) and Lim et al. (2007). In conventional GISH experiments, labelled gDNA from one species and unlabelled competitor DNA from another species are simultaneously applied to chromosome spreads to map chromosomal distribution of DNA of the labelled genome. Later, comparative GISH (cGISH) technology has been introduced in plants She et al. (2012). In cGISH experiments, the labelled gDNA of one species hybridizes to chromosomes of more or less related species without the application of competitor DNA; thus, the hybridization signals represent DNA sequences in common between the two species. Therefore, cGISH technology is a useful tool for comparative genome analysis to visualize chromosomal distribution of conserved DNA sequences.

CGH has been developed as a tool for solid tumour cytogenetics, to analyze chromosomal imbalances in entire genomes (Kallioniemi et al. 1992). Since cells of solid tumours usually do not produce usable chromosome spreads, it is possible to compare their genome with a reference (healthy) genome in the form of gDNA to normal (healthy) chromosomes. An analogous situation can be found, when an entire genome comparison of more fish species is desirable.

However, in some species no usable chromosome spreads are available. In this case, only their gDNA can be used for comparison with chromosomes of other species.

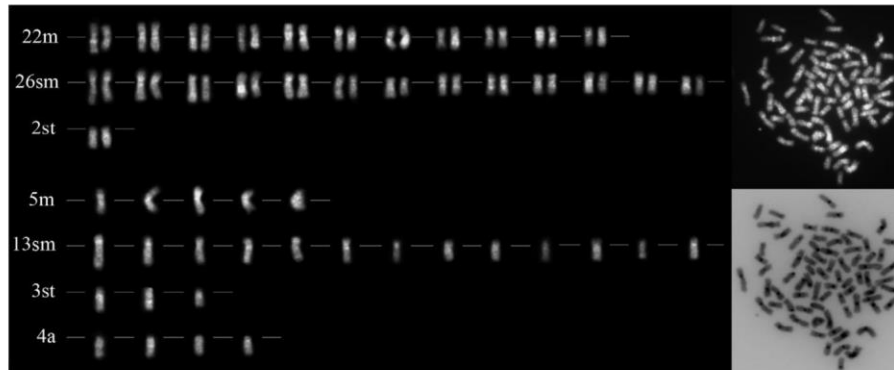
In fishes, male/female CGH was applied to mitotic and meiotic chromosomes of the zebrafish *Danio rerio*, the platyfish *Xiphophorus maculatus* and the guppy *Poecilia reticulata* to localize sex-specific chromosome regions and track early stages of sex chromosome differentiation (Traut and Winking 2001). Application of CGH has also proven to be a good tool in genomic comparison within sympatric species pairs of *Coregonus* as shown by Symonová et al. (2013b). Cross-species GISH using labelled cDNA of tilapia *Oreochromis niloticus* were used to compare syntenic chromosomal regions across the genomes of several South American and African cichlid species (Valente et al. 2009). Identification of species-specific chromosomes in an allotetraploid gynogenetically reproducing female genome of *Carassius auratus gibelio* was documented using GISH by Zhu and Gui (2007). A similar study was performed by Knytl et al. (2013) in European *Carassius* and revealed a natural allotetraploid female.

Another example of the useful application of GISH in fishes is the identification of nuclear genomic constituents in hybrid spined loaches. Across Europe, the spined loach of the genus *Cobitis* produced 2n, 3n and 4n clonal lineages. The all-female clones originated by hybridization and subsequent genome addition in pre-Holocene times and reproduce by gynogenesis. The high morphological, and in some cases biochemical, similarity makes proper identification of their biotypes and studies on chromosomal rearrangements difficult. For instance, genomes of *C. tanaitica* and *C. taenia* in their hybrids cannot be distinguished by allozyme studies, but they can be clearly identified by GISH. Moreover, homologous and homoeologous chromosomes of hybrids cannot be distinguished in the normal DAPI stained metaphase. Here, as an example, we show results of a GISH experiment with labelled gDNA from both parental species as probes to discriminate genomic composition of the *C. elongatoides-1tanaitica* hybrid. GISH clearly distinguishes the two haploid sets of the *C. elongatoides* genome and one haploid set of the *C. tanaitica* chromosomes in this hybrid (see Fig. 1).

### Protocol

The following protocols are modified combinations of procedures described by Cremer et al. (2008), Bi and Bogart (2006), Traut et al. (1999) and references therein.

Chromosome spreads should be prepared in advance, so that chromosome aging can be carried out.



**Figure 1.** Representative metaphases of the *Cobitis elongatoides-tanaitica* hybrid visualized by GISH with *C. elongatoides* and *C. tanaitica* genomic probes. Homologous and homoeologous chromosomes of triploid hybrids cannot be distinguished in normal DAPI stained metaphase, however, the GISH clearly distinguishes the *C. elongatoides* (shown as those with green fluorescence) and *C. tanaitica* chromosomes (shown with red fluorescence) in *C. elongatoides-tanaitica* hybrid.

Color image of this figure appears in the color plate section at the end of the book.

### 1. gDNA isolation and specific competitor/Cot1-DNA preparation

The phenol-chloroform method of gDNA isolation, *sensu* Graham (1978) can be employed as well as using commercial kits, e.g., DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). The total DNA amount required for one GISH/CGH experiment is related to the amount of the competitor or Cot1-DNA. According to standardized protocols, e.g., Cremer et al. (2008), 1 µg of gDNA per genome probe is prepared. Therefore, when using a competitor or Cot1-DNA in 3 to 50 times higher amount than the probe, as much as 4 to 51 µg of gDNA is required for one experiment and one genome. Application of competitor DNA involves using additional unlabelled gDNA sonicated into 100–200 bp long fragments in the final concentration 3 to 50 times higher than the probe. The intensity and number of cycles of sonication has to be tested for each DNA probe individually. A crucial step is cooling the vessel containing DNA after each cycle of sonication to avoid an excess of degradation. The concentration of the competitor DNA has to be measured after the sonication, because during this step, some DNA can be lost. The preparation of the Cot1-DNA is described by Trifonov et al. (2009).

In this step, a way of gDNA amplification may become useful, e.g., GenomiPhi DNA amplification kits by GE Healthcare or Amersham Biosciences as well as a way of DNA concentration using a vacuum concentrator machine.

Particularly for CGH, it is crucial to isolate a higher amount of gDNA of very good quality in terms of its purity and similar fragment size. Therefore, the conventional phenol-chloroform method is rather suggested for this step. In the case only when a little amount of the starting material (tissue) is available, the Chelex® 100 gDNA extraction can be employed as described by Walsh et al. (1991).

## 2. Chromosome spreads preparation and aging

Chromosome spreads can be produced by either of the methods described in this book. Other possibilities to produce chromosome spreads in fishes are lymphocyte culture described by Fujiwara et al. (2001) or the direct preparation from cephalic kidneys described by Ráb and Roth (1988).

To improve the adhesion of chromosomes to the glass surface and to make the structure of the chromosome compact and thus enable optimal access of the labelled DNA to the target DNA, aging of the chromosomal preparations is highly recommended. The routinely applied and the easiest way is dry heat aging through one of these incubations: 7 days at RT, 3 to 8 hrs at 37°C, or 1 to 3 hrs at 60°C. The exposition of chromosome preparations to higher temperature also reduces the effects of cytoplasm remnants over chromosome spreads, when stained with DAPI.

A possible option is chemical aging, by exposing a slide with 150–200 µl of EtOH covered with a coverslip to 94°C for 2 to 20 sec (in a thermocycler). The chemical aging can be carried out when it is desirable to shorten the whole protocol. For more details, see Henegariu et al. 2001.

## 3. Chromosome spread pre-treatment

Pre-treatment of chromosome spreads prior to ISH allows

- decreasing the background, which results in an unspecific signal, by removing cytoplasm remnants, RNA and proteins that can bind to probe and to detection reagents.
- improving the access of DNA probes to the target DNA.

Pre-treatment is performed according to the following steps:

- a) Brief equilibration in 2x SSC, 5 min, RT.
- b) RNase treatment: Drop 200 µl/slide of RNase solution (20 µg/µl), cover with cover slips and incubate for 1 to 3 hrs at 37°C.
- c) Wash in PBS, 5 min, RT.
- d) Pepsinization: incubate slides in a coplin jar with pepsinization solution for 1 to 3 min at 37°C in a water bath.
- e) Wash in 4x SSC, 5 min at RT.

## 4. Probe preparation, DNA labelling by Nick Translation (NT)

The best method of gDNA probe labelling is the Nick Translation (NT). This procedure can be carried out either using a commercial kit (e.g., the Roche Nick Translation Mix, Invitrogen BioNick™ DNA Labelling System or Abbott Molecular Nick Translation Kit) according to the manufacturer's instructions or according to the following protocol (the price per reaction in the commercial kits is much higher than when chemicals are purchased separately). The DNA probe can be labelled either directly with dUTP coupled with fluorochromes



(e.g., Cy<sup>TM</sup>3-dUTP, FITC-dUTP, Rhodamin-dUTP, Alexa Fluor® products, etc.) or indirectly with dUTP coupled with haptens (e.g., biotin and digoxigenin). When working with a directly labelled DNA probe, more steps of the protocol must be performed protected from a direct light source because the risk of fluorochrome bleaching during the manipulations is higher; on the other side, the use of an indirectly labelled gDNA probe can increase the risk of an unspecific background during hybridization signal analysis.

NT reaction:

1 µg gDNA  
 5 µl 10x NT Buffer  
 5 µl NT dNTPs-mix  
 5 µl 0.1 M mercaptoethanol  
 1 to 2.5 µl modified dUTP 1 mM (i.e., Biotin-dUPT/Digoxigenin-dUTP)  
 1 µl DNA polymerase I (0.1 U/µL)  
 1 µl DNase I (2,000 U/mL, diluted 1:10–200 with ddH<sub>2</sub>O)  
 x µl ddH<sub>2</sub>O q.s.p. 50 µl/reaction

According to the standard protocol (e.g., Cremer et al. 2008 and/or manufacturers of the commercial kits), the NT reaction involves incubation for 90 min at 15°C. However, this time strongly depends on the starting gDNA quality and the length of its fragments. Even when gDNA of the recommended fragments size (i.e., 3 to 5 kbp) is used, the time required for reaching the proper resulting fragment size (200 to 500 bp) may vary strongly and needs to be tested in each batch/species individually prior to preparing a higher amount of probes.

For this purpose, either commercial Biotin-dUTP/Digoxigenin-dUTP (e.g., Roche) are available, or there is a possibility to perform coupling of hapten succinimidyl esters (in DMSO) to aminoallyl-dUTP as described by Cremer et al. (2008). In the latter case, the cost is 100 to 300 times lower than using commercial biotin/digoxigenin-dUTPs.

Check with the 0.8% agarose gel electrophoresis, whether the length of DNA fragments is in the range of 200 to 500 bp. Probes should be kept on ice during electrophoresis. When longer fragments occur, additional time of NT incubation would be necessary (see “Troubleshooting”). As soon as the right fragment size is obtained, stop the NT reaction by following these steps (or as indicated by the NT kit manufacturer):

1. Add 2 ul 0.5 M EDTA, pH 8, and mix well.
2. Incubate 10 min at 65°C.
3. Cool on ice.

The NT product can either be stored at –20°C for up to several years or can be immediately used as follows:

- a) Mix the labelled probes that will be hybridized together. When the competitor/Cot1-DNA is used, add this DNA in the concentration 3- to

50-fold the concentration of one probe DNA. The competitor DNA can be derived from one genome only, usually from the same one as the chromosome preparation originated. However, different modifications according to experimental scheme are possible.

- b) Add following reagents:  
5 µg unlabelled salmon sperm\* DNA for each probe  
0.1 vol. 3 M Natrium (Sodium) Acetate pH 5.2  
2.5 vol. 96% EtOH
- \*when working with salmonid fishes, use BSA as blocking reagent instead of salmon sperm.
- c) Mix all components gently.
  - d) Incubate at least for 30 min at  $-20^{\circ}\text{C}$  (this step can be prolonged for up to several days).
  - e) Centrifuge at 13,000 RPM for 15 to 20 min.
  - f) Discard the supernatant.
  - g) Add 200 µl of 70% undenatured ethanol to wash out the saline components such as sodium acetate.
  - h) Centrifuge at 13,000 RPM for 15 to 20 min.
  - i) Discard the supernatant.
  - j) Dry the pellet carefully with an absorbent and antistatic laboratory wipe. Let it dry for 1 to 2 minutes at  $60^{\circ}\text{C}$  or 10 to 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$  until all the liquid has evaporated. When possible, a vacuum centrifuge can be used in this step instead of  $37^{\circ}\text{C}/60^{\circ}\text{C}$  incubation.
  - k) Re-suspend the pellet in 20 to 30 µl of the hybridization buffer and shake overnight at  $37^{\circ}\text{C}$ . In the case of direct labelling, cover the tubes on the shaker with aluminium foil to prevent the fluorochrome from bleaching.
  - l) On the next day, check whether the pellet has re-suspended completely.
  - m) After re-suspension, the hybridization probes can be used in further steps. When they are not used, they can be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for up to several months.

## 5. Denaturation of chromosome spreads and labelled DNA probe

- a) Preheat 70% formamide/2x SSC at least for 30 min at  $76^{\circ}\text{C}$  in a coplin jar.
- b) Denature the chromosome spreads in the coplin jar with 70% formamide/2x SSC for 3 min at  $76^{\circ}\text{C}$ .

Note: The time and temperature may vary considerably (10 s to 4 min/ $72$  to  $76^{\circ}\text{C}$ ) and must be adjusted specifically for each fish group.

- c) Dehydrate slides in 70% and 80% ice-cold ethanol (in coplin jars on ice), and in 96% ethanol, at RT, 3 min each, and let it air-dry until usage (not longer than several hours).
- d) Denature the DNA probe in a 1.5 ml Eppendorf tube in a water bath or a heating block at  $86^{\circ}\text{C}$  for 6 min and place immediately on ice for at least 10 min or until use.

Note: In the case of higher or too high proportion of repetitive sequences and no possibility to add competitor/Cot1-DNA, an optional step of pre-annealing can be included to the protocol by incubating the denatured DNA probe for 90 min at 37°C in order to suppress the repetitive sequences.

This optional step is based on the higher re-association kinetics of repetitive sequences that will preferentially re-associate within the probe DNA. The negative effect of repetitive sequences is thus suppressed by their mutual re-association. However, this step is not as effective as using the unlabelled competitor/Cot1-DNA, which should be preferred in most cases.

## 6. Setup of hybridization

Pipette the denatured DNA mixture (20 to 30 µl) onto the denatured chromosome preparation and carefully cover with a cover slip (24 x 50 mm). Place slides in a humid chamber (e.g., metal box with grid filled distilled water) and incubate for 48 hrs to 72 hrs at 37°C. To improve the hybridization reaction, this step can be prolonged for up to 5 days.

## 7. Washing and detection of indirectly labelled probes\*

- a) Place slides in 4x SSC/0.2% Tween 20, 5 min, RT, to help removing the cover slip.
- b) Wash slides in 50% formamide 2x SSC at 45°C, twice for 10 minutes, occasionally shaking them, in coplin jars.
- c) Wash slides, in 1x SSC at 43 to 45°C, 3 times, for 7 min, occasionally shaking them, in coplin jars.
- d) Apply a blocking treatment (500 to 800 µl 3% BSA/4x SSC/0.2% Tween 20) onto each slide and cover with a cover slip, incubate for at least 20 min at 37°C.
- e) Briefly wash in 4x SSC/0.2% Tween 20 at RT.
- f) In the meanwhile centrifuge the stock solution of antibodies for 3 min at 5,000 to 8,000 RPM before preparing the following mixture.
- g) First antibody layer: e.g., Anti- Digoxigenin-Fluorescein + 0.5% BSA/PBS (1:20, v/v)\*\*.
- h) Pipette 150 µl of the mixture per slide, cover with 24 x 60 mm cover slip and incubate for 45 to 60 min at 37°C.
- i) Wash in 4x SSC/0.2% Tween 20 at 42 to 45°C 3 times, for 7 min, occasionally shaking them.
- j) Apply blocking treatment (500 to 800 µl 3% BSA/4x SSC/0.2% Tween 20) on the slide, cover by cover slip, incubate at least for 20 min at 37°C.
- k) Briefly wash in 4x SSC/0.2% Tween 20.
- l) Second antibody layer: e.g., Cy<sup>TM</sup>-3-Streptavidin + 10% NGS/PBS (1:100, v/v).\*\*/\*\*\*

- m) Pipette 150 µl of the mixture per slide, cover with 24 x 60 mm cover slip and incubate for 45–60 min at 37°C.
- n) Wash in 4x SSC/0.2% Tween 20 at 42 to 45°C 3 times, for 7 min, occasionally shaking.
- o) Add a drop of DAPI containing an antifade (e.g., Vectashield) on each slide, close by a cover slip (24 x 50 mm) and seal with a colourful nail polish.

\*Note 1: In the case of directly labelled DNA probes (i.e., when fluorochrome is directly incorporated into the probe using, e.g., Cy3-dUTP or Fluorescein-dUTP) you can omit steps d to m.

\*\*Note 2: The exact concentration of the antibody should be determined by the user, manufacturer's recommendations usually indicate a higher concentration than necessary.

\*\*\*Note 3: In order to shorten the detection time it is possible to apply a combined solution of antibodies of both layers at once. We recommend such a simplification only if the conventional protocol works well.

Antibodies are sensitive to light therefore the steps involving fluorochromes should be performed in darkness.

## 8. Microscope analysis and data acquisition

For the last steps an epifluorescent microscope equipped with filters compatible with the fluorochromes used is required. An acquisition software enabling acquisition of each of the RGB channels separately in black and white regime and enabling their superimposition in pseudo-coloured composite images in RGB is also necessary. The final digital processing can be performed by using for, e.g., Adobe Photoshop software. Details on microscopy and imaging systems for ISH methods are provided by Iourov (2009), for details on fluorescent optical filters, see Sommerauer and Feuerbacher (2009).

## 9. Re-using chromosome preparations

After a CGH/GISH experiment it is possible to re-use slides, e.g., for a FISH experiment or for other kinds of chromosomes staining/banding:

- a) Pre-heat two coplin jars with 4x SSC/0.1% Tween at 37°C.
- b) Remove the nail polish from the cover slip and slide using a lancet.
- c) Incubate the slide with cover slip in the pre-heated coplin jar with 4x SSC/0.1% Tween for 30 min at 37°C; shake each 10 min or perform this step in a shaking water bath or a rocking platform in an incubator.
- d) Let the cover slip slide down the slide.

- e) Incubate the slide without the cover slip in the second pre-heated coplin jar with 4x SSC/Tween for 30 min at 37°C shaking or occasionally shaking it.
- f) Dehydrate slides in coplin jars in 70%, 80% and 96% EtOH, 3 min each at RT and let them air-dry.
- g) Incubate slides in coplin jar with fixative (methanol/acetic acid 3:1 v/v) for 30 min at RT and then let them air-dry.
- h) Perform aging of the slide as described. After dehydration in 70, 80 and 96% ethanol, slides are ready to be re-used or stored at -20°C.
- i) Prior to repeated denaturation, the RNase and pepsin treatment are not necessary anymore. However, to be sure that no previously hybridized DNA will remain on chromosomes, it is advisable to prolong denaturation time of the slide by 30 s - 1 min. Optionally, it is also possible to increase the temperature of denaturation slightly (this has to be tested).

### **Troubleshooting**

#### *Quality and spreading of chromosomes*

This is a crucial factor influencing considerably the overall hybridization as well as the evaluation of the resulting pattern. Generally, the better the chromosome spreading, the better hybridization and its evaluation.

#### *Aging*

Slides that were not aged properly can result in: 1. weak or uneven DAPI staining and/or 2. a puffy appearance of chromosomes after hybridization and/or 3. a weak hybridization signal.

#### *Nick translation*

The most important factor influencing the time required for the reaction and the length of the DNA fragment is the proportion of dUTP conjugated to haptens.

#### *Precipitation of pellet*

In the case that the pellet has not precipitated, it is necessary to check whether the appropriate amount of EDTA has been used to stop the NT reaction (as indicated by the manufacturer of the commercial NT kits). Optionally, it is possible to prolong the freezing (-20°C) of the mixture of gDNA, EtOH, NaAc and salmon sperm for up to several days (when necessary and/or to improve the precipitation of the pellet).

#### *Unspecific background signal*

The bond between antigen and unspecifically attached hapten can result in an unspecific background signal. This can be reduced or avoided by increasing the concentration of BSA in the BSA/4x SSC solution or prolonged incubation with this solution at 37°C. As an alternative, 0.4 M NaCl can be used. Washing

steps during detection are also crucial to get rid of unspecific background signals—the coplin jars have to be preheated to the desired temperature. If possible, use a shaking water bath or a rocking platform in an incubator set to the required temperature. Should this be impossible, at least occasionally gently shake the coplin jars with slides.

## Laboratory set up

### Equipment

#### *Major*

Agarose electrophoresis with documentation system; centrifuge; vortex; water bath; incubator/oven; mini-centrifuge; freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ); epifluorescence microscope equipped with CCD camera; shaking water bath or rocking platform in an incubator (optional).

#### *Minor*

1.5 ml microtubes; coplin jars; microscopic slides with cover slips; nail polish; micropipette (1–1000  $\mu\text{l}$ ) with tips; fine forceps; timers.

### Biochemicals and reagents

Ethanol 96%; formamide (Sigma-Aldrich); agarose in an electrophoresis buffer; dNTP-Mix (0.5 mM dATP, dCTP, dGTP+ 0.1 mM dTTP); 0.1 M mercaptoethanol (Merck); DNA polymerase I (Roche); DNase I (Roche; 100 mg diluted 1:250 in ddH<sub>2</sub>O); biotin-16-dUTP (Roche); digoxigenin-11-dUTP (Roche); hapten succinimidyl esters (biotin, digoxigenin, dinitrophenol); aminoallyl-dUTP (Invitrogen); 1 M Tris-HCl pH 7.75; 2 M glycine pH 8.0; 0.2 M sodium bicarbonate pH 8.3; BSA; PBS; SSC; Tween; 3 M sodium (sodium) Acetate; hybridization buffer; salmon sperm DNA; antifade (Vectashield); commercial kits: DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen); nick translation mix for *in situ* probes (Roche).

FITC-streptavidin (Invitrogen) 1:20 to 1:100 dilution with PBS containing 10% FBS or dilution for specific application should be determined by the investigator to obtain the best conditions.

Cy<sup>TM</sup>3-streptavidin (Invitrogen) 1:20 to 1:100 dilution with PBS containing 10% NGS.

Anti-digoxigenin-fluorescein, Fab fragments (Roche) 1:15 to 1:20 dilution with PBS containing 0.5% BSA.

Anti-digoxigenin-rhodamin, Fab fragments (Roche) 1:15 to 1:20 dilution with PBS containing 0.5% BSA.



### Stock and working solutions

*NT dNTP-Mix*

0.5 mM dATP

0.5 mM dCTP

0.5 mM dGTP

0.1 mM dTTP

*10x NT buffer*

1 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.5

100  $\mu$ l 1 M MgCl<sub>2</sub>

10  $\mu$ l 10% BSA

890  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

Store in 100  $\mu$ l aliquots at -20°C.

### Hybridization buffer (*sensu* Cremer et al. (2008))

5 ml formamide

2 ml 50% dextran sulfate

1 ml 20x SSC

400  $\mu$ l 1M sodium-phosphate buffer

100  $\mu$ l 10% SDS

200  $\mu$ l 50x Denhardt's solution

1.3 ml ddH<sub>2</sub>O (total volume 10 ml), store at -20°C.

### 50x Denhardt's solution (*or* Sigma-Aldrich)

2 g BSA

2 g Ficoll (type 400)

2 g polyvinylpyrrolidone

200 ml ddH<sub>2</sub>O

Filter to sterilize, divide into aliquots, and store at -20°C.

### Pepsinization solution (0.005% pepsin in 0.01 M HCl)

50  $\mu$ l 10% pepsin

10 ml 0.1 M HCl

90 ml ddH<sub>2</sub>O

Warm up to 37°C, store at -20°C.

### RNase solution

10  $\mu$ l RNase aliquot (25 mg/1.25 ml ddH<sub>2</sub>O)

1 ml 2x SSC.

### Acknowledgements

We thank Dr. Christian Lanctôt, PhD of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague for reviewing the draft of this protocol. This protocol has been tested and accomplished with contribution of projects no. P506/11/P596 and P523/08/0824 of the Czech Grant Agency. We also gratefully acknowledge the grant support provided by the Grant Agency of Charles University in Prague (GAUK) no. 158110.

### References

- Bi, K. and J.P. Bogart. 2006. Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Cytogenet. Genome Res.* 112(3-4): 307–312.
- Cremer, M., F. Grasser, Ch. Lanctôt, S. Müller, M. Neusser, R. Zinner, I. Solovei and T. Cremer. 2008. Multicolor 3D fluorescence *in situ* hybridization for imaging interphase chromosomes. pp. 205–239. *In: Hancock, R. (ed.). The Nucleus: Volume I: Nuclei and Subnuclear Components, Methods in Molecular Biology™. Volume 463. Humana Press.*
- Fujiwara, A., C. Nishida-Umehara, T. Sakamoto, N. Okamoto, I. Nakayama and S. Abe. 2001. Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation. *Genetica.* 111: 77–89.
- Graham, D.E. 1978. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms of large tissue masses. *Anal. Biochem.* 85: 609–613.
- Henegariu, O., N.A. Heerema, L.L. Wright, P. Bray-Ward, D.C. Ward and G.H. Vance. 2001. Improvements in cytogenetic slide preparations: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry* 43: 101–109.
- Iourov, I. 2009. Microscopy and imaging systems. pp. 75–84. *In: Liehr, T. (ed.). Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)—Application Guide. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.*
- Kallioniemi, A., O.P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J.W. Gray, F. Waldman and D. Pinkel. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258(5083): 818–821.
- Knytl, M., L. Kalous, R. Symonová, K. Rylková and P. Ráb. 2013. Chromosome studies of European cyprinid fishes: cross-species painting reveals natural allotetraploid origin of *Carassius* female with 206 chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 139(4): 276–283.
- Landegent, J.E., N. Jansen in de Wal, R.W. Dirks, F. Baao and M. van der Ploeg. 1987. Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* 77(4): 366–370.
- Lim, K.I., R. Matyášek, A. Kovařík and A. Leitch. 2007. Parental origin and genome evolution in the allopolyploid *Iris versicolor*. *Ann. Bot-London.* 100: 219–224.
- Matoba, H., A. Soejima and Y. Hoshi. 2007. Identification of parental genomes and genomic organization in *Aster microcephalus* var. *Ovatus*. *J. Plant Res.* 120: 585–593.
- Ráb, P. and P. Roth. 1988. Cold-blooded vertebrates. pp. 115–124. *In: Balicek, P., J. Forejt and J. Rubes (eds.). Methods of Chromosome Analysis. Cytogenet. Sect. Cs. Biol. Soc. Publishers, Brno.*
- Sealey, P.G., P.A. Whittaker and E.M. Southern. 1985. Removal of repeated sequences from hybridisation probes. *Nucleic Acids Res.* 13(6): 1905–22.
- She, Ch.-W., Y.-Ch. Song and X.-H. Jiang. 2012. Comparative genomic *in situ* hybridization analysis on the chromosomes of five grass species with rice genomic DNA probe. *Afr. J. Biotechnol.* 11(39): 9508–9515.
- Sommerauer, M. and I. Feuerbacher. 2009. Optical filters for FISH. pp. 85–98. *In: Liehr, T. (ed.). Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)—Application Guide. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.*
- Symonová, R., M. Flajšhans, A. Sember, M. Havelka, D. Gela, T. Kořínková, M. Rodina, M. Rábová and P. Ráb. 2013a. Molecular cytogenetics in artificial hybrid and highly polyploid

- sturgeons: an evolutionary story narrated by repetitive sequences. *Cytogenet. Genome Res.* 141(2-3): 153–162.
- Symonová, R., Z. Majtánová, A. Sember, G.B.O. Staaks, J. Bohlen, J. Freyhof, M. Rábová and P. Ráb. 2013b. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evol. Biol.* 13: 42.
- Takahashi, C., J.A. Marshall, M.D. Bennett and I.J. Leitch. 1999. Genomic relationships between maize and its wild relatives. *Genome* 42: 1201–1207.
- Traut, W. and H. Winking. 2001. Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: zebrafish, platyfish and guppy. *Chrom. Res.* 9(8): 659–672.
- Traut, W., K. Sahara, T.D. Otto and F. Marec. 1999. Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma*. 108: 173–180.
- Trifonov, V.A., N.N. Vorobieva and W. Rens. 2009. FISH with or without COT1 DNA. pp. 99–109. *In: Liehr, T. (ed.) Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)—Application Guide.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Valente, G.T., C.H. Schneider, M.C. Gross, E. Feldberg and C. Martins. 2009. Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic *in situ* hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. *Chrom. Res.* 17: 791–799.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger and R. Higuchi. 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506–513.
- Zhu, H.P. and J.F. Gui. 2007. Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture* 265(1-4): 109–117.

**Publikace 5 (Bohlen et al. in rev.)**

Bohlen J, Šlechtová V, Šlechta V, Šlechtová V, **Sember A**, Ráb P. A ploidy difference represents an impassable barrier for hybridisation in animals. Is there an exception among botiid loaches (Teleostei: Botiidae)? PLoS ONE, *in revision* (druhé kolo).

**Příspěvek autora:** příprava a vyhodnocení chromozómových preparátů, sestavení karyotypů

1 **A ploidy difference represents an impassable barrier for**  
2 **hybridisation in animals. Is there an exception among**  
3 **botiid loaches (Teleostei: Botiidae)?**

4

5 Jörg BOHLEN<sup>1</sup>, Vendula ŠLECHTOVÁ, Vlastimil ŠLECHTA, Vera ŠLECHTOVÁ,  
6 Alexandr SEMBER, Petr RÁB

7 Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR, v.v.i., Rumburská 89, 277 21  
8 Liběchov, Czech Republic

9 <sup>1</sup> Corresponding author; e-mail: bohlen@iapg.cas.cz, Phone +420 315 639559

10

11 **Abstract**

12 One of the most efficient mechanisms to keep animal lineages separate is a  
13 difference in ploidy level, since hybrid offspring from parents with different ploidy  
14 level are generally sterile. In the freshwater fish family Botiidae, ploidy difference has  
15 been held responsible for the separation of its two subfamilies, the tetraploid Botiinae  
16 and the diploid Leptobotiinae. Diploid and tetraploid species coexist in the upper  
17 Yangtze, the Pearl River and the Red River basins. Interestingly, the species '*Botia*'  
18 *zebra* from the Pearl River basin combines a number of morphological characters  
19 that otherwise are found in the diploid genus *Leptobotia* with morphological  
20 characters of the tetraploid genus *Sinibotia*, giving rise to the idea that it is the result  
21 of a hybridisation event between two species from different subfamilies with different  
22 ploidy level. A closer morphological examination indeed demonstrates a high  
23 similarity of '*B.*' *zebra* to two co-occurring potential parental species (*Leptobotia*

24 *guilinensis* and *Sinibotia pulchra*). It further reveals that it bears even the diagnostic  
25 characters of the genera *Leptobotia* (Leptobotiinae) and *Sinibotia* (Botiinae). In  
26 contrast, an allozyme comparison between '*Botia*' *zebra* and the two potential  
27 parental species showed only similarities with *S. pulchra*, not with *L. guilinensis*. All  
28 six specimens of '*B.*' *zebra* that were cytogenetically analysed turned out to be  
29 tetraploid and the composition of the karyotype did not reveal any hint of an  
30 incorporated genome from *Leptobotia*. Phylogenetic reconstructions basing on the  
31 mitochondrial cytochrome *b* gene and on the nuclear RAG-1 gene invariably placed  
32 '*Botia*' *zebra* as sister species to the potential parental *S. pulchra*, while the potential  
33 parental *L. guilinensis* was only distantly related. The presented combination of  
34 genetic data demonstrates that '*B.*' *zebra* is not the result of a hybridisation, but a  
35 striking case of morphological evolution towards an enormous similarity with a co-  
36 occurring, but not directly related species.

37

38

### 39 **Introduction**

40

41 One of the most efficient barriers for horizontal gene flow between organisms is a  
42 difference in ploidy level (Comai 2005, Otto & Whitton 2000). While it might not  
43 prevent an original hybridisation event and in many cases not the viability of the F1-  
44 offspring, it generally terminates the reproduction line of such hybrids by sterility of  
45 the offspring (Arnold 1997, Benfey 1999, Piferrer et al. 2009). In some exceptional  
46 cases, the resulting hybrids can make it through with clonal or asexual reproduction  
47 (Comai 2005), but due to the absence of gene flow and recombination, offspring of  
48 such lineages resemble F1 hybrid specimens and such lineages often are not long  
49 lasting. This general rule has been observed in plants as well as in animals, and



50 exceptional cases are very rare, especially among animals. Therefore, any  
51 evolutionary successful case of a hybridisation between parental species that differ  
52 in ploidy level would provide an interesting model to study the limits of polyploidy as  
53 barrier for horizontal gene flow.

54

55 Freshwater fishes of the family *Botiidae* (Cobitoidea: Cypriniformes) are widespread  
56 across East, Southeast and South Asia (Bănărescu 1992, Nalbant 2002). Many  
57 species are valued as ornamental fishes worldwide and as tasty food fishes in the  
58 area of occurrence. The monophyly of the family has been demonstrated by  
59 morphological as well as genetical data (Nalbant 2002, Saitoh et al. 2006, Sawada  
60 1982, Šlechtová et al. 2007, Tang et al. 2005); and phylogenetic reconstructions of  
61 the family revealed two major, long-time separated lineages, which are referred to as  
62 subfamilies *Leptobotiinae* and *Botiinae* (Šlechtová et al. 2006, Tang et al. 2005). The  
63 most remarkable difference between the two subfamilies comes from cytogenetics:  
64 all *Leptobotiinae* are diploid with a chromosome number of  $2n=50$ , while all *Botiinae*  
65 are tetraploid with  $4n=98-100$  (Suzuki & Taki 1996, Šlechtová et al. 2006). Šlechtová  
66 et al. (2006) hypothesised that the difference in ploidy level has played an important  
67 role in the separation of the two lineages, since it represents an efficient barrier for  
68 hybridisation between the lineages. Both subfamilies have a similar number of  
69 species, which Zhan et al. (2014) used to claim that there is no obvious difference in  
70 the evolutionary success of diploid or tetraploid animals. Moreover, their distribution  
71 areas are of roughly comparable size, with *Leptobotiinae* occurring in the northern  
72 half of the total distribution area (north of the Mekong basin - China, Japan, eastern  
73 Russia, northern Vietnam), while most *Botiinae* live in the southern half of the total  
74 distribution area (Mekong and areas south and west of Mekong - from Pakistan to  
75 Laos, Malay Peninsula, Indonesia) (Nalbant 2002). However, *Leptobotiinae* and

76 Botiinae co-occur in the upper Yangtze, the Pearl and the Red River basins, where  
77 the genus *Sinibotia* (belonging to Botiinae) is distributed with five described species  
78 in the area that otherwise is inhabited by Leptobotiinae (a sixth species of *Sinibotia*  
79 in the upper Mekong lives outside the range of Leptobotiinae) (Nalbant 2002, Yang &  
80 Chen 1992).

81

82 At least nine species of the genera *Leptobotia*, *Parabotia* and *Sinibotia* occur in the  
83 River Li, a northern tributary of the River Xi, Pearl River basin, in southern China.  
84 (Chen 1980, Wu 1939, per. observ.), with two of them being endemic to this river:  
85 *Leptobotia guilinensis* Chen, 1980 and '*Botia*' *zebra* Wu, 1939. Since the latter is  
86 bearing the diagnostic character of the genus *Leptobotia*, a simple suborbital spine  
87 (versus bifid in all other genera of Botiidae), and generally shows a close similarity to  
88 the sympatric *Leptobotia guilinensis*, '*Botia*' *zebra* was placed into *Leptobotia* by  
89 Chen (1980). However, in a phylogenetic analysis basing on the mitochondrial  
90 cytochrome *b* gene, '*B.*' *zebra* was found to be more closely related to the genus  
91 *Sinibotia*, especially to a species that occurs in the River Li, *S. pulchra* (Tang et al.  
92 2008). One of the possible explanations for a strong discrepancy between  
93 morphological characters and mitochondrial characters is mitochondrial  
94 introgression, a process where an initial hybridisation is followed by repeated back-  
95 crossing events with the paternal species; leading to a morphology that is closer to  
96 the paternal species, but a mitochondrial genome that is close to the maternal  
97 species. Since in '*Botia*' *zebra* the morphology is similar to *Leptobotia guilinensis*, but  
98 the mitochondrial genome close to *Sinibotia pulchra* and all three species co-occur in  
99 the upper River Li, the possibility arose that the evolutionary history of '*Botia*' *zebra*  
100 included a hybridisation event between the diploid species *L. guilinensis* and the  
101 tetraploid species *S. pulchra*. Such a hybridisation event between these species

102 would refute the general assumption that differences in ploidy level represent an  
103 efficient barrier against hybridisation and would be of general interest for zoologists.

104

105 In the present study, we compare *L. guilinensis*, *S. pulchra* and '*Botia*' *zebra* using  
106 morphologic, cytogenetic, allozyme variability as well as mitochondrial and nuclear  
107 DNA sequence characters in order to test if the later reveals any trace of a past  
108 hybridisation between the first two species. The DNA comparisons include  
109 comparative material from in total 27 species of Botiidae representing all known  
110 genera.

111

112

113

#### 114 **Material & methods**

115

##### 116 **Specimens.**

117 Live specimens of *L. guilinensis* (eight specimens), *S. pulchra* (two specimens) and  
118 *S. zebra* (six specimens) were obtained together in one mixed group from an import  
119 for the ornamental fish trade. Ethanol or formalin fixed specimens were obtained  
120 from local markets in Guilin, Mengshan, Fuzhou and Nanning in the provinces  
121 Guangxi and Fuxien in southern China. A total number of 108 specimens of the three  
122 species from 9 localities across the whole distribution area of the species has been  
123 analysed (Table 1). Additional 33 specimens of other species as comparative  
124 material were obtained from the ornamental fish trade. Vouchers are deposited in the  
125 collection of the Laboratory of Fish Genetics, IAPG AS CR, Liběchov. All  
126 experimental procedures involving fishes during this study were approved by the  
127 Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute of Animal Physiology

128 and Genetics of the Academy of Sciences of the Czech Republic, according with  
129 directives from the State Veterinary Administration of the Czech Republic, permit  
130 number 217/2010, and by permit number CZ 02386 from the Ministry of Agriculture  
131 of the Czech Republic.

132

### 133 **Morphology.**

134 Morphologic measurements were taken from 26 specimens with digital callipers  
135 point-to-point according to Kottelat (1990). Pigmentation was estimated from nearly  
136 all specimens either directly in the case of fixed specimens or from photos taken of  
137 live specimens. Preparations of suborbital spines of nine specimens were carried out  
138 under a Olympus SZX7 stereomicroscope equipped with a u-Eye camera.

139

### 140 **Cytogenetics.**

141 Mitotic chromosomes were obtained from regenerated fin tissue as described by  
142 Völker et al. (2006) and Völker & Ráb (2015) with slight modifications. Briefly, the  
143 posterior margin of the caudal fin was cut off and three weeks later, the regenerated  
144 tissue of the fin was collected to be incubated in Ringer solution with 0,025%  
145 colchicine for about two hours at room temperature. Cells were fixed in a mixture of  
146 methanol and acetic acid (3:1) at 4°C for 25 min. This step was repeated three times.  
147 The fixed tissue was minced in 50% acetic acid and drops of the resulting  
148 suspension were placed on pre-heated slides (50°C) and sucked back after 20 sec.  
149 The slide was dried at room temperature and stained for 10 min in 5% Giemsa  
150 solution (pH 6.8) (Merck, Darmstadt, Germany) before examination of metaphase  
151 plates with an Olympus AX70 light microscope. From 17 live specimens that were  
152 available for the analyses, results with satisfying quality were obtained from nine  
153 specimens (five *L. guilinensis*, two *S. pulchra*, two '*B.*' *zebra*). The number of

154 chromosomes of at least 20 metaphase plates per individual was counted.  
155 Chromosome morphology was determined according to Levan et al. (1964), but  
156 classified as m – metacentric, sm – submetacentric, st – subtelocentric, a –  
157 acrocentric.

158

#### 159 **Allozyme diversity.**

160 Fin tissue was homogenised with an equal amount of buffer (0.1 mol/l Tris-HCl pH  
161 8.5) and centrifuged for clarifying. All manipulations with tissue were carried out on  
162 ice. Electrophoresis on starch gel was carried out in a refrigerator. Six allozyme loci  
163 (glucosephosphate isomerase Gpi-A, aspartate amino transferase s-Aat, malate  
164 dehydrogenase s-Mdh A, lactate dehydrogenase Ldh A and Ldh B,  
165 phosphoglucomutase Pgm) were stained after Šlechtová et al. (1998). For details of  
166 the method see Šlechtová et al. (2000). Loci Gpi-A and Pgm were analysed in three  
167 and two buffer systems, respectively (F after Ferguson & Wallace 1968, MC2 after  
168 Clayton & Tretiak 1972, V after Valenta et al 1971).

169

#### 170 **DNA data analyses.**

171 Genomic DNA was isolated from fin tissue samples using the DNeasy Tissue kit  
172 (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. The  
173 mitochondrial cytochrome *b* (*cyt b*) was amplified and sequenced using the primers  
174 Glu-L.Ca14337-14359: 5'- GAA GAA CCA CCG TTG TTA TTC AA – 3' and Thr-  
175 H.Ca15568-15548: 5'- ACC TCC RAT CTY CGG ATT ACA – 3' (Šlechtová et al.,  
176 2006). An approximately 970 bp long portion of RAG-1 was amplified using the  
177 primers RAG-1F (5'-AGCTGTAGTCAGTAYCACAARATG-3'; Perdices et al., 2005)  
178 and RAG-RV1 (TCCTGRAAGATYTTGTAGAA-3', Šlechtová et al. 2007) or RAG-8R  
179 (5'-CGC CAC ACA GGY TTC ATC T-3', Perdices et al., 2005). Same primers were

180 used also for sequencing reactions. PCR amplifications were performed in 25  $\mu$   
181 reaction volumes of 10 mM Tris-HCl, 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1% of Triton X-100, 1.5  
182 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM TMA oxalate (PCR enhancer), containing 5 nmol of each  
183 nucleotide, 1.25 U of *Taq* polymerase (all chemicals Top-Bio, Prague, Czech  
184 Republic) and 12.5 pmol of each primer.

185

186 The PCR reaction profile (MJ Research thermocycler) included 5 min of initial  
187 denaturation at 95°C, touch-down profile of 1 min at 94°C, 1 min 30 s at 60-55°C  
188 (1°C/cycle) and 2 min at 72°C, followed by 30 cycles with annealing temperature  
189 held at 54°C. The reaction was completed by final extension at 72°C for 7 min.

190

191 PCR products were purified by QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Forward and  
192 reverse sequencing reactions were performed with BigDye™ Terminator Cycle  
193 Sequencing Kit v.1.1 (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) according to  
194 manufacturer's instructions and products purified with DyeEx Spin Kit (Qiagen).  
195 Sequencing was performed on ABI Prism 3130 (Applied Biosystems).

196

197 Chromatograms were assembled using SeqMan Pro 10.1.2 of the LaseGene  
198 software package (DNASTAR). The sequences were aligned and manually revised  
199 in BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) and  
200 evaluated based on their amino acid translation.

201

202 The newly obtained data were deposited in GenBank under the accession numbers  
203 KU517025-KU517132.

204



205 We have analysed molecular data from altogether 102 individuals of Botiidae  
206 representing 28 species currently considered as valid. Based on the former studies  
207 on Cobitoidea (Šlechtová et al., 2007, Bohlen et al., 2009), we have selected  
208 *Gyrinocheilus aymonieri* as outgroup.

209

210 The molecular datasets were analysed using the Bayesian inference in MrBayes  
211 3.2.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). The two genes were analysed separately  
212 with the aim to see potential discrepancies between mitochondrial and nuclear  
213 markers. The datasets were partitioned into codon positions. Prior to the analyses,  
214 the MEGA 5.10 software (Tamura et al. 2011) was used to estimate the most suited  
215 model for each gene partition under the Bayesian information criterion (BIC). The  
216 Bayesian analyses were performed in two independent runs of 5 million generations,  
217 each using six Markov Chains, starting with random trees and sampling frequency  
218 set to 100 generations. The parameter settings corresponded to the best-fit models.  
219 The log-likelihood score distribution was examined in order to assess if stationarity  
220 was reached. The first 5000 saved trees were discarded as the burn-in and a 50%  
221 majority rule consensus of the remaining trees was computed. Statistical support of  
222 clades was assessed by posterior probabilities.

223

224

225

## 226 **Results**

227

### 228 **Morphology**

229 Morphometry. - In 13 out of 33 morphometric and meristic characters there was no  
230 overlap of measurements between *L. guilinensis* and *S. pulchra* (Category A, Table

231 2), while in further 12 characters, the overlap was small (Category B). In the  
232 remaining eight characters the overlap was large (Category C); therefore these  
233 characters were unsuited to evaluate a morphological similarity between 'B.' *zebra*  
234 and the two potential parental species. However, in one of these 'uninformative'  
235 characters in Category C (Number of branched dorsal-fin rays), seven out of eight  
236 specimens of 'B.' *zebra* showed a character state that was observed in neither *L.*  
237 *guilinensis* nor *S. pulchra*, indicating an autapomorphy of 'B.' *zebra*. When  
238 comparing 'B.' *zebra* with *L. guilinensis* and *S. pulchra*, it shared the range of  
239 measurements with *S. pulchra* in two characters of Category A and in two characters  
240 of Category B, with *L. guilinensis* in six characters of Category A and in eight  
241 characters of Category B, while its range was intermediate between the two species  
242 in five characters of Category A and in two characters of Category B.

243

244 Pigmentation pattern. - The pigmentation pattern of *S. pulchra* is much like that of all  
245 other members of the genus *Sinibotia*: Broad dark brown bars run from one body  
246 side across the back to the other side, reaching nearly always below lateral midline  
247 and regularly to level of pelvic fin origin (Fig. 1). In small and medium sized  
248 individuals 6-10 bars are present, much broader than interspaces, but in larger  
249 individuals each bar might split into two. On the dorsal side of the head run two dark  
250 stripes from the snout to the neck and one on each side of the head from the snout  
251 through the eye. Between the dark stripes are two prominent light stripes, a long one  
252 from the snout to the end of the operculum and a short along the dorsal midline of  
253 the head. In *Leptobotia guilinensis*, body and head are homogenously light to dark  
254 brown with a lighter belly. Prominent light blotches are present along the dorsal  
255 midline, but often only visible behind the base of the dorsal fin. Dark saddles are  
256 sometimes visible between the light blotches, but usually too faint to figure out the

257 precise number and outline. A thin black stripe runs from the snout to the eye, but no  
258 light stripes are present. In '*B.*' *zebra* the body sides are uniformly brown like in *L.*  
259 *guilinensis*, but usually in lighter brown. On the back, faint saddles are sometimes  
260 visible, often hard to see, never reaching to lateral midline. In some specimens the  
261 saddles are present only in the anterior part of the body, but if present along whole  
262 back their number is higher than ten. Between the saddles are light blotches, very  
263 similar to the light blotches in *L. guilinensis*, often merging into a line in the  
264 anteriormost part of the dorsum. On the head are dark stripes from the snout to the  
265 neck and from the snout through the eye two and prominent light stripes between  
266 them as described for *S. pulchra*. In general, '*B.*' *zebra* combines the head  
267 pigmentation of *S. pulchra* with the body pigmentation of *L. guilinensis*.

268

269 Suborbital spine. – The suborbital spine is an erectable spine formed by the lateral  
270 ethmoid bone and located in a skin pocket below each eye. It is present in all  
271 members of the family Botiidae as well as in the distantly related families Cobitidae  
272 and Serpenticobitidae and its shape is of taxonomical value. In all species of  
273 *Leptobotia*, including *L. guilinensis*, this spine is simple, meaning it has a single  
274 branch and tip (Nalbant 2002). In all other Botiidae, including *S. pulchra*, the spine is  
275 double, meaning it has a main and a side branch and two tips (Nalbant 2002). In '*B.*'  
276 *zebra*, the spine turned out also to be simple, like in *Leptobotia* (Fig. 2).

277

278 Mental lobes. – In many species of Botiidae the lower lip develops two median  
279 extensions, called mental lobes, and presence and shape of these extensions are an  
280 important taxonomic character (Nalbant 2002). In all species of *Sinibotia* the  
281 extensions are present, large and of oval or kidney-like shape (Yang & Chen 1992,  
282 Nalbant 2002). This shape of the mental lobes is considered a diagnostic character

283 for the genus *Sinibotia* (Nalbant 2002). In all analysed specimens of *S. pulchra* the  
284 mental lobes were present, large and had the shape characteristic for *Sinibotia*,  
285 while in all analysed specimens of *L. guilinensis* no mental lobes were present. In all  
286 analysed specimens of '*B.*' *zebra* mental lobes were present, large and had the  
287 shape characteristic for *Sinibotia* (Fig. 3).

288

289 The literature names additional characters to distinguish between *Leptobotia* and  
290 *Sinibotia*, namely the presence of scales on the cheeks and of a pario-frontal  
291 fontanelle in *Leptobotia* (vs. both characters absent in *Sinibotia*) (Fang 1936, Taki  
292 1972, Nalbant 2002). Since both turned out to be absent in five dissected specimens  
293 of *L. guilinensis*, these characters are not truly diagnostic and were unsuited for the  
294 comparison in the given case.

295

#### 296 **Cytogenetics.**

297 Metaphases of suited quality for further analyses were obtained from five specimens  
298 of *L. guilinensis*, two '*B.*' *zebra* and two *S. pulchra*. The chromosome number of all  
299 analysed *L. guilinensis* was  $2n = 50$ , proving the diploid status of these specimens,  
300 while all specimens of '*B.*' *zebra* and *S. pulchra* were tetraploid with a chromosome  
301 number of  $4n = 100$  (Table 3, Fig. 4). Karyotypes of all analysed species were  
302 composed of comparatively small chromosomes, slightly decreasing in size.  
303 Especially in the tetraploid species chromosomes were generally very small, with  
304 their centromere positions gradually ranging from median to nearly terminal making  
305 the borderlines between formal chromosomal categories questionable in a small  
306 subset of chromosomal pairs.

307

#### 308 **Allozyme diversity.**

309 In three (s-Aat, Ldh A, Ldh B) of the six analysed loci alleles were shared between  
310 the three analysed taxa and therefore were not informative for the given study. In all  
311 informative loci (Gpi-A, s-Mdh A, Pgm), *S. pulchra* shared alleles with '*B.*' *zebra*, but  
312 both did not share alleles with *L. guilinensis* (Table 4, Fig. 5). Therefore the allozyme  
313 data suggest a high similarity between *S. pulchra* and '*B.*' *zebra*, while *L. guilinensis*  
314 appears to be more distantly related.

315

### 316 **DNA sequences.**

317 Table 5 summarises the species and individuals analysed in this study including the  
318 novel sequences generated as well as those that were obtained from GenBank.

319 Altogether we have analysed 102 specimens of Botiidae including 49 and 59 novel  
320 sequences of *cyt b* (1121 bp) and RAG1 (971 bp), respectively. Into the cytochrome  
321 *b* dataset, 14 sequences of *L. guilinensis*, 20 sequences of *S. pulchra* and 12  
322 sequences of '*B.*' *zebra* were included; in the RAG dataset it were 14, 10 and six  
323 sequences, respectively.

324

325 The models selected for each partition (codon position) based on BIC score were  
326 following: TN93+G+I, HKY+G and GTR+G for the 1st, 2nd and 3rd codon positions  
327 of *cyt b*, respectively, and HKY+G, JC+I and JC for the 1st, 2nd and 3rd codon  
328 positions of RAG 1, respectively. Those were taken into account for the subsequent  
329 Bayesian analyses.

330

331 Phylogenetic reconstructions of both analysed genes provide generally congruent  
332 genealogies: the major split within Botiidae separated the diploid subfamily  
333 Leptobotiinae from the tetraploid subfamily Botiinae (Fig. 6, Fig. 7). Both datasets  
334 identified all described genera as monophyletic lineages with high statistic support



335 except *Leptobotia* in the RAG dataset. These observations are well in agreement  
336 with the observations of Šlechtová et al. (2006) and Tang et al. (2005). In general,  
337 the slower evolving RAG gene brought a better resolution at the older genealogic  
338 events, while the faster evolving cytochrome *b* gene had a better resolution around  
339 the tips of the trees, which is a well-know characteristics of these two genes. No  
340 discrepancies that would indicate a potential hybridisation event were detected.

341

342 All specimens of '*B.*'*zebra*, *L. guilinensis* and *S. pulchra* form own monophyletic  
343 groups, confirming that the three species are unambiguously identifiable by these  
344 markers. The lineages of '*B.*'*zebra* and *S. pulchra* show a sister relationship and  
345 together are embedded into the comparative material of *Sinibotia*, while the lineage  
346 of *L. guilinensis* is closely related to all comparative samples of *Leptobotia*, but only  
347 distantly related to the lineages formed by *B.*'*zebra* and *S. pulchra*.

348

349

350

## 351 **Discussion**

352 Our results demonstrate that '*B.*'*zebra* shows a high morphological similarity to *L.*  
353 *guilinensis*, but also shares characters with *S. pulchra* and in some characters  
354 presents an intermediate morphotype. At the same time, it reveals nearly no  
355 characters, pigmentation details or measurements that are not found in either of the  
356 two species. The prevalence of synapomorphies with either one of the two other  
357 species or an intermediate character state strongly supports the hypothesis of a  
358 hybrid origin of '*B.*'*zebra*. Most important in this respect are the diagnostic characters  
359 of the potential parental species: the diagnostic character for the genus *Leptobotia* is  
360 the simple suborbital spine. In '*B.*' *zebra*, the spine also is simple; therefore it bears

361 the diagnostic character of the genus *Leptobotia*. Consequently, 'B.' zebra was  
362 placed into *Leptobotia* by Chen (1980), Nalbant (2002), Kottelat (2004) and Li et al.  
363 (2008). The diagnostic character of the genus *Sinibotia* is the presence of a pair of  
364 mental lobes in a button-like; and 'B.' zebra bears these buttons, meaning it also  
365 carries the diagnostic character of the genus *Sinibotia*. This result offers two  
366 potential explanations: either 'B.' zebra is of hybrid origin or the described characters  
367 are not diagnostic. As mentioned above, the pigmentation pattern of 'B.' zebra  
368 includes the head pigmentation of *Sinibotia* and the body pigmentation of *L.*  
369 *guilinensis*, further strengthening the assumption of a hybrid origin. Therefore all  
370 morphological data suggest that 'B.' zebra is a mixture of these two species; that  
371 means the product of a hybridisation. As stated above, the different ploidy level of  
372 the diploid *L. guilinensis* and the tetraploid *S. pulchra* should represent an efficient  
373 barrier against any horizontal gene flow between these two lineages.

374

375 However, a first hybridisation step would be possible, but potentially formed F1  
376 hybrids would be excluded from further reproduction. In order to test the F1 hybrid  
377 status of 'B.' zebra, their ploidy level was investigated. All six analysed individuals of  
378 'B.' zebra were tetraploid with a chromosome number of  $4n=100$ . Consequently,  
379 these individuals were no F1 hybrids, inducing strong doubts against the postulate of  
380 the efficiency of ploidy level differences as barrier against gene flow. Moreover, the  
381 composition of the karyotype of 'B.' zebra turned out to be very similar to that of *S.*  
382 *pulchra*, but did not reveal any trace of introduction of one or two chromosome sets  
383 of *L. guilinensis* into its karyotype. Due to the high number of uni-armed  
384 chromosomes in *L. guilinensis* the number of uni-armed chromosomes in 'B.' zebra  
385 would have elevated considerably in comparison to *S. pulchra*. Nevertheless, the  
386 number of uniarmed chromosomes is slightly increased in 'B.' zebra when compared

387 to *S. pulchra*. Theoretically, this could be the result of a number of back-crossings of  
388 the original hybrid with *S. pulchra* that brought the karyotype composition of 'B.'  
389 *zebra* closer to that of *S. pulchra*, while some chromosomes of *L. guilinensis* are still  
390 present, but not distinguishable from *Sinibotia* chromosomes with the given Giemsa  
391 staining technique. In such case, comparisons of proteins and molecular genetic  
392 markers could still reveal a genetic introgression by *L. guilinensis*.

393

394 However, the allozyme comparison did not reveal any sign of *L. guilinensis* genome,  
395 but all analysed specimens of 'B.' *zebra* were in all of the informative proteins  
396 undistinguishable from *S. pulchra*. These results provide evidence that no genetic  
397 introgression by *L. guilinensis* has occurred.

398

399 Finally, both phylogenetic reconstructions, one on base of a mitochondrial gene and  
400 the other on base of a nuclear gene, suggested with high statistical support that 'B.'  
401 *zebra* is the sister lineage to *S. pulchra*, while all specimens of *Leptobotia* were only  
402 distantly related.

403

404 At the end, we report a strong discrepancy between morphological and genetical  
405 data with the former suggesting gene flow between the diploid *Leptobotia* and the  
406 tetraploid *Sinibotia* in the upper River Li basin, while the later did not reveal any sign  
407 of genetic introgression of *Leptobotia* into the evolutionary history of 'B.' *zebra*. Since  
408 the amount of information taken from the genetical analyses was high and the  
409 different methods that have been applied in the present study have analysed a wide  
410 range of genetic data (chromosomes, allozymes, mitochondrial and nuclear DNA  
411 sequences), it is very unlikely that a hybridisation event would have stayed  
412 undetected.

413

414 We finally conclude that 'B.' *zebra* is not the result of a hybridisation event, but a  
415 species of *Sinibotia* that underwent an outstanding example of evolution that has  
416 changed its morphology in the way that it strikingly matches the morphology of the  
417 co-occurring species *L. guilinensis*. This seems at least surprising, since evolutionary  
418 theory pronounces that a strong selection exists against the co-occurrence of highly  
419 similar species (competitive exclusion, Gaus's law (Gause 1934; Hardin 1960)) and  
420 that only niche-separation (and consequently morphological differentiation) leads to  
421 stable co-existence (Leibold 1995). Therefore the similarity between *S. zebra* and *L.*  
422 *guilinensis* bears the risk of being a disadvantage due to an increased competition.  
423 We therefore have to assume that there exists an evolutionary advantage for *S.*  
424 *zebra* in looking so similar to *L. guilinensis*. The most common mechanism to  
425 achieve such an advantage is mimicry. Species may mimic another species with a  
426 special predator protection to obtain additional protection themselves, e.g. various  
427 arthropods that mimic wasps (Edmunds 1974, Wickler 1968). In Botiidae, the  
428 antipredator weapon is the suborbital spine, which is erected when the fish is  
429 attacked and may cause pain to the aggressor. However, in specimens of similar  
430 size, the spine is much larger in *Sinibotia* than in *Leptobotia* (Fig. 2), therefore one  
431 would assume *Sinibotia* to represent the better protected morphotype; therefore it  
432 would be of disadvantage for 'B.' *zebra* to leave the *Sinibotia* morphotype and mimic  
433 the less protected *L. guilinensis*. Other examples of non-related, but similar fishes  
434 come from cases where both species have a predator protection and sharing the  
435 same signal results in a faster learning process for the predators; in e.g. *Corydoras*  
436 species that share the same pigmentation pattern (Axenrot & Kullander 2003) or in  
437 cases of interspecies communication like in assemblages of *Novumbra* and  
438 *Gasterosteus*, where territorial males of both species share a black mutual threat

439 colour (Hagen et al. 1972). We do not know about their ecology and microhabitat of  
440 *S. zebra* and *L. guilinensis*, but their frequent occurrence in the same lot on local  
441 markets and ornamental fish imports indicate that they live very close to each other,  
442 making their case of 'mimicry' an interesting topic for further research.

443

444 Another result of the present study is the first record of *S. zebra* from outside the  
445 upper River Li basin and even outside the Pearl River basin. Specimen A8614 was  
446 found among specimens of *S. pulchra* from the Min River in Fujian province (Fig. 8).  
447 Interestingly, no species of *Leptobotia* has been recorded from this basin up to now;  
448 therefore no partner for any co-evolution as discussed above would be available.  
449 However, our phylogenetic reconstructions based on the mitochondrial and nuclear  
450 genes show that specimen A8614 from the Min basin is very closely related to their  
451 conspecifics from the Li basin. The same is true for *S. pulchra*; the specimens from  
452 the Min basin bear very similar haplotypes as specimens from the Li River. We  
453 consequently assume their presence in the Min basin to be the result of a very  
454 recent range extension. Range extensions along the southeaster Chinese coast  
455 were possible during the Pleistocene glacial maxima, when the lowered global sea  
456 level led to prolongation and joining of coastal rivers. However, no botiid species is  
457 known to occur on Taiwan, which also was connected to the Chinese coast during  
458 the glacial maxima in Pleistocene and therefore shares several freshwater species  
459 with the coastal rivers of China (Huang & Lim 2011; Yang et al. 2012). It is possible  
460 that the presence of botiid fishes in the Min River basin is even younger than the last  
461 glacial maximum and might be the result of human activity.

462

463

464

465 **Acknowledgements**

466 We are deeply thankful for the help of Li Fan and Zhou Hang for their help with  
467 sample collection. Further help with sample collection came from H. Hengwei, H.F.  
468 Hong, H. Mian, E. Ming and K. Udomritthiruj. Valuable help with the laboratory work  
469 came from T. Dvořák, J. Kopecká and Š. Pelikanová. The study was supported by  
470 grant 13-37277 S of the Czech Science Foundation (GAČR).

471

472

473

474 **References**

475 Arnold ML. Natural hybridization and evolution. New York: Oxford University Press;  
476 1997.

477 Axenrot TE, Kullander SO. *Corydoras diphyses* (Siluriformes: Callichthyidae) and  
478 *Otocinclus mimulus* (Siluriformes: Loricariidae), two new species of catfishes  
479 from Paraguay, a case of mimetic association. *Ichthyol Explor Freshw.*  
480 2003;14: 249-272.

481 Bănărescu P. Zoogeography of fresh waters. Volume 2. Distribution and dispersal of  
482 freshwater animals in North America and Eurasia. Wiesbaden: Aula-Verlag;  
483 1992.

484 Benfey TJ. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Rev Fish Sci* 1999;7: 39-  
485 67.

486 Bohlen J, Šlechtová V. Phylogenetic position of the fish genus *Ellopostoma*  
487 (Teleostei: Cypriniformes) using molecular genetic data. *Ichthyol Explor*  
488 *Freshw.* 2009;20: 157-162.

489 Chen JX. A study on the classification of the botiid fishes of China. *Zool Res.* 1980;1:  
490 3-26.



491 Clayton JW, Tretiak DN. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel  
492 electrophoresis. J Fish Res Board Can. 1972;29: 1169-1172.

493 Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploidy. Nat Rev Genet.  
494 2005;6: 836-846.

495 Edmunds M. Defence in animals: a survey of anti-predator defences. Essex:  
496 Longman; 1974.

497 Fang PW. Study on the botoid fishes of China. Sinensia. 1936;7: 1-49.

498 Ferguson KA, Wallace ALC. Starch-gel Electrophoresis of Anterior Pituitary  
499 Hormones. Nature. 1968;190: 629-630.

500 Gause GF. The struggle for existence. Baltimore: Williams & Wilkins; 1934.

501 Hagen DW, Moodie GEE, Moodie PF. Territoriality and courtship in the Olympic  
502 mudminnow (*Novumbra hubbsi*). Can J Zool. 1972;50: 1111-1115.

503 Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and  
504 analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 1999;41: 95-  
505 98.

506 Hardin G. The Competitive Exclusion Principle. Science. 1960;131: 1292-1297.

507 Huang JP, Lin CP. Lineage-specific late pleistocene expansion of an endemic  
508 subtropical gossamer-wing damselfly, *Euphaea formosa*, in Taiwan. BMC Evol  
509 Biol. 2011;11: 94.

510 Kottelat M. Indochinese nemacheilines. A revision of nemacheiline loaches (Pisces:  
511 Cypriniformes) of Thailand, Burma, Laos, Cambodia and southern Viet Nam.  
512 München: Pfeil; 1990.

513 Kottelat M. *Botia kubotai*, a new species of loach (Teleostei: Cobitidae) from the  
514 ataran River basin (Myanmar), with comments on botiinae nomenclature and  
515 diagnosis of a new genus. Zootaxa. 2004;401: 1-18.

- 542 Šlechtová V, Šlechta V, Lusková V, Lusk S, Berrebi P. Genetic variability of common  
543 barbel, *Barbus barbus* populations in the Czech Republic. Folia Zool. 1998;47  
544 (Suppl. 1): 21-33.
- 545 Šlechtová V, Lusková V, Šlechta V, Lusk S, Halačka K, Bohlen J. Genetic  
546 differentiation of two diploid-polyploid complexes of spined loach, genus *Cobitis*  
547 (Cobitidae), in Czech Republic, involving *C. taenia*, *C. elongatoides* and *C. spp.*  
548 Allozyme interpopulation and interspecific differences. Folia Zool. 2000;49  
549 (Suppl. 1): 67-78.
- 550 Šlechtová V, Bohlen J, Freyhof J, Ráb P. Molecular phylogeny of the Southeast  
551 Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of  
552 polyploidy in their evolution. Mol Phylogenet Evol. 2006;39: 529-541.
- 553 Šlechtová V, Bohlen J, Tan HH. Families of Cobitoidea (Teleostei; Cypriniformes) as  
554 revealed from nuclear genetic data and the position of the mysterious genera  
555 *Barbucca*, *Psilorhynchus*, *Serpenticobitis* and *Vaillantella*. Mol Phylogenet Evol.  
556 2007;44: 1358-1365.
- 557 Suzuki A, Taki Y. Tetraploidization in the cobitid subfamily Botinae (Pisces,  
558 Cypriniformes). Cytobios. 1996;85: 229-245.
- 559 Taki Y. *Botia eos*, a new spiny loach from Thailand and Laos, with notes on some  
560 related forms in Asia. Japanese Journal of Ichthyology. 1972;19: 63-81.
- 561 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular  
562 Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary  
563 Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol Evol. 2011;28: 2731-  
564 2739.
- 565 Tang QY, Xiong B, Yang X, Liu H. Phylogeny of the East Asian botiine loaches  
566 (Cypriniformes, Botiidae) inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene  
567 sequences. Hydrobiologia. 2005;544: 249-258.

568 Tang Q-Y, Yu D, Liu H-Z. *Leptobotia zebra* should be revised as *Sinibotia zebra*  
569 (Cypriniformes: Botiidae). Zool Res. 2008;29: 1-9.

570 Valenta M, Hyldgaard-Jensen J, Jensen SE. Interaction of veronal, pyrophosphate,  
571 citrate and protein with lactate dehydrogenase isoenzyme determination and  
572 kinetics. Acta Vet Scand. 1971;12: 15-35.

573 Völker M, Sonnenberg R, Ráb P, Kullmann H. Karyotype differentiation in  
574 *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). II:  
575 Cytogenetic and mitochondrial DNA analyses demonstrate karyotype  
576 differentiation and its evolutionary direction in *C. riggenbachi*. Cytogenet  
577 Genome Res. 2006;115: 70-83.

578 Völker M, Ráb P Direct chromosome preparation from regenerating fin tissue. p.37–  
579 41 In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, de Almeida Toledo LF, editors.  
580 Fish Cytogenetic Techniques: Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans. Enfield:  
581 CRC Press, 2015.

582 Wickler W. Mimicry in plants and animals. New York: Mc Graw-Hill; 1968.

583 Wu HW. On the fishes of Li-Kiang. Sinensia. 1939;10: 92-142.

584 Yang JX, Chen YR. Revision of the subgenus *Botia* (*Sinibotia*) with description of a  
585 new species (Cypriniformes: Cobitidae). Ichthyol Explor Freshw. 1992;2: 341-  
586 349.

587 Yang JQ, Tang WQ, Liao TY, Sun Y, Zhou ZC, Han CC, et al. Phylogeographical  
588 Analysis on *Squalidus argentatus* Recapitulates Historical Landscapes and  
589 Drainage Evolution on the Island of Taiwan and Mainland China. Int J Mol Sci.  
590 2012;13: 1405-1425.

591 Zhan SH, Glick L, Tsigenopoulos CS, Otto SP, Mayrose I. 2014. Comparative  
592 analysis reveals that polyploidy does not decelerate diversification in fish. J  
593 Evol Biol. 2014;27: 391-403.

595 Table 1. Number of specimens and geographical origin of *Leptobotia guilinensis*, 'B.'  
 596 *zebra* and *Sinibotia pulchra* analysed for this study. Not all specimens were analysed  
 597 by all methods. n = number of specimens.

598

Locality number	Species	n	Sample number	Locality	River	Drainage	Country	Province
1	L. guilinensis L. guilinensis L. guilinensis B. zebra S. pulchra S. pulchra S. pulchra	23 3 2 2 3 1 6	A 8861-8883 A 8901-8903 A 1798-1799 A 8905-8906 A 8889-8891 A 8900 A 1782-1787	market in Guilin	upper Li River	Pearl River	China	Guangxi
2	L. guilinensis B. zebra S. pulchra	10 6 2	A 5267-5276 A 5277-5282 A 5286-5287	ornamental fish import	upper Li River	Pearl River	China	Guangxi
3	B. zebra	5	A 8604-8608	market in Mengshan	upper Li River	Pearl River	China	Guangxi
4	S. pulchra	1	A 8993	Liu River above Yizhou	middle Liu River	Pearl River	China	Guangxi
5	S. pulchra	5	A 9102-9106	market in Nanning	Yong River	Pearl River	China	Guangxi
6	S. pulchra	1	A 8395	Bang Giang at Cao Bang city	Bang Giang	Pearl River	Vietnam	Cao Bang
7	S. pulchra	4	A 8397-8400	stream in Hoa An district	Bang Giang	Pearl River	Vietnam	Cao Bang
8	B. zebra S. pulchra	1 24	A8614 A8615-8638	unknown	Min River	Min River	China	Fujian
9	L. guilinensis S. pulchra S. pulchra	3 2 4	A 0205-0208 A 3681-3682 A 0015-0018	ornamental fish import	Details unknown			

599

600

601

602

603

604

605

606 Table 2. Morphometric comparison of *Leptobotia guilinensis*, *Sinibotia pulchra* and  
 607 '*Botia*' *zebra*. Values give range as % of standard length. Under 'Comparison' is  
 608 indicated if '*Botia*' *zebra* has values like one of the potential parental species or if it is  
 609 intermediate.

	<i>L. guilinesis</i> n = 10	'B.' zebra n = 8	<i>S. pulchra</i> n = 10	Comparison
<b>A. Characters without overlap between <i>Leptobotia guilinesis</i> and <i>Sinibotia pulchra</i></b>				
Pre-pelvic length	51-54	56-59	55-59	zebra = pulchra
Preanal length	74-77	78-80	78-80	zebra = pulchra
Dorsal head length	16-20	20-22	21-24	zebra intermediate
Snout length	6-8	10-11	12-14	zebra intermediate
Pre-anus length	63-71	70-73	73-76	zebra intermediate
Lateral head length	21-24	24-26	27-30	zebra intermediate
Head depth at eye	8-9	10-11	11-12	zebra intermediate
Head depth at nape	11-13	12-14	15-16	zebra = guilinesis
Maximum body depth	11-16	13-17	19-23	zebra = guilinesis
Body depth at dorsal origin	11-17	13-17	18-23	zebra = guilinesis
Maximum head width	8-10	8-10	11-13	zebra = guilinesis
Head width at nares	4-5	4-6	6-9	zebra = guilinesis
Body width at anal origin	4-7	5-6	8-10	zebra = guilinesis
<b>B. Characters with slight overlap between <i>Leptobotia guilinesis</i> and <i>Sinibotia pulchra</i></b>				
Predorsal length	49-58	55-60	55-62	zebra = pulchra
Number of pectoral-fin rays	11-13	13-15	13-15	zebra = pulchra
Interorbital width	3-4	4-4	4-6	zebra intermediate
Length of caudal peduncle	14-18	13-16	12-14	zebra intermediate
Length of upper caudal lobe	16-21	18-20	20-25	zebra = guilinesis
Length of pectoral fin	11-14	12-14	14-19	zebra = guilinesis
Length of lower caudal lobe	18-21	18-21	20-26	zebra = guilinesis
Body width at dorsal origin	6-10	6-9	10-15	zebra = guilinesis
Depth of caudal peduncle	10-13	10-13	13-14	zebra = guilinesis
Length of pelvic fin	10-12	10-11	12-15	zebra = guilinesis
Length median caudal rays	7-10	7-9	9-15	zebra = guilinesis
Total length	116-121	116-120	119-127	zebra = guilinesis
<b>C. characters with broad overlap between <i>Leptobotia guilinesis</i> and <i>Sinibotia pulchra</i></b>				
Eye diameter	2-3	2-3	3-3	
Depth of anal fin	13-15	12-15	14-17	
Postorbital length	12-14	13-14	13-15	
Height of dorsal fin	11-16	11-14	12-18	
Branched dorsal-fin rays	8 ½	7(8) ½	8 ½	zebra speciality
Branched caudal-fin rays	9+8	9+8	9+8	
Branched anal-fin rays	5	5	5	
Number of pelvic-fin rays	8	8	8	

610

611 Table 3. Chromosomal characteristics of three sympatric species of Botiidae from  
 612 the upper Li River (Pearl River basin) including diploid chromosome number (2n) and  
 613 karyotype description.

	n	m	sm	st	a
<i>L. guilinensis</i>	50	6	12	10	22
<i>S. pulchra</i>	100	20	26	28	26
'B.' <i>zebra</i>	100	18	18	36	28

614

615

616

617

618

619 Table 4. Presence of six allozymes in *Sinibotia pulchra*, '*Botia*' *zebra* and *Leptobotia*  
 620 *guilinensis*.

Species	n	Gpi-A	Gpi A	Gpi A	s-Aat	s-Mdh A	Ldh- A	Ldh-B	Pgm	Pgm
Buffer		V	MC 2	F	MC 2	MC 2	V	V	V	F
<i>S. pulchra</i>	4	055	037	039	096	A, C	030, 136	053, 067	083	080
'B.' <i>zebra</i>	6	055	037	039	096	A	030	053, 067	083	080
<i>L. guilinensis</i>	8	065, 070 083, 099	050, 064, 078, 095	060, 078, 096	084, 096	B	136	053, 067	107	100

621



622 Table 5. Species, number code, and accession numbers of analysed Botiidae.  
 623 Abbreviations: OFT – Ornamental fish trade. The individuals marked <sup>a</sup> were used in  
 624 allozyme analyses, those marked with <sup>k</sup> were karyotyped.  
 625

Species	ID	GenBank Accession number	
		Cyt b	RAG
<i>Ambastaia nigrolineata</i>	A0031	AY887845	EF056329
<i>Ambastaia sidthimunki</i>	A0183 KP319024	AY887842 KP319024	KU517025 -----
<i>Botia dario</i>	A7553 EU409614	KU517084 -----	KU517026 EU409614
<i>Botia histrionica</i>	A0041	AY887794	KU517027
<i>Botia lohachata</i>	A0426	KU517085	KU517028
<i>Botia striata</i>	A0011 EU711109	AY887783 -----	KU517029 EU711109
<i>Chromobotia macracanthus</i>	A0178 A0179 EU711137 JN177192	AY887840 AY887841 ----- -----	KU517030 KU517031 EU711137 JN177192
<i>Leptobotia elongata</i>	A0214 A8392 JN177196	AY887779 KU517086 -----	KU517032KU5 17033 JN177196
<i>Leptobotia guilinensis</i>	A0124 A0205 A1798 A1799 A5267 <sup>a, k</sup> A5268 <sup>a</sup> A5269 <sup>a, k</sup> A5270 <sup>a, k</sup> A5271 <sup>a</sup> A5273 <sup>a, k</sup> A5277 <sup>a, k</sup> A5279* A8569 A8570	AY887780 AY887781 KU517087K U517088 KU517089 KU517090 KU517091 KU517092 KU517093 KU517094 KU517095 KU517096 KU517097 KU517098	KU517034 KU517035 KU517036 KU517037 KU517038 KU517039 KU517040 KU517041 KU517042 KU517043 KU517044 KU517045 KU517046 KU517047
<i>Leptobotia microphthalmia</i>	A5283 A5285	KU517099 KU517100	KU517048 KU517049
<i>Leptobotia pellegrini</i>	A1459 A1813 EU292683	KU517101 KU517102 -----	KU517050KU5 17051EU2926 83
<i>Leptobotia taeniops</i>	A8544 A8545	KU517103K U517104	KU517052KU5 17053

	JN177193	----	JN177193
	JN177194	----	JN177194
<i>Parabotia banarescui</i>	A0217	AY887782	KU517054
<i>Parabotia bimaculata</i>	JN177197	----	JN177197
<i>Parabotia fasciata</i>	A8391	KU517105	KU517055
<i>Parabotia lijiangensis</i>	JN177199	----	JN177199
<i>Parabotia mantschuricus</i>	EU711138	----	EU711138
<i>Sinibotia pulchra</i>	A0015	AY887800	----
	A0016	AY887801	----
	A0121	AY887802	----
	A0396	AY887803	KU517056
	A0397 <sup>a</sup>	AY887804	----
	A1782	KU517106	----
	A1783	KU517107	KU517057
	A1785	KU517109	KU517058
	A1786	KU517110	KU517059
	A1787	KU517111	KU517060
	A3681 <sup>a</sup>	----	----
	A3682 <sup>a, k</sup>	----	----
	A5287 <sup>a, k</sup>	KU517112	KU517061
	A8397	KU517113	KU517062
	A8398	KU517114	KU517063
	A8615	KU517115	KU517064
	A8616	KU517116	KU517065
	A0243	KU517117	----
	AY625705	AY625705	----
	AY625706	AY625706	----
	EU282332	EU282332	----
<i>Sinibotia robusta</i>	A0024	AY887805	EF056333
	A2226	KU517118	KU517066
	A2227	KU517119	KU517067
	A2228	----	KU517068
	A8582	KU517120	KU517069
	A8583	KU517121K	KU517070
	A0242	U517122	----
	JN177191	----	JN177191
	AY625707	AY625707	----
	AY625708	AY625708	----
	DQ105208	DQ105208	----
<i>Sinibotia superciliaris</i>	JN177190	----	JN177190
	AY625702	AY625702	----
	AY625703	AY625703	----
	AY625704	AY625704	----
<i>Sinibotia zebra</i>	A5272 <sup>a, k</sup>	KU517123K	KU517071
	A5274 <sup>a</sup>	U517124	----
	A5275 <sup>a, k</sup>	KU517125K	KU517072

	A5276 <sup>a</sup>	U517126	KU517073
	A5278 <sup>a</sup>	KU517127K	KU517074
	A5280 <sup>a</sup>	U517128	KU517075
	A8614	KU517129D	KU517076
	DQ105206	Q105206	-----
	DQ105207	DQ105207	-----
	EU282333	EU282333	-----
	EU282334	EU282334	-----
	EU282335	EU282335	-----
<i>Syncrossus beauforti</i>	A0059	AY887816	KU517077FJ6
	FJ650411	-----	50411
<i>Syncrossus berdmorei</i>	A0277	AY887823	KU517078
<i>Syncrossus helodes</i>	A0574	KU517130	KU517079
	GQ174422	-----	GQ174422
<i>Yasuhikotakia eos</i>	A0062	AY887829	KU517080
<i>Yasuhikotakia lecontei</i>	A0568	KU517131	KU517081
<i>Yasuhikotakia modesta</i>	A0200	AY887833	KU517082
	GQ174361	GQ174361	-----
	GQ174419	-----	GQ174419
	JQ346129	-----	JQ346129
<i>Yasuhikotakia morleti</i>	A0067	AY887835	KU517083
	GQ174375	GQ174375	-----
	FJ650412	-----	FJ650412
<i>Gyrinocheilus aymonieri</i>	A0256	KU517132	EF056390

626

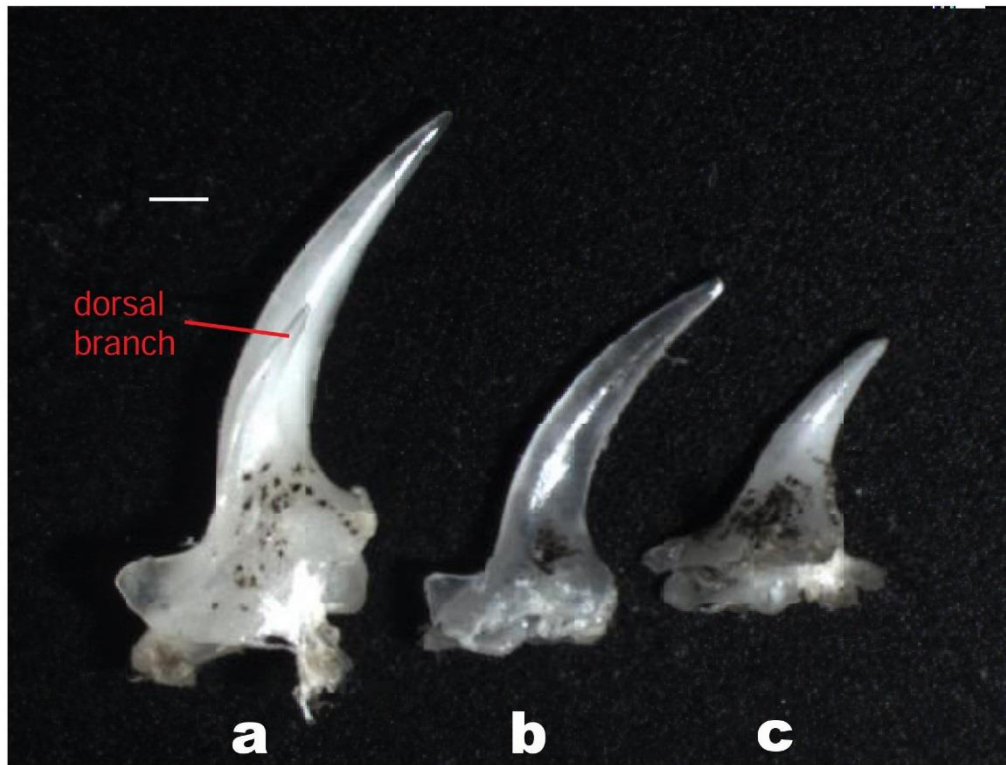


Fig. 2 Right suborbital spine of (a) *Sinibotia pulchra* (A1783, 70.5 mm SL), (b) '*Botia*' *zebra* (A8607, 61.9 mm SL) and (c) *Leptobotia guilinensis* (A8573, 70.6 mm SL) in dorsal view. The spine bears a dorsal branch in *S. pulchra*, but this branch is missing in *L. guilinensis* and '*B.*' *zebra*. A simple suborbital spine is the diagnostic character for the genus *Leptobotia*. Scale bar is 1 mm.

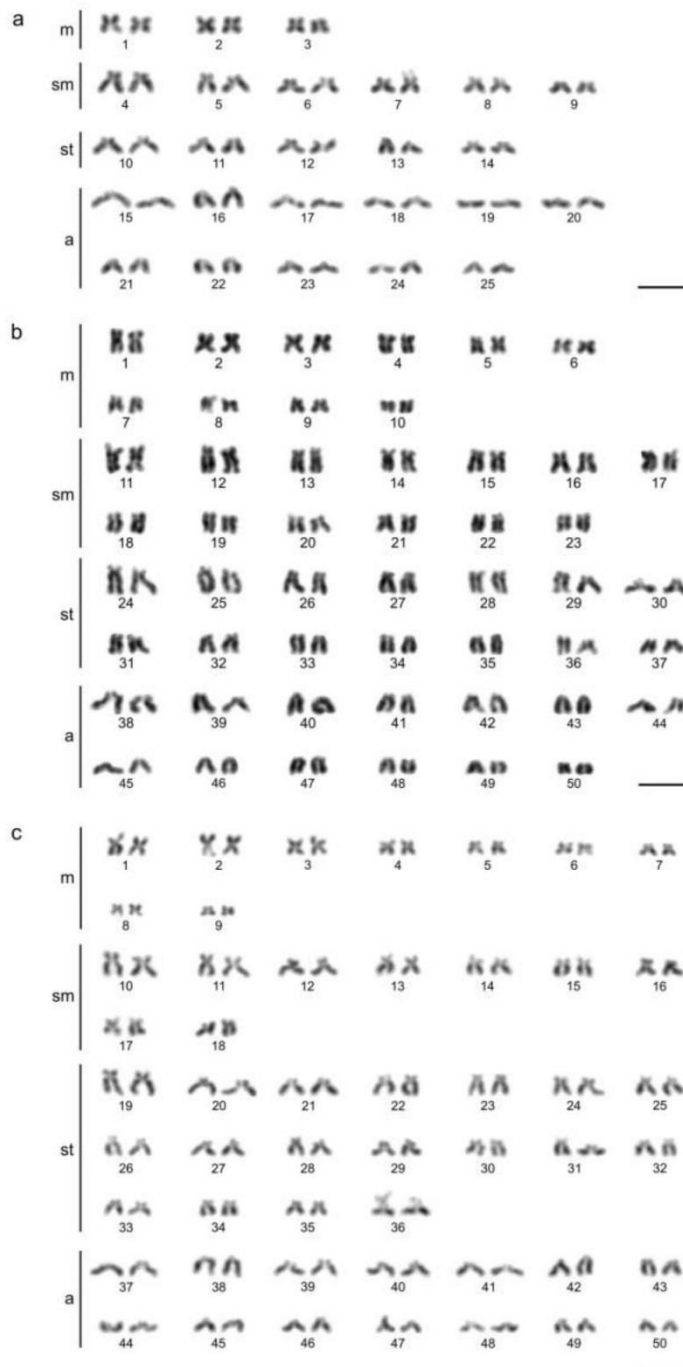


Fig. 4. Karyotypes of the diploid species *Leptobotia guilinensis* (a) and the tetraploid species '*Botia*' *zebra* (b) and *Sinibotia pulchra* (c). Bar = 10  $\mu$ m.

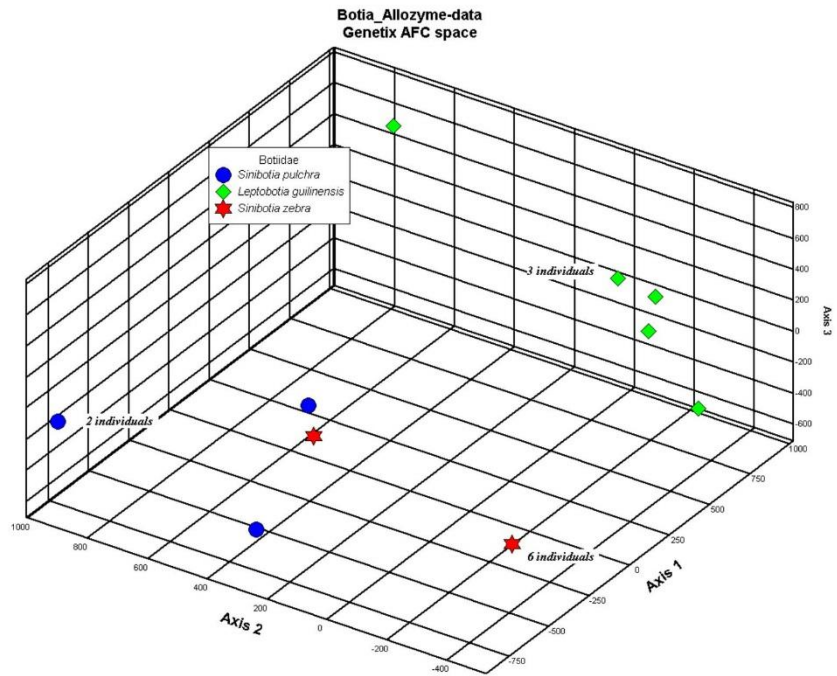


Fig. 5. Graphic diagram in 3D-space of 16 individuals representing three botiid species based on correspondence factorial analysis of allele frequencies in 6 allozyme loci (AFC in GENETIX software).



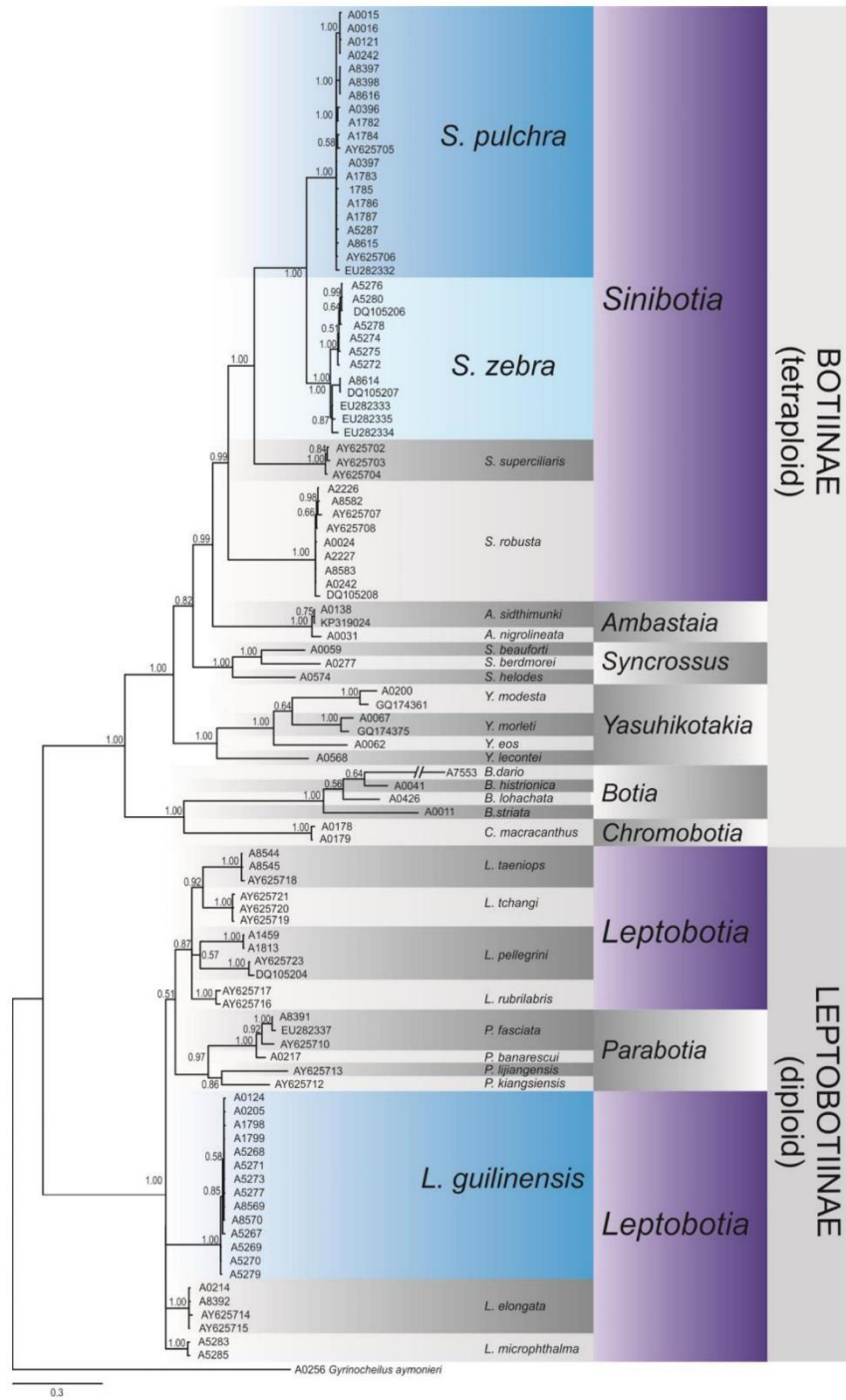


Fig. 6. Bayesian tree for the mitochondrial cytochrome *b* dataset. The values at the nodes represent the Bayesian posterior probabilities. *Sinibotia zebra* and *Sinibotia pulchra* are sister species, while *Leptobotia guilinensis* is only distantly related.

Figure 7

[Click here to download Figure Figure 7.pdf](#)

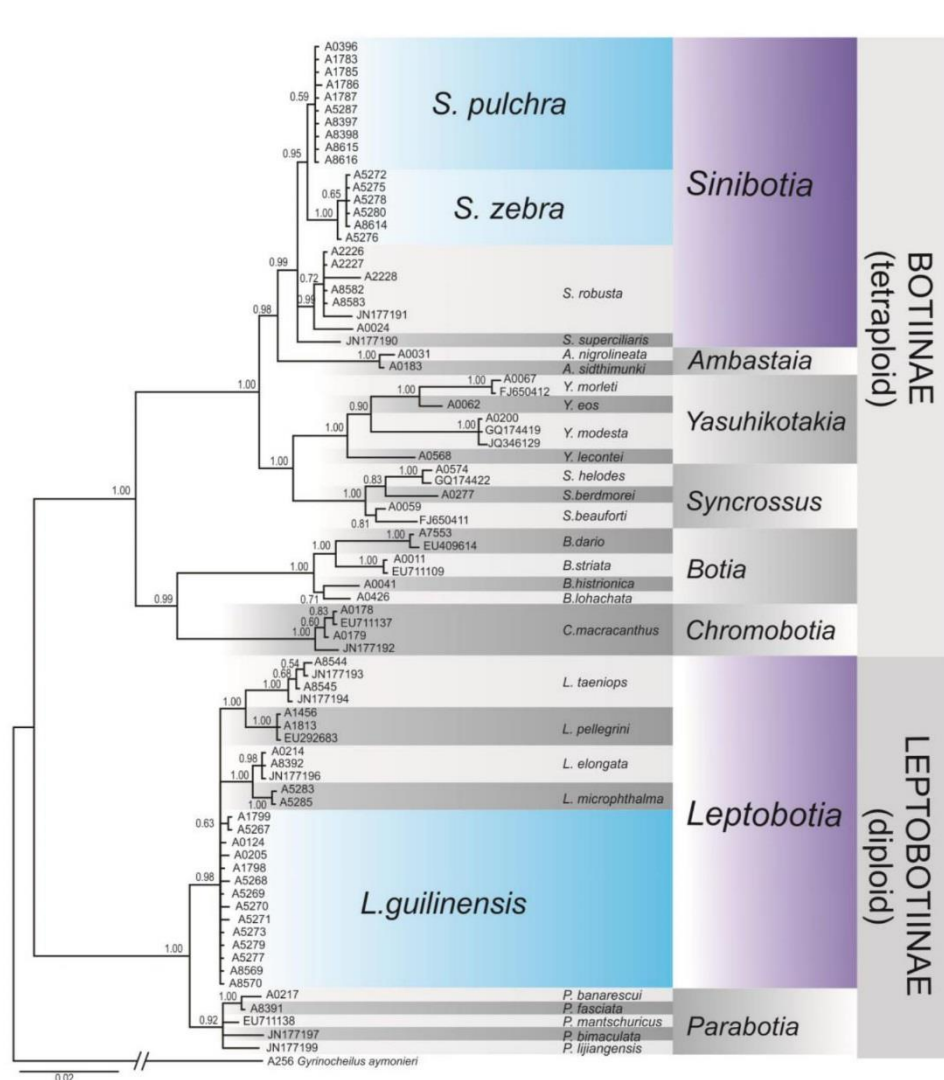


Fig. 7. Bayesian tree for the nuclear RAG-1 dataset. The values at the nodes represent the Bayesian posterior probabilities. *Sinibotia zebra* and *Sinibotia pulchra* are sister species, while *Leptobotia guiliniensis* is only distantly related.

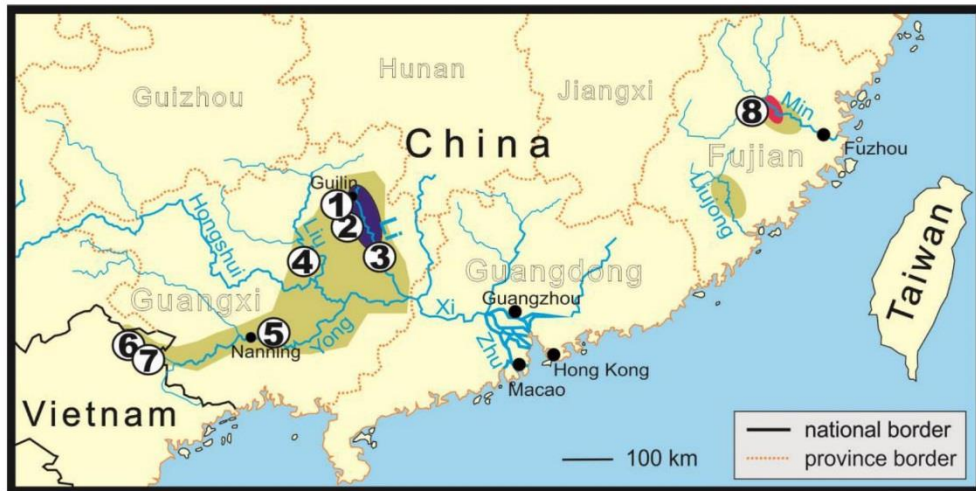
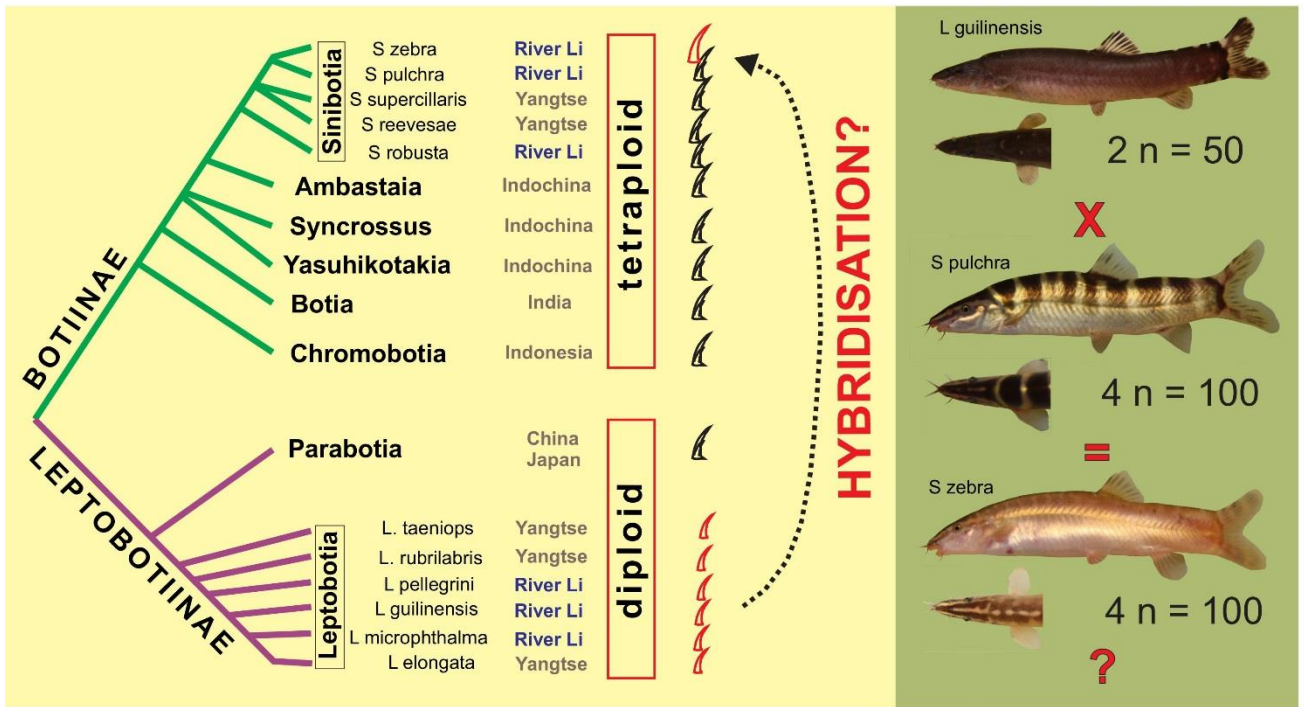


Fig. 8. Map of Pearl River basin, Liujong River and Min River in southern China. Distribution areas of botiid species indicated as follows: Green: *S. pulchra*, violet: joint distribution area of *L. guilinensis* and '*B.*' *zebra*, pink: new record of '*B.*' *zebra*. Circles with numbers indicate geographical origin of analysed samples. Numbers correspond to locality numbers in Table 1.



## 6. Souhrnná diskuze

### 6.1. Vliv karyotypové diferenciace na evoluci genomu paprskoploutvých ryb

I přes ohromnou druhovou diverzitu (Nelson 2006) má většina paprskoploutvých ryb karyotypy tvořené 48 nebo 50 chromozómy (Mank & Avise 2006, Kohn et al. 2006, Molina et al. 2014). Zatímco u jeseterů a síhů (včetně těch zde studovaných; Symonová et al. 2013a, b) je situace značně odlišná a specifická vzhledem k polyploidizačním událostem specifickým pro tyto linie, výsledky u studovaných zástupců mřenek čeledi Nemacheilidae (Sember et al. 2015) a diploidních druhů sekavek čeledi Botiidae (Bohlen et al., in rev., Tab. 1) potvrzují výše zmíněný trend pozoruhodné karyotypové stability na úrovni  $2n$ . Zejména u detailněji studovaných mřenek výsledky naznačují uniformitu  $2n$  a omezení změn makrostruktury karyotypu na intrachromozómové přestavby, zejména pak na pericentrické inverze, které jsou dosud nejčastější karyotypovou změnou popisovanou v cytogenetických studiích u ryb (Galetti et al. 2000, Molina et al. 2014, Pucci et al. 2014). Vedle mechanismu pericentrické inverze je však možné, že polohu centromery mohly změnit ještě adice a redistribuce heterochromatinu (Krasíková et al. 2009, Zlotina et al. 2012) (pozorovaná u mřenky *Mesonemacheilus guentherii*, Sember et al. 2015) nebo vznik neocentromery za současného zániku centromery původní (Marshall et al. 2008). Výjimku z pozorovaného souboru druhů pak tvoří mřenky *Nemachilichthys ruppelli* a *Schistura notostigma*, jejichž  $2n$  bylo redukováno zejména Rb translokacemi a v druhém případě pravděpodobně i tandemovými fúzemi. U jedinců *S. notostigma* navíc byly odhaleny dvě karyomorfy, ale vzhledem ke smíšenému materiálu se nedá určit, jestli se jednalo o jedince ze stejné lokality nebo z různých populací.

Někteří autoři (Mank & Avise 2006, Oliveira et al. 2009) míní, že v rámci rybích skupin s konzervovaným  $2n$  působí na karyotypovou diferenciaci určité evoluční mechanismy, které z jakéhosi důvodu zabraňují chromozómovým přestavbám většího rozsahu – konkrétně takovým, jež by změnily  $2n$ , zatímco genomy se nadále vyvíjejí formou menších chromozómových změn a intrachromozómových přestaveb (Pereira et al. 2013), jak bylo v některých případech dokumentováno i na genomové úrovni (Aparicio et al. 2002, Thomas et al. 2003). Naopak některé jiné skupiny kostnatých ryb – zejména ty, které prodělaly nějakou další celogenomovou duplikaci navazujících na TSGD, vykazují více variabilní karyotypy (Ravi & Venkatesh 2008). Uniformita  $2n$  u Nemacheilidae tedy neodráží značnou druhovou diverzitu skupiny, podobně jako tomu je i u dalších rybích čeledí, např. Leuciscinae (Arai 2011, Pereira et al. 2012). Některé rybí čeledi – zejména některé mořské

trnobřiché ryby (Perciformes) zůstávají dokonce konzervativní nejen z hlediska  $2n$ , ale i co do zastoupení jednotlivých morfologických skupin chromozómů (tzv. karyotypová stáze neboli karyotypová uniformita makrostruktury; Molina 2007). Je pozoruhodné, že u řady takových skupin lze pomocí cytogenetického mapování odhalit (někdy i poměrně značnou) variabilitu tzv. mikrostrukturní, tedy na úrovni dynamiky zejména repetitivních sekvencí daného genomu (Affonso & Galetti 2005, Gross et al. 2010, Boron et al. 2009, Pereira et al. 2012, Calado et al. 2014). Tento typ variability byl odhalen i v případě studovaných mřenek čeledi Nemacheilidae (Sember et al. 2015) a rovněž i v případě dvou sympatrických druhů síhů (Symonová et al. 2013b), jak bude detailněji popsáno v následující kapitole.

Studie Sember et al. (2015) kombinuje cytogenetický přístup s vhodnou fylogenetickou analýzou a díky tomu je zřejmé, že podobně jako u celé řady jiných skupin ryb, ani u mřenek karyotypové změny příliš nenásledují příbuzenské vztahy ve fylogenetickém stromu. Naše výsledky naznačují, že v rámci této čeledi se odehrála celá řada karyotypových změn paralelně v různých liniích a nezávisle na sobě. Důkazem budiž i situace u druhů s derivovanými karyotypy (*N. ruppelli* a *S. notostigma*), které se nacházejí na různých pozicích fylogenetického stromu a kde tedy redukce  $2n$  probíhaly paralelně jako dva konvergentní procesy. Nezávislé fúze v rámci konkrétní skupiny ryb byly pozorovány třeba u cichlid rodu *Symphysodon* (Cichlidae) (Gross et al. 2010) nebo skupiny Salmonidae (Phillips & Ráb 2001). Z hlediska mechanismu, některé fúze u mřenek zahrnovaly lokusy rDNA – nápadně podobné situace byly již pozorovány u jiných ryb (Molina & Galetti 2002, Rosa et al. 2012, Jacobina et al. 2013, Getlekha et al. 2016). K formaci Rb translokací může vést například heterologní synapse NOR v meióze (Raskina et al. 2008) nebo rozvolnění chromatinu v transkripčně aktivních lokusech 5S rDNA (Rosa et al. 2012). Některé studie u ryb naznačují, že oblasti rDNA jsou náchylné ke dvouvláknovému zlomu, což vede k následným přestavbám (Rosa et al. 2012, Favarato et al. 2016). Úloha asociovaného AT- nebo CG- bohatého heterochromatinu v tomto procesu byla předmětem bohaté diskuze v Sember et al. (2015). Centromery produktů Rb translokace vykazovaly často nápadný blok konstitutivního heterochromatinu, podobně jako u jiných ryb (Giles et al. 1985, Molina a Galetti 2002, Rosa et al. 2012) nebo např. u některých žab (Schmid et al. 2010).

Nesouhra fylogenetických a cytogenetických dat je u ryb často spjata i s výskytem pohlavních chromozómů. Studie prezentované v této dizertační práci jsou toho dalším důkazem, neboť zatímco analýza u většiny karyotypů mřenek a sekavek (Sember et al. 2015, Bohlen et al., in rev., Tab. 1) neodhalila žádné cytologicky detekovatelné pohlavní chromozómy, jediný druh mřenky (*S. fasciolata*) ukazuje systém pohlavních chromozómů



XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>. U příbuzné skupiny Cobitidae (konkrétně u jedné populace sekavce písečného *C. striata*) byl popsán zase ojedinele systém X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y, vzniklý pravděpodobně fúzí původního Y a autozómu (Saitoh 1989) a u dvou dalších druhů ze stejné čeledi byly popsány ještě systémy ZZ/ZW a ZZ/Z0 (Rishi & Haobam 1984, Sharma & Tripathi 1988). V našem případě sice zatím nemáme žádný přímý důkaz potvrzující konkrétní mechanismus vzniku systému pohlavních chromozómů XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> u *S. fasciolata*, ale domníváme se, že na vzniku Y<sub>1</sub> a Y<sub>2</sub> se mohl podílet centrický rozpad proto-X chromozómu. Je možné, že svoji roli mohla sehrát i přítomnost klastru 5S rDNA na chromozómu X, a to podobným způsobem, jak již bylo diskutováno výše.

Na pohlavních chromozómech, včetně těch pozorovaných u ryb (Vicente et al. 2003, Martins 2007, Cioffi et al. 2012a, c), často akumulují repetitivně sekvence. To může v některých případech dokonce vést k situaci, kdy nepárový pohlavní chromozóm, ač obvykle degenerující, se paradoxně stane největším v karyotypu (Mank & Avise 2009, Poltronieri et al. 2014, Scharl et al. 2015). Pohlavní chromozómy (i u ryb) se někdy dají přímo odlišit pomocí detekce bloků konstitutivního heterochromatinu C-pruhováním (Saitoh 1989, Nanda et al. 1990, Almeida-Toledo et al. 2001). Jindy může mapování konkrétních repetitivních sekvencí odhalit přítomnost morfologicky nediferencovaných pohlavních chromozómů jako např. mapování 18S a GC-bohatého heterochromatinu u jedné karyomorfy *H. malabaricus* (Cioffi et al. 2011a). Kombinované výsledky metod rDNA FISH a CGH v recentní studii na tetrách rodu *Triporthus* (Yano et al. in rev.) navíc ukazují, že jeden lokus 45S rDNA se nachází přímo v samičí specifické oblasti na W chromozómu, což by mohlo naznačovat nějakou roli rDNA v diferenciaci pohlavních chromozómů.

Náhodný a ojedinelý případ výskytu pohlavních chromozómů v rámci dané taxonomické skupiny potvrzuje trend pozorovaný u ryb – tj. že systémy pohlavních chromozómů ryb se vyvíjely opakovaně a nezávisle na sobě (Woram et al. 2003, Scharl 2004, Volff et al. 2007, Mank & Avise 2009), často i v rámci blízké příbuzných druhů (Phillips et al. 2001, Peichel et al. 2004, de Oliveira et al. 2008, Henning et al. 2008, Cioffi et al. 2012b) nebo u různých populací daného druhu (Zhou et al. 2010), a to díky neuvěřitelné plasticitě a dynamice genomů kostnatých ryb. Důvod této variability bývá přisuzován TSGD a tedy přítomnosti duplikovaných redundantních kopií genů, kdy jedna z těchto kopií může následně získat funkci potenciálně důležitou pro určení pohlaví (Matsuda et al. 2002, Nanda et al. 2002) a to může podpořit vznik zcela nového páru gonozómů (Mank & Avise 2009). Variabilita bývá taktéž často přisuzován evolučnímu „mládí“ rybích pohlavních chromozómů, ale o tomto tématu je pojednáno v literárním přehledu (v kapitole 3.1) a také

v recentní přehledové práci (Schartl et al. 2015). Přítomnost pohlavních chromozómů někdy může přispět i k post-zygotické reproduktivní izolaci a ke speciaci, jak bylo ukázáno, např. právě u ryb (Kitano et al. 2009, Kitano & Peichel 2012), ale není to pravidlem (Bueno et al. 2016).

Zatímco u skupin s dynamičtější karyotypovou diferenciací na makrostrukturní úrovni, jako jsou např. Salmonidae (Phillips & Ráb 2001) a částečně Esociformes (Ráb 2004) můžeme pozorované jevy na karyotypové úrovni do jisté míry vysvětlit karyotypovou ortoselekcí (White 1978, King 1993) nebo selekci pro přestavby zvyšující/snižující četnost rekombinace (Qumsiyeh 1994, Phillips & Ráb 2001), u karyotypů konzervativnějších skupin, s variabilitou na úrovni intrachromozómových přestaveb a dynamikou repetitivních sekvencí, by prokazování podobných vztahů bylo složité (včetně mřenek; Sember et al. 2015). Pozorované dynamice karyotypů mřenek spíše odpovídá recentní představa meiotického/centromerického tahu (Molina et al. 2014), podle které vlivem rozdílných schopností chromozómů vázat mikrotubuly dělicího vřeténka dochází k následné akumulaci jednoramenných nebo dvouramenných chromozómů v karyotypu. Navíc i v případě centrických fúzí bylo popsáno, že pokud výsledná centromera produktu fúze je robustnější než centromery původních jednoramenných chromozómů, dochází k preferenčnímu přenosu produktu fúze do vajíčka (Chmátal et al. 2014). Podobný mechanismus tak nelze vyloučit ani v případě pozorovaných centrických fúzí u dvou druhů mřenek, včetně nálezu dvou různých karyomorf u druhu *S. notostigma*.

Mezi *C. albula* a *C. fontanae* žádný rozdíl v makrostruktuře karyotypu není, přesto se tyto sympatrické druhy od sebe na úrovni genomu značně odlišily. Podobný trend je pozorován u ryb často – tj. malá variabilita  $2n$ , spíše vnitrochromozómové přestavby (zejména pericentrické inverze) a značná dynamika repetitivních sekvencí (Pucci et al. 2014; Traldi et al. 2015 a citace zde uvedené). Stabilní  $2n$  a variabilní NF jako pravděpodobný důsledek pericentrických inverzí, podpořený dynamikou heterochromatinu byl pozorován např. u *Characidium* (Characiformes) (Pucci et al. 2014), kde podobně jako u síhů (Symonová et al. 2013b) autoři přisuzují vliv dynamiky repetitivních sekvencí na změnu rekombinační četnosti v genomu.

## 6.2. Vliv dynamiky repetitivních sekvencí na evoluci genomu paprskoploutvých ryb

### 6.2.1. Heterochromatin a rDNA

Korelace mezi akumulací repetitivních sekvencí, heterochromatinem a přestavbami chromozómů byla uváděna jako příčina karyotypové diferenciaci u řady skupin ryb (Cioffi & Bertollo 2012). Výsledky našich studií (Symonová et al. 2013b, Sember et al. 2015 a Tab. 1) podpořily obecně sledovaný trend značné variability v distribuci a sekvenčním složení heterochromatinu u řady kostnatých ryb. Vedle polymorfizmů spojených s adicí AT-bohatého heterochromatinu (Sember et al. 2015) byly u některých druhů mřenek popsány i vnitropopulační polymorfizmy spočívající v rozdílné velikosti ramének homologických chromozómů po amplifikaci heterochromatinu (podobně jako např. u Völker et al. 2007, Phillips & Ráb 2001, Baumgärtner et al. 2014). Často pozorovaná heterochromatinová p-raménka jsou pravděpodobně výsledkem paracentrické inverze doprovázené tandemovými duplikacemi heterochromatinu, podobně jako u lososovitých (Phillips & Ráb 2001).

rDNA je nesmírně dynamická frakce genomu (Escobar et al. 2011), jejíž evoluční vývoj může být do značné míry odlišný od evolučního vývoje asociovaných organismů (Nakajima et al. 2012). Variabilitu v podobě nejrůznějších typů polymorfizmů spjatých s jedním či oběma klastry rDNA jsme pozorovali zejména u mřenek. Patří sem 1) délkový polymorfismus mezi homologickými lokusy (u ryb častý; např. Mandrioli et al. 2001, Vicari et al. 2006 a mnoho dalších) v důsledku nerovnoměrného crossing-overu (Collares-Pereira & Ráb 1999, Sola & Gornung 2001), 2) heterozygoti pro inverzi lokusu rDNA (pozorované i u sesterské skupiny Cobitidae; Boron et al. 2006 a jiných skupin ryb; např. Vicari et al. 2006, Mariotto et al. 2009, Bueno et al. 2014), 3) vnitropopulační variabilita ve fenotypech rDNA (v rámci Cobitidae: Rábová et al. 2001, Boroń et al. 2006; dále pak např. Fujiwara et al. 1998, Castro et al. 2001, Ferro et al. 2001, Mandrioli et al. 2001, Singh et al. 2009, Śliwińska-Jewsiewicka et al. 2015) a 4) heterozygoti pro přítomnost/absenci lokusu rDNA na homologických chromozómech (např. Jankun et al. 2001, Blanco et al. 2010a, Pansonato-Alves et al. 2013a, Bueno et al. 2014, Pereira et al. 2014, 2015, Silva et al. 2014, Daniel et al. 2015, Traldi et al. 2015). Podobné polymorfizmy jsou obvykle neinformativní z hlediska fylogenetických vztahů (Dobigny et al. 2004, Cabral-de-Mello & Martins 2010). Dále u mřenek a síhů jsme zaznamenali abnormální fenotypy rDNA charakteristické rapidním nárůstem lokusů a/nebo ko-lokalizací obou klastrů rDNA. Některé studie vysvětlují nárůst počtu klastrů rDNA prostřednictvím centrických rozpadů, při nichž zároveň tyto rDNA stabilizují nově vzniklé konce chromozómů (Hall & Parker 1995, Hirai et al. 1996, Cazaux et al. 2011). Ne vždy jsou však asociace centrických rozpadů

s navýšením počtu lokusů rDNA pozorovány, někdy je tomu spíše právě naopak (Lan & Albert 2011). U ryb, v případě keříčkovce *Clarias batrachus* s 54 lokusy 5S rDNA hrály pravděpodobně centrické rozpady roli pouze částečně, nemohly být totiž při srovnání 2n příbuzných druhů příčinou až tak rapidní disperze 5S rDNA (Maneechot et al. 2016). V našich studiích ani v jednom případě nebyl pozorován nárůst 2n v korelaci s disperzí rDNA. Je tedy na místě pátrat po jiných mechanismech. Některé studie se opírají o přítomnost lokusů 45S rDNA v terminální části chromozómů, kde je vysoký potenciál pro ektopickou rekombinaci (s minimálními negativními efekty na následnou meiotickou segregaci), a tudíž i pro translokace části rDNA klastrů na jiné chromozómy, při současném zvýšení počtu jejich lokusů (Hanson et al. 1996, Pedrosa-Harand et al. 2006). Tento mechanismus teoreticky mohl přispět k amplifikaci 45S rDNA u síha *C. fontanae* a v některých případech i u mřenek s dispergovanými 5S nebo 45S rDNA – zejména tam, kde tyto klastry výrazněji přesahují z pericentromerické oblasti do p-ramének akrocentrických/subtelocentrických chromozómů. Mohl však být zároveň podpořen nebo zcela zastoupen jiným běžně pozorovaným mechanismem – transpozicí rDNA. Zejména krátká raménka jednoramenných chromozómů jsou více přístupná transpozici (Hirai 1999), což podporují i výsledky genomové studie u čtverzubce *Takifugu rubripes* (Dasilva et al. 2002). Případy disperze rDNA se ale nevyhýbají ani rybám s převážně intersticiální pozicí 5S rDNA (da Silva et al. 2011, Scacchetti et al. 2011, 2012), která bývá u ryb pozorována nejčastěji (Martins & Galetti 2001, Cioffi & Bertollo 2012). Někteří autoři sice naznačují, že tato pozice poskytuje 5S rDNA určité výhody např. z hlediska evoluční stability (Martins & Galetti 2001), konkrétně např. z důvodu větší ochrany před transpoziční aktivitou (Noletto et al. 2007, Sczepanski et al. 2007), ale naše výsledky u mřenek (Sember et al. 2015) a některé další studie (např. da Silva et al. 2011, Yano et al. 2014) tyto hypotézy nepotvrzují.

Nejvíce lokusů 5S rDNA (18-20) bylo lokalizováno u endemitních druhů mřenek (Sember et al. 2015) a endemitního síha *C. fontanae* (až 40 lokusů 45S rDNA) (Symonová et al. 20013b). Důvodem vysokého počtu detekovaných signálů může být mj. přítomnost satDNA odvozených od rDNA, jak bylo pozorováno v případě 5S (Volkov et al. 2001, Vitorazzi et al. 2011) včetně případů u ryb, konkrétně u trahira malabarského *H. malabaricus* (Martins et al. 2006). Je ale nutné uvést, že např. u trahira se jedná o velmi specifickou satDNA vyskytující se pouze u tohoto druhového komplexu (Martins et al. 2006, Ferreira et al. 2007). Navíc u mřenek byla prokázána aktivita některých nadpočetných NOR pomocí detekce dusičnanem stříbrným (Sember et al. 2015).

Ko-lokalizace rDNA byly pozorovány i u jiných skupin ryb, např. Notothenoidei (Mazzei et al. 2004), Siluriformes (Mariotto et al. 2011, Ziemniczak et al. 2012), Characiformes (Vicari et al. 2006). V rámci Cypriniformes – konkrétně např. u Leuciscinae (Gromicho et al. 2006a, b, Kirtiklis et al. 2010, Rossi et al. 2012, Pereira et al. 2014) a Cobitidae (Boroń et al. 2006) a v rámci Salmoniformes i u síhů (*Coregonus lavaretus*, Rossi & Gornung 2005). U čeledi Locariidae (Siluriformes) je toto dokonce znak společný pro celou skupinu (Ziemniczak et al. 2012). Byly pozorovány také kolokalizace rDNA s klastry jiných repetitivních genů (např. Hashimoto et al. 2011, 2013, Lima-Filho et al. 2012, Pansonato-Alves et al. 2013a, b, Silva et al. 2013, 2015 aj.), popř. ko-lokalizace takových genů bez účasti rDNA (např. Silva et al. 2013, Pansonato-Alves et al. 2013a, Utsunomia et al. 2014, García-Souto et al. 2015, Costa et al. 2016). Určitá výhoda tohoto uspořádání by obecně mohla plynout v nahromadění těchto esenciálních genů v transkripčně aktivních oblastech genomu – může zde být určitý tlak pro jejich shlukování v místech s konkrétními epigenetickými charakteristikami (Lercher et al. 2002). Zdá se ale být nepravděpodobné, že např. v případě ko-lokalizujících nebo syntenicky se vyskytujících klastrů rDNA představuje toto uspořádání nějakou jinou (specifičtější) expresní výhodu – už jen z toho důvodu, že 45S rDNA využívá k přepisu RNA polymerázu I (Moss & Stefanovsky 1994), zatímco 5S rRNA je přepisována RNA polymerázou III (Paule & White 2000) a rovněž mechanismy regulace exprese obou rDNA shluků jsou odlišné (Gerbi et al. 2003, Russell & Zomerdijsk 2005, Ciganda & Williams 2011, Layat et al. 2013). 5S rRNA se syntetizuje navíc mimo jádérko (Ciganda & Williams 2011). Zároveň je zde otázka, jestli překrývání obou klastrů naopak expresi neomezuje. Jasnou odpověď přinášejí kvasinky, u nichž jsou standardně 5S vmezeřeny mezi geny hlavního klastru rDNA (přehled viz Ciganda & Williams 2011). Dále u chňapalovitých ryb (Lutjanidae) (Costa et al. 2016) byl pomocí FISH odhalen osamocený (a tedy s velkou pravděpodobností funkční) pár 45S rDNA, který ko-lokalizuje s jedním lokusem genů pro histon H3. Existují práce naznačující možné výhody daného uspořádání (Wicke et al. 2011) a to nejen v rámci rDNA, ale i v případě ko-lokalizace rDNA a jiné multigenové rodiny (Hashimoto et al. 2011). Např. u rostlin (Angiospermes) vznikla tato situace opakovaně v evoluci, ale následně se jen zřídka udržela (Roa & Guerra 2015). U některých rostlin, kde není ko-lokalizace rDNA, tak bylo ukázáno, že oba klastry rDNA spolu volně asociují v interfázi, ale důvod není dosud objasněn (Highett et al. 1993, Németh et al. 2010). Separace obou shluků rDNA na rozdílných chromozómech na druhou stranu ale umožňuje jejich nezávislou evoluci a zabraňuje nežádoucím translokacím (Martins & Galetti 1999, Martins & Wasco 2004). U různých organismů je pozitivní korelace mezi vyšším

počtem lokusů rDNA a případem, kdy aspoň některé z nich ko-lokalizují (Roa & Guerra 2015, Sember et al. 2015). Extrémním případem je endemický druh pelyňku *Artemisia*, kde ko-lokalizují naprosto všechny lokusy 5S a 45S a analýza impregnací stříbrem (Ag-NOR) ukázala, že většina NOR je aktivních (Garcia et al. 2007). Zůstává otázka, zda-li je to jen doprovodný jev dynamiky genomu této endemické rostliny, anebo to má nějakou souvislost s adaptací na extrémní xerofytní prostředí.

Výsledky našich prací potvrzují novodobé představy o dynamice rDNA, podle nichž distribuce klastrů těchto genů může být informativní pro komparativní analýzy blízce příbuzných druhů a pro detekci populační variability (Gross et al. 2010, Poletto et al. 2010a), vyvíjí se však svojí vlastní evoluční cestou, která nenásleduje fylogenetické vztahy dané taxonomické skupiny (Poletto et al. 2010a, Nakajima et al. 2012, Milhomem et al. 2013). Při srovnávání vyšších taxonomických úrovní by se dynamika distribuce rDNA a její informační hodnota měla hodnotit opatrněji. Využití mapování rDNA a jiných repetitivních genů lze spatřovat v novém světle – jako markery akutní zvýšené dynamiky genomu, která může eventuálně souviset s probíhajícím procesem speciace nebo hybridizace (Raskina et al. 2004, Raskina et al. 2008, Pereira et al. 2014, Dion-Côté et al. 2015). Tato dynamika může být informativní také pro detailnější vhled do karyotypové diferenciaci skupin, jejichž karyotypy se po konvenční cytogenetické analýze jeví jako konzervativní (Sczepanski et al. 2007, Symonová et al. 2013b, Sember et al. 2015).

### **6.2.2 Asociace disperze rDNA a TEs a její evoluční důsledky**

Ukazuje se, že míra disperze lokusů rDNA závisí na míře transpozice a na mechanismech eliminace vzniklých nadbytečných kopií, jak naznačují práce u rostlin (Raskina et al. 2008, Roa & Guerra 2015). Pomocí fibre-FISH bylo přímo ukázáno, že kopie TEs jsou vmezeřené mezi kopie 45S rDNA (Raskina et al. 2004, 2008). Celá řada prací ukázala, že některé TEs, např. různé LINE RTEs (Jakubczak et al. 1991, Averbek & Eickbush 2005, Zhang et al. 2008) nebo DTEs (Penton a Crease 2004) se přednostně vmezeřují do rDNA, ať už díky přímé preferenci, nebo z důvodu akumulace v podobných místech genomu (Raskina et al. 2008). Podle Zhanga et al. (2008) jsou rDNA pro inzerci TEs přímo ideální vzhledem k jejich repetitivní povaze a časté transkripci. Opakovaná transpozice následovaná různou mírou sekundární amplifikace v novém místě může být vysvětlením pro přítomnost různě intenzivních signálů po FISH, zejména pak většího množství velmi malých nadbytečných lokusů. Je možné, že některé lokusy zůstanou pod úroveň rozlišení metody FISH a i to může být jedna z příčin pozorovaných polymorfizmů



(Almeida-Toledo et al. 2002, Boroń et al. 2006, Kirtiklis et al. 2010). Různá míra amplifikace minoritních míst může být dále příčinou polymorfizmů mezi populacemi (Roa & Guerra 2012). Výše uvedené podporuje studie u tlamouna nilského *Oreochromis niloticus*, kde metoda FISH odhalila dva páry 5S a tři páry 45S rDNA, zatímco následná analýza genomu pomocí BLAST/n odhalila dalších 59 kopií 5S rDNA a 38 kompletních nebo neúplných kopií 18S rDNA roztroušených napříč genomem (Nakajima et al. 2012).

TEs sousedící nebo přímo včleněné do oblasti 5S rDNA (zejména do nepřepisovaného mezerníku) byly popsány ve větší míře u rostlin (Raskina et al. 2004, 2008, Kalendar et al. 2008). Poslední dobou přibývá podobných prací také u ryb a tyto studie přímo či nepřímo ukazují, že asociace TEs s rDNA může vést ke společné disperzi obou těchto sekvencí a ke zvýšené karyotypové diverzitě (Cioffi et al. 2010, de Silva et al. 2011, Nakajima et al. 2012, Martins et al. 2013, Yano et al. 2014, Merlo et al. 2013, Schneider et al. 2013, Silva et al. 2013 aj.). Většina těchto prací se zabývá elementy rodiny *Rex*. Exploze jejich aktivity a zvýšený počet kopií v genomu vedou k rapidní diverzifikaci genomů mezi blízkými příbuznými druhy (Hua-Van et al. 2011). Je pozoruhodné, že např. u druhového komplexu trahira *Erythrinus erythrinus* je pozorována disperze 18S asociovaná s *Rex1* u třech ze čtyř karyomorf (Cioffi et al. 2010, Martins et al. 2013, Yano et al. 2014). V jiných případech je dokumentována pouze ko-lokalizace *Rex* elementu s rDNA, aniž by to bylo přímo doprovázeno rapidním nárůstem lokusů (Pansonato-Alves et al. 2013b, Pereira et al. 2015). Zatímco u síhů (Symonová et al. 2013b) jsme prokázali přímým mapováním metodou FISH, že disperze lokusů 45S rDNA (resp. jeho části) může být asociovaná s aktivitou elementu *Rex1*, u mřenek jsme díky analýze sekvence 5S rRNA fragmentu endemického druhu *Schistura pridii* objevili asociovaný jiný RTE, konkrétně *L1-2\_DR* (Sember et al. 2015). Kauzální souvislost s tímto nebo jiným TE a disperzí rDNA nebyla u dalších druhů mřenek přímo prokázána. Tyto výsledky ale naznačují, že dosavadní práce popisující asociaci nejběžněji mapovaných rybích TEs (tedy elementy rodiny *Rex*) jsou jen špičkou ledovce, obzvláště pokud současné analýzy naznačují, že převahu v rybích genomech tvoří spíše DTEs (Chalopin et al. 2015a). Kromě našich výsledků to naznačuje i nález asociace (bez zvýšeného počtu lokusů) *Tol2* elementu s genem 18S rRNA (hAT, DTE) u kranasovce štíhlého *Rachycentron canadum* (Costa et al. 2013). Dále pak např. u jiných Salmoniformes byl nalezen SINE-like element *BgIII* u pstruha potočního *Salmo trutta* v IGS poblíž genu 18S rRNA (Caputo et al. 2009 a citace v něm uvedené) nebo byla odhalena asociace 18S a *Mariner*-like elementů u hlaváče černého *Gobius niger* (Gobiidae) (Mandrioli et al. 2001) a lokalizace elementů ze stejné rodiny v heterochromatinu přiléhajícímu k NOR u čtverzubce

*Tetraodon fluviatilis* (Mandrioli & Manicardi 2001). V některých variantách rybích 5S rDNA byly nalezeny SINE odvozené pravděpodobně z genů pro transferové RNA (tRNA) (Merlo et al. 2012b). Z hlediska mechanismů možného vzniku asociace TEs a rDNA, mohlo kromě preferenční transpozice nebo ektopické rekombinace dojít eventuálně rovněž k přeskočení enzymu reverzní transkriptázy na jiný templát (tedy konkrétně z RNA retrotranspozónu na 5S rRNA; tzv. „template switching“) (Budzin 2004, Piskurek et al. 2009) nebo mohlo dojít k pročtení transkripce za oblast genu 5S rDNA do sousedních oblastí, kde se nějaké TEs mohou vyskytovat (Ciganda & Williams 2011, Piskurek et al. 2009). Nepochybně se jedná o velice zajímavé pole pro budoucí výzkum. Kromě přímé transpoziční aktivity mohou TEs působit jako „horká místa“ pro ektopickou rekombinaci, která vedle možnosti disperze můžou způsobit i přesun lokusu na jiný chromozóm, jeho inverzi anebo jeho úplné vymizení (delece), což může vést k polymorfizmům výše popsaným (Blanco et al. 2010a). Kandidátních TEs (kromě těch zmíněných výše) pro mapování na chromozómy rybích druhů s explozivním nárůstem lokusů rDNA nebo jiných tandemově uspořádaných genů, je celá řada – např. *Mariner/Tc1* a *Tc1*-like elementy z řady DTEs (Izsvák et al. 1995, Mandrioli 2000, da Silva et al. 2011), *Ty3*-Gypsy LTR RTE (Volf et al. 2001) nebo *Zebulon* (Dasilva et al. 2002, Fischer et al. 2004), *CiLINE2* (Oliveira et al. 2003), *Ron1* a *Ron2* (Oliveira et al. 1999) ze skupiny non-LTR RTEs. V neposlední řadě je možné využít údaje z aktuálních srovnávacích genomických studií (Huang et al. 2012, Chalopin et al. 2015a, Gao et al. 2016, Valente et al. 2016). Velice přínosné by mohly být i analýzy pomocí kvantitativní real-time PCR (qPCR), pro porovnání počtu kopií rDNA a asociovaného TE podobně jako to bylo provedeno u *Pokey* elementu a 28S rDNA u *Daphnia* sp. (LeRiche et al. 2014).

V některých případech, zejména u endemitů s malou efektivní populací, může amplifikace rDNA signalizovat stresem indukovanou re-aktivaci TEs (Symonová et al. 2013b, Pereira et al. 2014). Konkrétně v případě síha *C. fontanae* by za stresové podmínky mohla být zodpovědná malá dostupnost potravy v jezeře Stechlin, mající vliv i na menší velikost jedinců *C. albula* ve srovnání s populacemi z jiných jezer (Symonová et al. 2013b). Do jaké míry může aktivita TEs přispět k post-zygotické bariéře, o tom se vedou čilé debaty (Rebollo et al. 2010, Hua Van et al. 2011). Je možné, že u síhů v jezeře Stechlin (Symonová et al. 2013b) disperze rDNA ovlivnila rekombinační četnost a vedla k rapidní genomické divergenci, která urychlila ekologickou speciaci. Podobný efekt uvažují Cioffi et al. (2015) u populací *Channa striata* (Perciformes) a Pucci et al. (2014) u characídie (Characiformes). Určitá variabilita 45S rDNA spojená s výskytem většího počtu menších (a neaktivních)

klastrů byla pozorována rovněž síha severního *C. lavaretus* (Rossi & Gornung 2005) a již dříve byly pozorovány polymorfizmy v distribuci 45S rDNA v rámci jedné polské populace *C. albula* (Jankun et al. 2001). Podobně jako u *C. fontanae* nejsou ve studii Rossi & Gornung (2005) nadpočetné lokusy 45S rDNA asociované s GC-bohatými sekvencemi detekovatelnými Chromomycinem A<sub>3</sub>, které bývají jinak v oblasti hlavního ribozomálního klastru u ryb přítomny téměř vždy (Schmid & Guttenbach 1988). To by mohlo podpořit teorii, že byla přenesena pouze část klastru, právě způsobem transpozice. Je dále pozoruhodné, multiplikované pozice 45S rDNA byly dosud popsán u zhruba poloviny cytogeneticky analyzovaných lososovitých ryb (Śliwińska-Jewsiewicka et al. 2015 a citace zde uvedené). Krasnov et al. (2005) dále ukázali pomocí mikročipové analýzy, že transkripce *Tc1*-like elementu u pstruha duhového *O. mykiss* může být aktivována toxicitou, stresem nebo bakteriálními antigeny. U jiného sympatrického páru síhů (druhový komplex *C. clupeaformis*) bylo pozorováno 232-násobné navýšení aktivity TEs u malformovaných hybridů, což naznačuje, že TEs jsou klíčové komponenty mechanismu post-zygotické izolace (Dion-Côté et al. 2014). Tyto výsledky zapadají do kontextu našich pozorování u síhů a zároveň naznačují (spolu se Sember et al. 2015), že amplifikace 45S rDNA (včetně lokusů bez afinity k Chromomycinu A<sub>3</sub>) u některých sekavců čeledi Cobitidae (Rábová et al. 2001, 2004) mohla proběhnout rovněž mechanismem transpozice. Na druhou stranu, u některých jiných ryb, které podstoupily evoluční změny v extrémních podmínkách jako je například slepá jeskynní tetra mexická *Astyanax mexicanus* (žijící v úplné tmě), žádné zásadní deviace v distribuci rDNA nebo TEs či jiných repetitivních DNA nebyly dosud pozorovány (Kavalco et al. 2007). A to i přesto, že třetinu jejich genomu zaujímají TEs (McGaugh et al. 2014), jejichž role v regresní evoluci této ryby byla často zvažována (např. Lönning & Saedler 2002).

Z hlediska exprese je zdokumentováno, že i transponované kopie rDNA mohou být stále transkripčně aktivní (Drouin 1999). Není ale zdaleka výjimkou, že z některých kopií se stanou pseudogeny (které mohou být potom rovněž detekovány pomocí FISH spolu se standardními lokusy) (Affonso & Galetti 2005, Martins et al. 2006). Např. sekvence podobné IGS hlavního klastru rDNA byly nalezeny dispergované v genomu bobu obecného *Vicia faba* (Maggini et al. 1991). I pokud jsou znásobené kopie rDNA stále schopné transkripce za vzniku funkčního produktu, je velmi pravděpodobné, že mohou být následně permanentně blokovány (Vicari et al. 2008).

### 6.2.3 Možné funkční role disperze rDNA

Jaký je možný vliv variability na úrovni množství rDNA na eko-evoluční procesy u organismů? U kvasinek nadbytečné netranskribované kopie 45S rDNA podporují kohezi chromatid a při jejich ztrátě jsou dané buňky náchylnější k poškození DNA – tedy k větší senzitivitě na environmentální faktory/potenciální mutageny (Ide et al. 2010). Naopak, příliš velké množství transkribovaných rDNA je velmi náročné na spotřebovávání zdrojů fosforu (Weider et al. 2005). Variabilita délková a v počtu kopií může u některých organismů souviset s ekologickou adaptací na prostředí s malou koncentrací živin, může zde mít vliv opět dostupnost fosforu, který je důležitý pro biosyntézu nukleotidů (Weider et al. 2005). Recentně bylo demonstrováno (Jack et al. 2015), že modelová kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je schopná amplifikovat 45S rDNA v odpověď na zvýšenou dostupnost živin v okolním prostředí. Je za to zodpovědná signální dráha TOR (target of rapamycin), která dokáže v případě potřeby spustit rekombinační procesy vedoucí k řízené a rapidní změně v počtu kopií rDNA. Ukazuje se, že ač biosyntéza ribozómů může být zvýšená intenzivnější transkripcí 45S rDNA, dlouhodobě je to pro buňku nežádoucí stav (Ide et al. 2010). To vše může souviset s cílenou adaptací na konkrétní podmínky prostředí. V současné době přibývá prací, které přikládají místu syntézy pre-ribozómových částic (tedy jadérku) nové významy, např. v souvislosti s udržováním buněčné homeostáze a roli v buněčné odpovědi na stres (Boisvert et al. 2007, Deisenroth & Zhang 2010, Grummt 2013). Mimoto bylo dále zjištěno, že množství 5S rRNA má přímý vliv na regulaci esenciálního buněčného transkripčního faktoru p53 (Sloan et al. 2013). Zvýšený počet transkribovaných 45S nebo 5S RNA prekurzorových molekul by ale mohl mít i jiné vysvětlení – např. neefektivní úpravy na ko/posttranskripční úrovni. Je ale pravděpodobné, že akumulace velkého množství špatně zpracované nematurované rRNA by vedla k inhibici buněčného cyklu (Deisenroth & Zhang 2010). Pisano a Ghigliotti 2009 míní, že u některých antarktických ryb skupiny Notothenoidei může mít větší počet lokusů 45S rDNA adaptivní význam v teplotách pod bodem mrazu. Gibbons et al. (2014) naznačují, že u člověka je množství 45S rDNA korelováno s množstvím mitochondriální DNA a koncentrací určitých modifikátorů chromatinu, což může mít vliv na buněčnou homeostázi a na globální změny v genové expresi.

K hlubšímu porozumění významu přítomnosti nadbytečných lokusů rDNA by mohla přispět opět již zmiňovaná qPCR, ale pozoruhodná data již přinesly i jiné přístupy. Např. u štiky obecné *Esox lucius* byl recentně pomocí Southernova přenosu odhadnut abnormálně vysoký počet kopií 5S rDNA, což mimojiné odpovídá výsledkům metody FISH (34-36

signálů 5S rDNA v rámci  $2n=50$ ) a převážná většina těchto lokusů se zdá být metylována (Symonová R., osobní sdělení). Je možné, že extrémně vysoké množství 5S rDNA může hrát spíše nějakou strukturní roli v genomu. Z hlediska exprese ovšem dále zůstávají u 5S rRNA pootevřená vrátka různým představám, a to z toho důvodu, že se dosud neví přesná funkce této molekuly v rámci ribozómu (Ciganda & Williams 2011). Jednou ze záhad je přítomnost molekul 5S rRNA v mitochondriích, přestože různé další studie ukázaly, že mitochondriální ribozómy 5S rRNA neobsahují (Adams & Palmer 2003). Možné nápovědy by mohly přinést studie tkáňově-specifické exprese, tj. možný význam variant 5S rRNA, např. pro expresi v somatických buňkách a ve vajíčku (Barciszewska et al. 2000). V tomto ohledu se sluší ještě připomenout klasickou studii dokumentující amplifikaci rDNA v žabích oocytech (Brown & Dawid 1968).

Celá problematika se stává složitější, když si uvědomíme, že kromě rDNA byla pozorována disperze i dalších středně repetitivních genů, u ryb konkrétně u histonu H3 (Costa et al. 2014, 2016) a U1 snRNA (Garcia-Souto et al. 2015). Dále např. u kobytek jsou popsány případy disperze genů pro histon H3 na všech chromozómech v karyotypu (Bueno et al. 2013) Jestli zde existuje nějaký vztah k architektuře genomu nebo fyziologii organismu, na to v současnosti neexistují odpovědi. Je také možné, že amplifikované lokusy repetitivních genů jsou pouze doprovodným jevem aktuální zvýšené dynamiky genomu a že nadbytečné kopie postupně budou hromadit mutace a budou eliminovány, až se dospěje opět do stavu o standardním počtu klastrů dané multigenové rodiny (Martins et al. 2006).

#### **6.2.4. Telomery**

Telomery byly studovány u zástupců Cobitoidea. Vzhledem k malé velikosti chromozómů byla pro specifitější analýzu ITS použita metoda TSA-FISH (tyramid signal amplification FISH) využívající tyramidovou amplifikaci signálu (využívanou většinou pro detekci jednokopiových oblastí; např. Krylov et al. 2003, 2007, Carabajal Paladino et al. 2014) u Nemacheilidae (Sember et al. 2015) a metoda PNA-FISH (peptid nucleic acid FISH), kde je v sondě cukrfosfátová kostra nahrazena polyamidovou kostrou, která díky svému neutrálnímu náboji proniká lépe do chromozómu a vede tedy k citlivější detekci (jak dokazují i práce u ryb; Ocalewicz & Dobosz 2009, Ocalewicz et al. 2013) byla zase použita u sekavčí čeldi Botiidae (Tab. 1). Většina analyzovaných druhů mřenek (Sember et al. 2015) i sekavek (Tab. 1) vykazovala standardní vzor, s telomerickými signály v koncových částech chromozómů. U mřenek byly zaznamenány případy centrických fúzí se zachovanými rozsáhlými het-ITSs a rovněž případy, kdy se tyto sekvence v evidentních produktech fúze

nevyskytovaly (Sember et al. 2015). To potvrzuje dva konvergentní procesy centrických fúzí u zkoumaných zástupců, navíc mechanisticky se odlišujícími (Slijepčević 1998). Případy u ryb, na jejichž chromozómech v místech prokazatelným fúzí nebyly nalezeny ITS, jsou doloženy např. u lososovitých (Abuin et al. 1996, Jankun et al. 2007, Ocalewicz et al. 2008) aj. (např. Henning et al. 2011, Fernandes et al. 2015). Prokazatelné ITSs u produktů centrických nebo tandemových fúzí byly ale rovněž dokumentovány (Meyne et al. 1990, Sola et al. 2003, Caputo et al. 2009, Cioffi et al. 2010, 2011, Rosa et al. 2012, Bitencourt et al. 2014, Scacchetti et al. 2015a). V jednom případě byla u mřenek detekována ITS v potenciálním produktu tandemové fúze, nedá se však vyloučit možnost (ne)reciproké translokace (Schubert & Lysák 2011). Nicméně, u obou skupin byl pozorován zajímavý jev – asociace telomerických repetitivních sekvencí s rDNA. Tento jev byl v minulosti dokumentován u řady jiných ryb, např. u úhoře říčního *Anguilla anguilla* (Salvadori et al. 1995), pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss* (Abuin et al. 1996), u jehly zelenavé *Neropsis ophidion* (Libertini et al. 2006) a u třech druhů cípalů čeledi Mugilidae (Sola et al. 2007). Přestože byla tato asociace rovněž popsána i u jiných obratlovců (Meyne et al. 1990, Nanda et al. 2008), její původ není dosud zcela jasný. Tsujimoto et al. (1999) míní, že pokud se v okolí rDNA akumulují TEs, může to vést k fragilitě tohoto místa a tedy k náchylnosti ke zlomům. Pokud se tak stane, rDNA na konci chromozómů mohou stimulovat syntézu nových telomer telomerázou, což může vést i k tvorbě překrývajících se lokusů telomerických repetitivních sekvencí s rDNA. Hall & Parker (1995) naznačují, že 45S rDNA je potenciální substrát pro telomerázu, pakliže dojde uvnitř tohoto klastru ke zlomu (např. v rámci procesu centrického rozpadu). V některých případech 45S rDNA přímo nahrazuje funkci telomery (např. Pich et al. 1996, Gonzáles-García et al. 2006). Guillén et al. (2004) vyslovil hypotézu, že se telomerické repetice podílejí na regulaci exprese 45S rDNA přes mechanismus epigenetické inaktivace. Naše práce ale naznačuje, že tomu tak být nemusí, protože jediný detekovaný pár 45S rDNA u mřenky *N. ruppelli* musí být nepochybně aktivní, třebaže po celé délce kolovalizuje s telomerickou repetitivně sekvencí (Sember et al. 2015). U Botiidae se tato asociace vyskytuje pouze u diploidních zástupců, zatímco u tetraploidní sekavky tuto charakteristiku postrádají. Jedná se tedy o modifikaci, ke které došlo až po polyploidiní události.

### **6.2.5. Dynamika repetitivních sekvencí u polyploidů a hybridů**

GISH/CGH se ukázala být jako velmi přínosná metoda, která po nutné optimalizaci pro ryby (Symonová et al. 2015) splnila svůj účel v cytogenetické analýze síhů (Symonová



et al. 2013b), jeseterů (Symonová et al. 2013a) a také při analýze hybridů sekavců rodu *Cobitis* (Majtánová et al. 2016a) a detekci pohlavních chromozómů u tetry zvané *Triportheus signatus* (Yano et al., in rev.).

U uměle vyprodukovaných jeseteřích hybridů byly genomově-specifické repetitivní sekvence rodičovských druhů lokalizovány metodou CGH převážně na mikrochromozómech a některých malých makrochromozómech (Symonová et al. 2013a). Zdá se tedy, že unikátní a kódující sekvence jsou vysoce konzervované. Překvapivě, na rozdíl např. od ptáků (Burt 2002, Axelsson et al. 2005) mikrochromozómy jeseterů nejsou genově bohaté, naopak jsou vysoce heterochromatinizované, jak ukázala i metoda C-pruhování (Symonová et al. 2013a). V kontrastu s mikrochromozómy, sekvence na makrochromozómech mají evidentně o mnoho pomalejší evoluční dynamiku. Nemusí se ale nutně jednat jen o unikátní sekvence, jak naznačuje pomalý vývoj některých jeseteřích satDNA (Lanfredi et al. 2001, De la Herran et al. 2001). Dokonce je pozoruhodné, že karyotyp jeseterů zůstává velmi stabilní i po mnohonásobném pasážování buněčných kultur (Fontana 2015). Všechny tyto indicie naznačují, že schopnost jeseterů mezidruhově se křížit za vzniku fertilního potomstva může být asociována s pomalou evolucí vysoce konzervovaných sekvencí na makrochromozómech, zatímco výrazná dynamika spojená s repetitivními sekvencemi je omezena na mikrochromozómy. Různou dynamiku různých částí jeseteřích genomů naznačuje i recentní studie využívající WCP u *A. ruthenus* (Romaneno et al. 2015).

U Botiidae bylo konvenční karyotypovou analýzou a za podpory výsledků jiných metod zjištěno, že sekavka '*B.*' *zebra*, ač morfologicky velmi podobná druhu *L. guilinensis* zároveň molekulárně-fylogeneticky velmi blízká druhu *S. pulchra*, není mezidruhovým hybridem těchto dvou sympatrických sekavek (Bohlen et al., in rev.). Z cytogenetického úhlu pohledu je patrné, že '*B.*' *zebra* má tetraploidní počet chromozómů ( $2n = 100$ ) a nikoliv intermediární ( $2n=75$ ), jak by se dalo u hybridního jedince většinou očekávat. Tuto hypotézu do jisté míry potvrzují i recentní výsledky (Tab. 1, Fig. 9), protože ukazují, že fenotypy rDNA nejsou u '*B.*' *zebra* intermediární vzhledem k těm pozorovaným u *L. guilinensis* a *S. pulchra*, jak by se dalo v podobných případech očekávat (např. Zhang et al. 2015). Hlavním výsledkem studie Bohlen et al., (in rev.) je odhalení neobvyklého mimikry druhu '*B.*' *zebra* srovnatelného např. s pozorováním u druhů ryby *Corydoras* (Alexandrou et al. 2011). Na základě většiny analýz provedených v Bohlen et al., (in rev.) se dále zdá, že '*B.*' *zebra* je zástupcem rodu *Sinibotia*. Pro úplnost je v plánu ještě srovnání genomů uvedených sekavek pomocí metod GISH a CGH. Tato strategie měla přispět i k odhalení, zda-li u skupiny

Botiidae došlo k auto- nebo allopolyploidizaci. Nicméně podle výsledků publikovaných ve Šlechtová et al. (2006) a Doadrio & Perdices (2005) došlo k oddělení Leptobotiinae a Botiinae přibližně před 22 miliony let a např. u rostlin nebyla GISH/CGH úspěšná u allopolyploidů starších 5 milionů let (Lim et al. 2006, 2007). Důvodem je již pokročilý proces homogenizace a re-diploidizace genomu, při kterém již stačily proběhnout rozsáhlé strukturní genomové/chromozómové změny (Chester et al. 2010 a citace zde uvedené) a dříve genomově-specifické repetitivní sekvence již do značné míry mohly dosáhnout smíšené distribuce (Senchina et al. 2003, Lim et al. 2006, 2007). Vskutku, dosavadní aplikace CGH u jiných zástupců Botiidae přinesla kontroverzní výsledky (Sember A., nepublikovaná data). Určitý způsob, jak tuto strategii obejít, je použít pro odlišení dvou genomů sondy pro specifické centromerické RTEs (Liu et al. 2008) nebo satelitní DNA sekvence specifické pouze pro jeden parentální genom (Gill et al. 2009). To ale vyžaduje podrobnější sekvenční analýzy, zejména s využitím nové generace metody sekvenování („next generation sequencing“, NGS) a bioinformatiky (Chester et al. 2010). Jednou z mála zbývajících možností je sledování distribuce klastrů repetitivních genů. Pokud se u tetraploida bude daný klastrovat vyskytovat ve stejných pozicích na čtyřech velikostně i morfologicky stejných chromozómech, mohla by to být známka autopolyplodie.

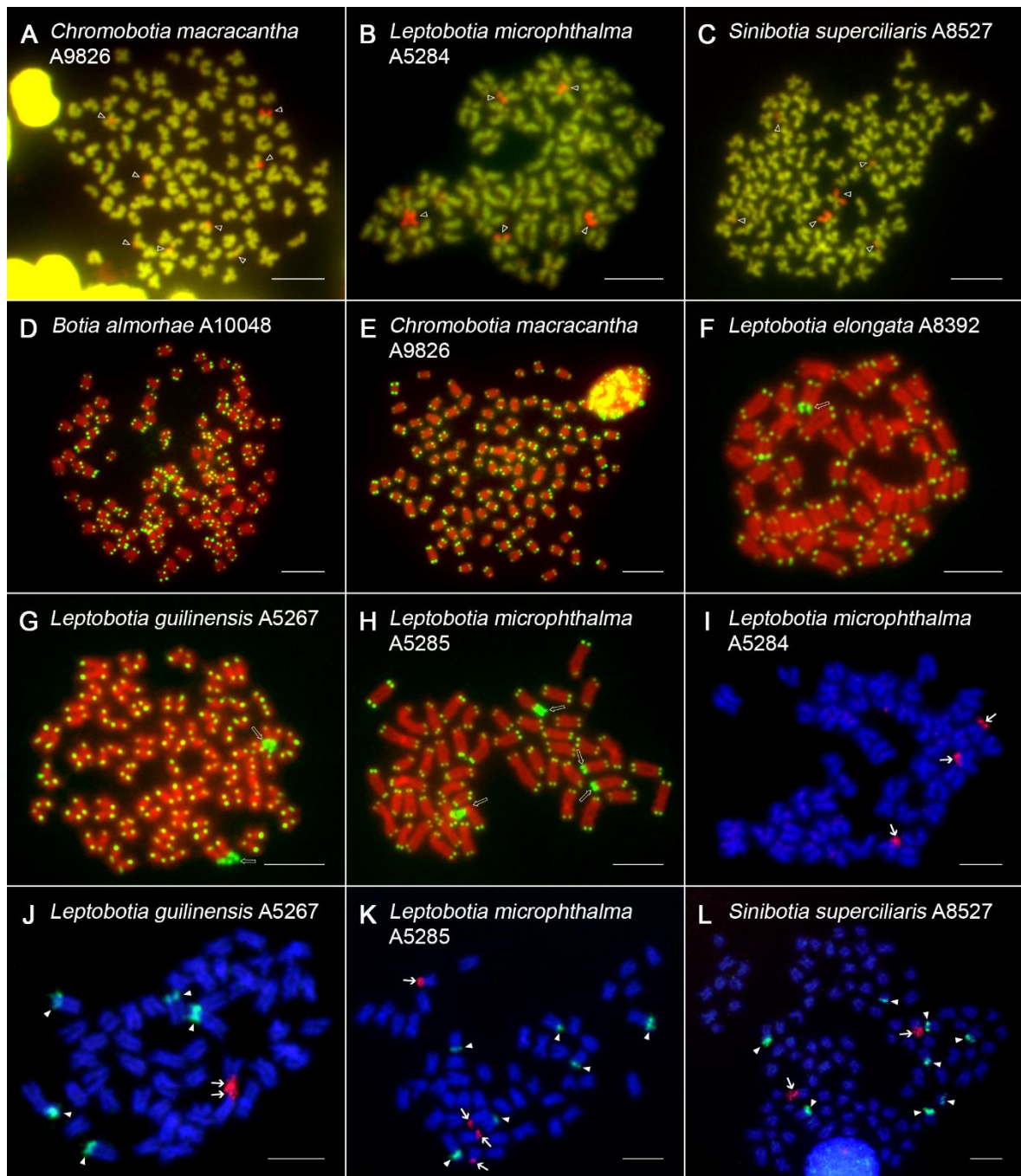
rDNA bývají i přes svoji variabilitu používány často ve srovnávacích studiích diploidních a polyploidních taxonů. Srovnávání fenotypů rDNA diploidů a polyploidů může být informativní, pokud je počet lokusů rDNA u polyploida aditivní a tedy nedošlo v rámci post-polyploidizačních událostí k eliminaci některých z nich. Pokud tomu tak je, může fenotyp rDNA naznačit povahu polyploidizační události nebo alespoň potvrdit stupeň ploidie (Zhu et al. 2006). U mezidruhových hybridů je obvykle sledován intermediární fenotyp (Zhang et al. 2015, Maneechot et al. 2016), ale v některých případech vlivem značného polymorfizmu není možné žádnou korelaci sledovat (Pereira et al. 2014). Starší polyploidii často vykazují re-diploidizované počty rDNA (Linares et al. 1996, Kovařík et al. 2008). V rámci velkého souboru publikovaných analýz mapování rDNA u diploidů vs. polyploidů se výsledky liší skupina od skupiny. Zcela nezávislé dynamické změny v rDNA fenotypech byly např. sledovány u rostlin čeledi Vellinae (Rossato et al. 2015). V jiných případech alespoň jeden klastrovat vyazuje aditivní počty lokusů vzhledem ke stupni ploidie (Mishima et al. 2002, Torrell et al. 2003, Pires et al. 2004, Nani et al. 2015), u ryb např. 5S rDNA u jelce *S. alburnoides* (Gromicho et al. 2006). Situaci mohou dále komplikovat sekundární chromozómové přestavby (např. Nani et al. 2015).

V rámci Cobitoidea je těžké dopředu určit, jakou vypovídací hodnotu budou mít klastry rDNA při posuzování mechanismu polyploidie, ale v tomto případě je nepochybně limitující stáří polyploidní události (viz výše), které mj. limituje i možnosti metod GISH/CGH. Na základě výzkumu u sesterských skupin jsou výsledky nejednoznačné. Zatímco u Nemacheilidae se zdá být 45S rDNA jako relativně konzervovaný marker se stabilním fenotypem rDNA (Sember et al. 2015), u Cobitidae byla pozorována značná variabilita a polymorfizmy (Boroń et al. 2006, Rábová et al. 2001, 2004). Z hlediska 5S rDNA je pozorovaný trend u těchto dvou skupin přesně opačný. Prozatímni výsledky rDNA FISH u Botiidae (Tab. 1, Obr. 9) zatím neumožňují odhadnout, zda-li sledujeme vzor odpovídající spíše autopolyploidii nebo allopolyploidii. Je taky možné, že rDNA nebude pro tyto účely vhodným markerem. S poněkud ukvapeným předpokladem, že Botiidae podstoupili autopolyploidizaci, přišli Kaewmad et al. (2014), čistě na základě konvenční analýzy karyotypů (a to pouze u tetraploidů) a srovnání recentní literatury (Arai 2011).

V našem případě plánujeme v blízké budoucnosti zařadit do studie další cytogenetické markery – zejména histon H1 (Obr. 9I) a např. U2 snRNA, která zatím vykazuje u studovaných ryb velmi konzervativní distribuci – u 16 z 23 rybích druhů z různých skupin nese U2 rDNA klastr jen jeden pár chromozómů (Úbeda-Manzanaro et al. 2010, Merlo et al. 2010, 2012a, b, 2013, Supiwong et al. 2013, Utsunomia et al. 2014, Silva et al. 2015). Příležitostně bude mapována poloha vybraných mikrosatelitů. Výhledově by bylo velmi prospěšné zařadit analýzu jednokopiových oblastí pomocí TSA- nebo BAC-FISH, za současného využití dat z dostupných sekvenovaných rybích genomů.

Druh	Počet jedinců	2n	Popis karyotypu	Chromomycin A3	FISH			
					(TTAGGG)n	28S rDNA	5S rDNA	histon H1
<i>Botia almorhae</i>	4	100	16m - 20sm - 64st-a	<b>3 - 4 signály</b> (terminální) - 1-2 velké sm, 2 malé st	žádné ITS		<b>4 signály</b> (terminální) - p-raménka sm podobné velikosti	
<i>Botia kubotai</i>	1	100		<b>2 signály</b> (terminální) - 2 velké sm				
<i>Botia striata</i>	2	100		<b>4 signály</b> (terminální) - 2 m, 2 st-a				
<i>Botia udomritthiruj</i>	2	100	22m - 28sm - 50st-a	<b>2 signály</b> (terminální) - 2 velké sm nebo 1 velký sm + 1 menší st nebo délkový polymorfismus			<b>8 signálů</b> (terminální) - 4 středně velké sm, 4 malé st-a;	
<i>Chromobotia macracantha</i>	1	100	18m - 10sm - 72st-a	<b>8 signálů</b> - 7 terminálních (st-a) a 1 pericentromerický (m)	žádné ITS			
<i>Leptobotia elongata</i>	2	50	6m - 12sm - 32st-a	<b>6 signálů</b> (terminální) - 2 velké sm, 2 středně velké sm, 2 malé st	<b>1-2 celoramenné het-ITSs</b> (p-raménka, sm)	<b>6 signálů</b> (2 sm + 4st)	<b>4 signály</b> (4 sm)	
<i>Leptobotia guilinensis</i>	5	50	6m - 12sm - 10st - 22a	<b>4 signály</b> (terminální) - 2 velké sm (polovina délky p-ramének), 2 středně velké st	<b>2 celoramenné het-ITSs</b> (p-raménka, sm)	<b>2 signály</b> (2 st)	<b>5 signálů</b> (2 velké sm, 3 menší st)	
<i>Leptobotia microphthalmalma</i>	2	50	6m - 14sm - 30st-a	<b>4-5 signálů</b> (terminální) - 2-3 velké sm (polovina délky p-ramének), 2 střední st	<b>4 celoramenné het-ITSs*</b> (p-raménka - 2sm + 2st)	<b>4 signály*</b> (2sm + 2st)	<b>6 signálů*</b> (2 velké sm, 4 malé st)	<b>3 signály</b> sm/st (p-raménka)
<i>Parabotia fasciata</i>	2	50	6m - 14sm - 30st-a	<b>2 signály</b> (terminální) - 2 velké sm (polovina délky p-ramének)	<b>2 celoramenné het-ITSs</b> (p-raménka, sm)			
<i>Sinibotia pulchra</i>	2	100	20m - 26sm - 28st - 26a	<b>5 signálů</b> (terminální) - 2 velké st, 2 středně velké st, 1 malý st	žádné ITS	<b>4 signály</b>	<b>8 signálů</b>	
<i>Sinibotia robusta</i>	1	100		<b>4 signály</b> (terminální) - 2 velké sm (polovina délky p-ramének), 2 středně velké st				
<i>Sinibotia superciliaris</i>	3	100	14m - 22sm - 64st-a	<b>6 signálů</b> (terminální) - 2 velké m-sm, 2 středně velké sm, 2 malé st		<b>2 signály</b> (2st)	<b>8 signálů</b> (2 velké sm, 2 střední sm, 2 malé sm, 2 st)	
<i>Sinibotia zebra**</i>	2	100	18m - 18sm - 36st - 28a	<b>2 signály</b> (terminální) - 2 sm (celá p-raménka)		<b>2 signály</b> (terminální) - 2 velké sm (polovina délky p-ramének)	<b>6 signálů</b> (terminální) - sm/st	

**Tab.1:** Předběžné výsledky studia karyotypu sekavek čeledi Botiidae za použití konvenčních a molekulárně cytogenetických technik. Pro popis morfologie chromozómů byla použita Levanova klasifikace (Levan et al. 1964), modifikována jako: m – metacentrický, sm – submetacentrický, st – subtelocentrický, a- akrocentrický chromozóm. \* metodou byl zatím analyzován pouze jedinec *L. microphthalmalma* vykazující 4 signály po aplikaci Chromomycinu A3. \*\* tento druh v textu veden jako '*Botia zebra*', je s velkou pravděpodobností zástupcem rodu *Sinibotia* (Bohlen et al., in rev.)



**Obr. 9:** Molekulární cytogenetika sekavek čeledi Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) – vybrané výsledky předběžných analýz. **A-C** Fluorescenční pruhování za použití Chromomycinu A<sub>3</sub> (zde červené signály, označeny prázdnými hroty šipek) a DAPI (zde zelený kanál); **D-H** PNA FISH s telomerickou sondou (Dako, Glostrup, Dánsko) – prázdné šipky ukazují na celoramenné het-ITSs; **I** FISH se sondou pro histon H1 (červené signály, označeny šipkami) – sonda byla připravena pomocí PCR s primery navrženými dříve pro *Astyanax* (Hashimoto et al. 2011); **J-L** dvoubarevná FISH se sondou pro 5S (zelené signály, označeny hroty šipek) a 28S (červené signály, označeny šipkami) rDNA provedená podle Sember et al. 2015. A, E) *Chromobotia macracantha*, B, H, I, K) *Leptobotia microphthalmalma*, C, L) *Sinibotia superciliaris*, D) *Botia almorhae*, F) *L. elongata*, G, J) *L. guiliniensis*. Metafáze C je nekompletní (2n = 98). Měřítko = 10 μm.

## 7. Závěr

Díky své neuvěřitelné genetické, genomické a fenotypové variabilitě jsou paprskoploutvé ryby atraktivním modelem pro studium molekulárních mechanismů v evoluci a speciaci (Volf 2005). Výsledky této dizertační práce demonstrují a podporují hypotézu, že ač karyotypy mnohých skupin kostnatých ryb vykazují často uniformitu  $2n$  (a někdy i  $NF$ ), variabilita – někdy až ohromná – se skrývá na sub-chromozómové úrovni. Podstatu této variability je možné asociovat s množstvím, distribucí a sekvenčním složením repetitivních sekvencí. Jevy spojené s dynamikou repetitivních sekvencí mohou stát v pozadí mechanismů spjatých s adaptací rybích druhů na různé podmínky prostředí a stresové faktory a mohou hrát roli ve speciaci a hybridizaci. U skupin zkoumaných v této práci jsme pozorovali sekvenční a distribuční variabilitu heterochromatinu, variabilitu v rDNA fenotypech, roli RTEs v disperzi rDNA a v některých případech rovněž neobvyklou distribuci telomerických repetitivních sekvencí. V případě jeseterů jako zkoumaných zástupců ryb mimo Teleostei se ukázala dynamika repetitivních sekvencí a její kompartmentalizace na mikrochromozómy jako jeden z možných klíčových procesů v pozadí přetrvávající fertility jeseteřích hybridů.

Dynamika genomu na obecné úrovni zůstává stále do značné míry zahalena rouškou tajemství (ENCODE Project Consortium 2004). Z jednotlivých kapitol vyplývá, že genom paprskoploutvých ryb je nesmírně dynamický a celá skupina tak představuje ideální model pro studium obecnějších principů souvisejících s jeho evolucí a s vlivem procesů na genomové úrovni na evoluci organismů, jejich diverzifikaci a adaptaci. Ústředním tématem této práce bylo zjistit, jakou úlohu v těchto procesech hrají repetitivní sekvence a polyploidizace. Důraz byl kladen na propojení cytogenetického přístupu s dalšími typy analýz, aby výsledek přinesl nové poznatky v širším kontextu a z širšího úhlu pohledu. Ač takové práce bývají vedle čistě popisných reportů méně časté, je to cesta, jakou by se cytogenetika měla ubírat, aby její vypovídací hodnota byla patřičně doceněna. I v době postgenomové si nepochybně v takovýchto studiích cytogenetika najde svoji niku (např. Dion-Côté et al. 2015) tak jako i v jiných odvětvích (Pasquier et al. 2015). Existují stále otázky spjaté s architekturou a evolucí genomu, na které nenajdeme odpovědi pouze celogenomovým sekvenováním (např. Dettai et al. 2007). Výsledky této práce mimo jiné odhalily nové modelové skupiny pro studium cytogenetické variability a otevřely nová témata pro výzkum. Získaná data budou důležitým podkladem pro další výzkum, který se např. týká analýzy polyploidie u sekavek čeledi Botiidae. Předběžné výsledky tohoto projektu jsou rovněž zahrnuty a diskutovány v této práci.

Tato práce ukazuje na přetrvávající a nepopíratelný význam cytogenetiky jako užitečného a informativního metodického přístupu při řešení celé řady biologických otázek.



Tato práce pak prezentuje širší aplikaci cytogenetických technik, nicméně plný potenciál metod moderní molekulární cytogenetiky zůstává nevyužit a bude předmětem budoucích projektů.

## 8. Seznam citované literatury

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, et al.** (2013): Hybridization and speciation. *J Evol Biol.* 26:229–246.
- Abrusan G, Krambeck HJ.** (2006): Competition may determine the diversity of transposable elements. *Theor Popul Biol.* 70:364–375.
- Abuín M, Clabby C, Martínez P, Goswami U, Flavin F, Wilkins NP, Houghton JA, et al.** (1996): A NOR-associated repetitive element present in the genome of two *Salmo* species (*Salmo salar* and *Salmo trutta*). *Genome.* 39:671–679.
- Adams KL, Palmer JD.** (2003): Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol.* 29:380–395.
- Affonso PRAM, Galetti PM Jr.** (2005): Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). *Genetica.* 123:227–233.
- Alexandrou MA, Oliveira C, Maillard M, McGill RA, Newton J, Creer S, Taylor MI, et al.** (2011): Competition and phylogeny determine community structure in Müllerian co-mimics. *Nature.* 469:84–88.
- Alföldi J, Di Palma F, Grabherr M, Williams C, Kong L, Mauceli E, Russell P, et al.** (2011): The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature.* 477:587–591.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F.** (2001): Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica.* 111: 91–100.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Daniel MF, Toledo-Filho SA.** (2000): Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). *Chromosoma.* 109: 197–200.
- Almeida-Toledo LF, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Bonillo C, Porto-Foresti F, Daniel-Silva MFZ.** (2002): Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Cytogenet Genome Res.* 97:229–233.
- Almeida-Toledo LF, Viegas-Pequignot E, Coutinho-Barbosa AC, Foresti F, Niveleau A, Almeida Toledo-Filho S.** (1998): Localization of 5-methylcytosine in metaphase chromosomes of diploid and triploid pacu fish, *Piaractus mesopotamicus* (Pisces, Characiformes). *Cytogenet Cell Genet.* 83:21–24.
- Allsopp, R.C., Chang, E., Kashefi-Azham, M., Rogaev, E., Piatyszek, M.A., Shay, J.W. et al.** (1995): Telomere shortening is associated with cell division *in vitro* and *in vivo*. *Exp Cell Res.* 220:194–200.
- Altmanová M, Rovatsos M, Kratochvíl L, Pokorná MJ.** (2016): Minute Y chromosomes and karyotype evolution in Madagascan iguanas (Squamata: Iguania: Opluridae). *Biol J Linn Soc.* doi:10.1111/bij.12751.
- Alves MJ, Coelho MM, Collares-Pereira MJ.** (2001): Evolution in action through hybridization and polyploid in an Iberian freshwater fish: a genetic review. *Genetica.* 111:375–385.
- Amaro R, Abuín M, Sánchez L.** (1996): Chromosomal evolution in salmonids: a comparison of Atlantic salmon, brown trout, and rainbow trout R-band chromosomes. *Genetica.* 98:297–302.
- Amemiya CT, Gold JR.** (1988): Chromosomal NORs as taxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes. *Genetica.* 76:81–90.
- Amemiya CT, Gold JR.** (1990): Cytogenetic studies in north american minnows (Cyprinidae): chromosomal NOR phenotypes of 12 species, with comments on cytosystematic relationships among 50 species. *Hereditas.* 112:231–247.

- Amemiya CT, Alföldi J, Lee AP, Fan S, Philippe H, MacCallum I, Braasch I, et al.** (2013): The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature*. 496:311–316.
- Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, et al.** (1998): Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution. *Science*. 282(5394):1711–1714.
- Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia J-m, Dehal P, Christoffels A, et al.** (2002): Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*. 297:1301–1310.
- Arai R.** (2011): Fish karyotypes: a check list. 1st edition. Springer, Tokyo, Japan. 340 pp.
- Arkhipova IR, Rodriguez F.** (2013): Genetic and epigenetic changes involving (retro)transposons in animal hybrids and polyploids. *Cytogenet Genome Res*. 140:295–311.
- Arnold ML, Bennett BD.** (1993): Natural hybridization in Louisiana Irises: genetic variation and ecological determinants. In: Harrison RG (editor): Hybrid Zones and the Evolutionary Process. Oxford University Press, New York. pp 115–139.
- Artoni RF, Bertollo LAC.** (2001): Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*. 134:201–210.
- Artoni RF, Bertollo LAC.** (2002): Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity*. 89:15–19.
- Artoni RF, Castro JP, Jacobina UP, Lima-Filho PA, Costa GWWF, Molina WF.** (2015): Inferring diversity and evolution in fish by means of integrative molecular cytogenetics. *Sci World J*. 2015:1–10.
- Ashley T, Ward DC.** (1993): A ‘hot spot’ of recombination coincides with an interstitial telomeric sequences in Armenian hamster. *Cytogenet Cell Genet*. 62:169–171.
- Averbeck KT, Eickbush TH.** (2005): Monitoring the mode and tempo of concerted evolution in the *Drosophila melanogaster* rDNA locus. *Genetics*. 171:1837–1846.
- Avise JC.** (2008): Clonality: the Genetics, Ecology, and Evolution of Sexual Abstinence in Vertebrate Animals, Oxford University Press, Oxford. 256 pp.
- Axelsson E, Webster MT, Smith NGC, Burt DW, Ellegren H.** (2005): Comparison of the chicken and turkey genomes reveals a higher rate of nucleotide divergence on microchromosomes than macrochromosomes. *Genome Res*. 15:120–125.
- Ayala FJ, Coluzzi M.** (2005): Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(Suppl):6535–6542.
- Azzalin CM, Nergadze SG, Giulotto E.** (2001): Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma*. 110:75–82.
- Azzalin CM, Reichenbach P, Khorialuli L, Giulotto E, Lingner J.** (2007): Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*. 318:798–801.
- Badaeva ED, Dedkova OS, Gay G, Pukhalskiy VA, Zelenin AV, Bernars S, Bernard M.** (2007): Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome*. 50:907–926.
- Baker RJ, Bickham JW.** (1986): Speciation by monobrachial centric fusions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:8245–8248.
- Barbosa P, de Oliveira LA, Pucci MB, Santos MH, Moreira-Filho O, Vicari MR, Nogaroto V, et al.** (2014): Identification and chromosome mapping of repetitive elements in the *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae) species complex. *Genetica*. 143:55–62.
- Barciszewska MZ, Szymanski M, Erdmann VA, Barciszewski J.** (2000): 5S Ribosomal RNA. *Biomacromolecules*. 2000:1.
- Bardhan A, Sharma T.** (2000): Meiosis and speciation: a study in a speciating *Mus terricolor* complex. *J Genet*. 79:105–11.
- Baumgärtner L, Paiz LM, Zawadski CH, Pavan MV, de Brito PCAL.** (2014): DNA in four populations of *Hypostomus strigaticeps* (Regan, 1907) from the Paraná River Basin, Brazil: evolutionary and environmental correlation. *Zebrafish*. 11:479–487.

- Beçak ML.** (2014): Review Polyploidy and epigenetic events in the evolution of Anura. *Genet Mol Res.* 13:5995–6014.
- Bellafronte E, Schemberger MO, Moreira-Filho O, Almeida MC, Artoni RF, Margarido VP, Vicari MR.** (2011): Chromosomal markers in Parodontidae: An analysis of new and reviewed data with phylogenetic inferences. *Rev Fish Biol Fish.* 21:559–570.
- Belyayev A.** (2014): Bursts of transposable elements as an evolutionary driving force. *J Evol Biol.* 27:2573–2584.
- Bemis WE, Findeis EK, Grande L.** (1997): An overview of Acipenseriformes. *Environ Biol Fishes.* 48:25–71.
- Benfey TJ.** (1989): A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. *Can Tech Rep Fish Aqua Sci.* 1682, 33 pp.
- Bento M, Tomás D, Viegas W, Silva M.** (2013): Retrotransposons represent the most labile fraction for genomic rearrangements in polyploid plant species. *Cytogenet Genome Res.* 140:286–294.
- Beridze T.** (1986): Satellite DNA. New York-Berlin, Springer-Verlag. 149 pp.
- Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, Jaunchich A, Bernard M, Noel B, Bento P, et al.** (2014): The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nat Commun.* 5:3657.
- Bernardi G.** (1993b): The Vertebrate Genome: Isochores and Evolution. *Mol Biol Evol.* 10:186–204.
- Bernardi G, Bernardi G.** (1990): Compositional patterns in the nuclear genome of cold-blooded vertebrates. *J Mol Evol.* 31:265–281.
- Bernardi G, Wiley EO, Mansour H, Miller MR, Orti G, Haussler D, O'Brien SJ, et al.** (2012): The fishes of Genome 10K. *Mar Genomics.* 7:3–6.
- Bernatchez L, Renaut S, Whiteley AR, Derome N, Jeukens J, Landry L, Lu G, et al.** (2010): On the origin of species: insights from the ecological genomics of lake whitefish. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365:1783–1800.
- Bertollo LAC.** (2007): Chromosome evolution in the Neotropical Erythrinidae fish family: an overview. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (editors): *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, pp 195–211.
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O.** (2000): A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosom Res.* 8:603–613.
- Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MC, Falcao JN, et al.** (2004): Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity.* 93:228–233.
- Bi K, Bogart JP.** (2006): Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic in situ hybridization (GISH). *Cytogenet Genome Res.* 112:307–312.
- Biémont C, Vieira C.** (2006): Junk DNA as an evolutionary force. *Nature.* 443:521–524.
- Bitencourt JA, Sampaio I, Ramos RTC, Affonso PRAM.** (2014): Chromosomal fusion in Brazilian populations of *Trinectes inscriptus* Gosse, 1851 (Pleuronectiformes; Achiridae) as revealed by internal telomere sequences (ITS). *J Exp Mar Bio Ecol.* 452:101–104.
- Birstein VJ, Hanner R, DeSalle R.** (1997): Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. In: Birstein VJ, Waldman JR, Bemis WE. Kluwer (editors): *Sturgeon Biodiversity and Conservation*. Academic Publishers; reprinted from *Environ Biol Fishes.* 48:127–155.
- Blackburn EH, Greider CW.** (1995): *Telomeres*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 565 pp.

- Blanco DR, Lui RL, Bertollo LAC, Margarido VP, Moreira-Filho O.** (2010a): Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): Evolutionary and biogeographic considerations. *Neotrop Ichthyol* 8:361–368.
- Blanco DR, Lui RL, Vicari MR, Bertollo LAC, Moreira-Filho O.** (2010b): Comparative cytogenetics of giant trahiras *Hoplias aimara* and *H. intermedius* (Characiformes, Erythrinidae): Chromosomal characteristics of minor and major ribosomal DNA and cross-species repetitive centromeric sequences mapping differ among morphologically identical karyotypes. *Cytogenet Genome Res.* 132:71–78.
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Artoni RF, de Almeida MC, Traldi JB, Margarido VP.** (2014): Origin of the  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetica.* 142:119–126.
- Blaxhall PC.** (1983): Chromosome karyotyping of fish using conventional and G-banding methods. *J Fish Biol.* 22:417–424.
- Bogart JP, Bi K.** (2013): Genetic and genomic interactions of animals with different ploidy levels. *Cytogenet Genome Res.* 140:117–136.
- Bohlen J, Ritterbusch D.** (2000): Which factors affect sex ratio of spined loach (genus *Cobitis*) in lake Müggelsee? *Environ Biol Fishes.* 59:347–352.
- Bohlen J, Ráb P.** (2001): Species and hybrid richness in spined loaches of the genus *Cobitis* (Teleostei: Cobitidae), with a checklist of European forms and suggestions for conservation. *J Fish Biol.* 59(Suppl A):75–89.
- Bohlen J, Šlechtová V.** (2009): Phylogenetic position of the fish genus *Ellopostoma* (Teleostei: Cypriniformes) using molecular genetic data. *Ichthyol Explor Freshw.* 20: 157-162.
- Bohlen J, Šlechtová V, Šlechta V, Šlechtová V, Sember A, Ráb P.** A ploidy difference represents an impassable barrier for hybridisation in animals. Is there an exception among botiid loaches (Teleostei: Botiidae)? *PLoS One*, in revision (druhé kolo).
- Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volf J-N** (2008): Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosom Res.* 16:203–215.
- Boisvert F-M, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI.** (2007): The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:574–585.
- Bolzán AD, Bianchi MS.** (2006): Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 612:189–214.
- Born GG, Bertollo LAC.** (2000): An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosom Res.* 8:111–8.
- Boroń A, Ozouf-Costaz C, Coutanceau J-P, Woroniecka K.** (2006): Gene mapping of 28S and 5S rDNA sites in the spined loach *Cobitis taenia* (Pisces, Cobitidae) from a diploid population and a diploid-tetraploid population. *Genetica.* 128:71–79.
- Braasch I, Postlethwait JH.** (2012): Polyploidy in fish and the teleost genome duplication. In: Soltis PS, Soltis DE (editors): *Polyploidy and Genome Evolution*. Springer, Berlin. pp 341–383.
- Braasch I, Peterson SM, Desvignes T, McCluskey BM, Batzel P, Postlethwait JH.** (2015): A new model army: emerging fish models to study the genomics of vertebrate evo-devo. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol.* 324:316–341.
- Britten RJ, Kohne DE.** (1968): Repeated sequences in DNA. *Science.* 161:529–540.
- Britton-Davidian J, Cazaux B, Catalan J.** (2012): Chromosomal dynamics of nucleolar organizer regions (NORs) in the house mouse: micro-evolutionary insights. *Heredity.* 108:68–74.
- Brochmann C, Brysting AK, Alsos IG, Borgen L, Grundt HH, Scheen A-C, Elven R.** (2004): Polyploidy in arctic plants. In: Leitch AR, Soltis DE, Soltis PS, Litch IJ, Pires JC (editors): *Biological relevance of polyploidy: ecology to genomics.* *Biol J Linn Soc.* 82:521–536.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC.** (2013): Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *PLoS One.* 8: e66532.

- Bueno V, Moresco RM, Konerat JT, Moreira-Filho O, Margarido VP.** (2016): Instability of multiple sex chromosomes systems in fish: The case of *Erythrinus erythrinus* (Bloch & Schneider, 1801) (Characiformes, Erythrinidae). *Zebrafish*. 13(1):26–32.
- Bueno V, Venere PC, Konerat JT, Zawadski CH, Vicari MR, Margarido VP.** 2014): Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary tendencies in the genus. *Sci World J*. doi: 10.1155/2014/943825.
- Burt DW.** (2002): Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenet Genome Res*. 96:97–112.
- Butlin RK.** (2005): Recombination and speciation. *Mol Ecol*. 14:2621–2635.
- Buzdin, AA.** (2004): Retroelements and formation of chimeric retrogenes. *Cell Mol Life Sci*. 61:2046–2059.
- Cabral-de-Mello D, Martins C.** (2010): Breaking down the genome organization and karyotype differentiation through the epifluorescence microscope lens: insects and fish as models. In: Méndez-Vilas A, Díaz J (editors): *Formatex Microscopy*, Formatex. Research Center, Badajoz, Spain. pp 658-669.
- Cabral-De-Mello DC, Valente GT, Nakajima RT, Martins C.** (2012): Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. *Chromosom Res*. 20:279–292.
- Cabrero J, Camacho JPM.** (2008): Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. *Chromosom Res*. 16:595–607.
- Calado LL, Cioffi MB, Jacobina UP, Molina WF.** (2014): Evolutionary dynamics of rDNA genes on chromosomes of the Eucinostomus fishes: cytotaxonomic and karyoevolutive implications. *Genetics and Molecular Research*. 13: 9951–9959.
- Camacho JPM.** (2005): B chromosomes. In: Gregory TR (editor): *The Evolution of the Genome*. San Diego, Elsevier. pp 224– 286.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW.** (2000): B-chromosome evolution. *Phil Trans R S Lond*. 55:163–178.
- Campo D, García-Vázquez E, Danzmann R.** (2012): Evolution in the block: common elements of 5S rDNA organization and evolutionary patterns in distant fish genera. *Genome*. 55:33–44.
- Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA.** (2007): High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104: 5300–5305.
- Caputo V, Giovannotti M, Nisi Cerioni P, Splendiani A, Olmo E.** (2009): Chromosomal study of native and hatchery trouts from Italy (*Salmo trutta* complex, Salmonidae): conventional and FISH analysis. *Cytogenet Genome Res*. 124:51–62.
- Caputo V, Marchegiani F, Sorice M, Olmo E.** (1997): Heterochromatin heterogeneity and chromosome variability in four species of gobiid fishes (Perciformes: Gobiidae). *Cytogenet Cell Genet*. 79:266–271.
- Capy P, Gasperi G, Biémont C, Bazin C.** (2000): Stress and transposable elements: Co-evolution or useful parasites? *Heredity*. 85:101–106.
- Carabajal Paladino LZ, Nguyen P, Šíchová J, Marec F.** (2014): Mapping of single-copy genes by TSA-FISH in the codling moth, *Cydia pomonella*. *BMC Genet*. 15(Suppl 2):S15.
- Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM.** (2009): NOR dispersion, telomeric sequence detection in centromeric regions and meiotic multivalent configurations in species of the *Aplastodiscus albofrenatus* group (Anura, Hylidae). *Cytogenet Genome Res*. 126:359–367.
- Carvalho RA, Martins-Santos IC, Dias AL.** (2008): B chromosomes: an update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *J Fish Biol*. 72:1907–1932.
- Casacuberta E, González J.** (2013): The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Mol Ecol*. 22:1503–1517.
- Castro J, Rodríguez S, Pardo BG, Sánchez L, Martínez P.** (2001): Population analysis of an unusual NOR-site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity*. 86:291–303.

- Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJP, Britton-Davidian J.** (2011): Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol.* 11:124.
- Centofante L, Bertollo LAC and Moreira-Filho O.** (2002): A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia.* 55:139–150.
- Ciganda M, Williams N.** (2011): Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2:523–533.
- Cioffi MB, Bertollo LAC.** (2012): Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: Garrido-Ramos MA (editor): Repetitive DNA. Genome Dyn 7. Basel, Karger, pp 197–221.
- Cioffi MB, Bertollo LAC.** (2010): Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity.* 105:554–561.
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC.** (2009a): Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genet.* 10:34.
- Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC.** (2009b): Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenet Genome Res.* 125:132–141.
- Cioffi MB, Bertollo LAC, Villa MA, de Oliveira EA, Tanomtong A, Yano CF, Supiwong W, et al.** (2015): Genomic organization of repetitive DNA elements and its implications for the chromosomal evolution of channid fishes (Actinopterygii, Perciformes). *PLoS One.* 10:e0130199.
- Cioffi MB, Camacho JPM, Bertollo LAC.** (2011a): Repetitive DNAs and differentiation of sex chromosomes in neotropical fishes. *Cytogenet Genome Res.* 132:188–194.
- Cioffi MB, Kejnovský E, Bertollo LAC.** (2011b): The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 132:289–296.
- Cioffi MB, Kejnovský E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D, Bertollo LAC.** (2012a): The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Mol Cytogenet.* 5:28.
- Cioffi MB, Liehr T, Trifonov V, Molina WF, Bertollo LAC.** (2013): Independent sex chromosome evolution in lower vertebrates: A molecular cytogenetic overview in the Erythrinidae fish family. *Cytogenet Genome Res.* 141:186–194.
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC.** (2010a): Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol Biol.* 10:271.
- Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC.** (2010b): Differentiation of the XY sex chromosomes in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. *Sex Dev.* 4:176–185.
- Cioffi MB, Molina WF, Artoni RF, Bertollo LAC.** (2012b): Chromosomes as tools for discovering biodiversity – the case of Erythrinidae fish family. In: Tirunilai P (editor): Recent Trends in Cytogenetic Studies – Methodologies and Applications. InTech Publisher, Rijeka, pp 125–146.
- Cioffi MB, Molina WF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC.** (2011c): Chromosomal distribution of repetitive DNA sequences highlights the independent differentiation of multiple sex chromosomes in two closely related fish species. *Cytogenet Genome Res.* 134:295–302.
- Cioffi MB, Moreira-Filho O, Almeida-Toledo LF, Bertollo LAC.** (2012c): The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *J Fish Biol.* 80:2125–2139.



- Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC.** (2011e): Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamiliar Erythrinidae fishes. *BMC Evol Biol.* 11:186.
- Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC.** (2011d): Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species. *Genetica.* 139:1065–1072.
- Cocca E, Petraccioli A, Morescalchi MA, Odierna G, Capriglione T.** (2015): Laser microdissection-based analysis of the Y sex chromosome of the Antarctic fish *Chionodracon hamatus* (Notothenioidei, Channichthyidae). *Comp Cytogenet.* 9:1–15.
- Colihueque N, Iturra P, Estay F, Diaz NF.** (2001): Diploid chromosome number variations and sex chromosome polymorphism in five cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 198:63–77.
- Comai L.** (2005): The advantages and disadvantages of being polyploidy. *Nat Rev Genet.* 6: 836–846.
- Collares-Pereira MJ, Ráb P.** (1999): NOR polymorphism in the Iberian species *Chondrostoma lusitanicum* (Pisces: Cyprinidae) – re-examination by FISH. *Genetica.* 105:301–303.
- Collares-Pereira MJ, Matos I, Morgado-Santos M, Coelho MM.** (2013): Natural pathways towards polyploidy in animals: the *Squalius alburnoides* fish complex as a model system to study genome size and genome reorganization in polyploids. *Cytogenet Genome Res.* 140:97–116.
- Costa GWWF, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF.** (2013): Transposable elements in fish chromosomes: a study in the marine *Cobia* species. *Cytogenet Genome Res.* 141:126–132.
- Costa GWWF, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF.** (2014): Unusual dispersion of histone repeats on the whole chromosomal complement and their colocalization with ribosomal genes in *Rachycentron canadum* (Rachycentridae, Perciformes). *Cytogenet Genome Res.* 144:62–67.
- Costa GWWF, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF.** (2015): Structurally complex organization of repetitive DNAs in the genome of *Cobia* (*Rachycentron canadum*). *Zebrafish.* doi: 10.1089/zeb.2014.1077
- Costa GWWF, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF.** (2016): The Evolutionary Dynamics of Ribosomal Genes, Histone H3, and Transposable *Rex* Elements in the Genome of Atlantic Snappers. *J Hered.* doi: 10.1093/jhered/esv136.
- Coyne JA, Meyers W, Crittenden AP, Sniegowski P.** (1993): The fertility effects of pericentric inversions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 134:487–496.
- Coyne JA, Orr AH.** (2004): Behavioral and nonecological isolation. *Speciation.* 211–213.
- Cox MP, Dong T, Shen GG, Davli Y, Scott DB, Ganley ARD.** (2014): An interspecific fungal hybrid reveals cross-kingdom rules for allopolyploid gene expression patterns. *PLoS Genet.* 10: e1004180.
- Crow KD, Wagner GP.** (2006): What is the role of genome duplication in the evolution of complexity and diversity? *Mol Biol Evol.* 23:887–892.
- Crow KD, Smith CD, Cheng JF, Wagner GP, Amemiya CT.** (2012): An independent genome duplication inferred from *Hox* paralogs in the American paddlefish—a representative basal ray-finned fish and important comparative reference. *Genome Biol Evol.* 4:937–953.
- Cui JX, Ren XH, Yu QX.** (1991): Nuclear DNA content variation in fishes. *Cytologia.* 56:425–429.
- Cuypers TD, Hogeweg P.** (2014): A synergism between adaptive effects and evolvability drives whole genome duplication to fixation. *PLoS Comput Biol.* 10:e1003547.
- Dalziel AC, Martin N, Laporte M, Guderley H, Bernatchez L.** (2015): Adaptation and acclimation of aerobic exercise physiology in Lake Whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis*). *Evolution.* 69:2167–2186.
- Daniel SN, Penitente M, Silva DMZA, Hashimoto DT, Ferreira DC, Foresti F, Porto-Foresti F.** (2015b): Organization and chromosomal distribution of histone genes and transposable

- Rex elements in the genome of *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res.* 146:311–318.
- Dasilva C, Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O, Weissenbach J, Roest Crollius H.** (2002): Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:13636–13641.
- Da Silva CRM, Quintas CC, Vanzela ALL.** (2010): Distribution of 45S and 5S rDNA sites in 23 species of *Eleocharis* (Cyperaceae). *Genetica.* 138:951–957.
- Da Silva M, Matoso DA, Vicari MR, de Almeida MC, Margarido VP, Artoni RF.** (2011): Physical mapping of 5S rDNA in two species of knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguayensis* (Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res.* 134:303–307.
- Datson PM, Murray BG.** (2006): Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosom Res.* 14:845–857.
- David L, Blum S, Feldman MW, Lavi U, Hillel J.** (2003): Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Mol Biol Evol.* 20:1425–1434.
- Dawley RM, Bogart JP.** (1989): Evolution and ecology of unisexual vertebrates. University of the State of New York, State Education Department, New York State Museum, Albany, New York, Museum Bulletin 466. 302 pp.
- De Barros AV, Szczepanski TS, Cabrero J, Camacho JPM, Vicari MR, Artoni RF.** (2011): Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. *Aquaculture.* 322-323:47–50.
- Deiana AM, Cau A, Salvadori S, Coluccia E, Cannas R, Milia A, Tagliavini J.** (2000): Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Perciformes, Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome. *Chromosome Res.* 8:213–218.
- Deisenroth C, Zhang Y.** (2010): Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene.* 29:4253–4260.
- De La Herrán R, Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, Rossi R, Rejón R.** (2001): Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. *Mol Biol Evol.* 18:432–436.
- De Lange T.** (2005): Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 19:2100–2110.
- Delprat A, Negre B, Puig M, Ruiz A.** (2009): The transposon *Galileo* generates natural chromosomal inversions in *Drosophila* by ectopic recombination. *PLoS One.* 4:e7883.
- De Lucchini S, Nardi I, Barsacchi G, Bastistoni R, Andronico F.** (1993): Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S+28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome.* 36:762–773.
- De Oliveira RR, Feldberg E, dos Anjos MB, Zuanon J.** (2008): Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub> and Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>/Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica.* 134:243–249.
- Dettai A, Bouneau L, Fischer C, Schultheis C, Schmidt C, Zhou Q, Coutanceau J-P, et al.** (2007): FISH analysis of fish transposable elements: tracking down mobile DNA in teleost genomes. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (editors): Fish Cytogenetics. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. pp 361–383.
- Devlin RH, Nagahama Y.** (2002): Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture.* 208:191–364.
- Diniz D, Moreira-Filho O, Bertollo LAC.** (2008): Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae). *Genetica.* 133:85–91.

- Dion-Côté A-M, Renaut S, Normandeau E, Bernatchez L.** (2014): RNA-seq reveals transcriptomic shock involving transposable elements reactivation in hybrids of young lake whitefish species. *Mol Biol Evol.* 31:1188–1199.
- Dion-Côté A-M, Symonová R, Ráb P, Bernatchez L.** (2015): Reproductive isolation in a nascent species pair is associated with aneuploidy in hybrid offspring. *Proc R Soc B.* 282:20142862.
- Doadrio I, Perdices A.** (2005): Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (*Cobitis*, cobitidae) based on cytochrome *b* sequence data. *Mol Phylogen Evol.* 37:484–493.
- Dobigny G, Ozouf-Costaz C, Bonillo C, Volobouev V.** (2003): Evolution of rRNA gene clusters and telomeric repeats during explosive genome repatterning in *Taterillus X* (Rodentia, Gerbillinae). *Cytogenet Genome Res.* 103:94–103.
- Dobigny G, Ducroz J-F, Robinson TJ, Volobouev V.** (2004): Cytogenetics and cladistics. *Syst Biol.* 53:470–484.
- Doolittle WF, Sapienza C.** (1980): Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature.* 284:601–603.
- Dover GA.** (1986): Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. *Genetics.* 122: 249–252.
- Drouin G.** (2000): Expressed retrotransposed 5S rRNA genes in the mouse and rat genomes. *Genome.* 43:213–215.
- Drouin G, de Sá MM.** (1995): The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol.* 12:481–493.
- Drozd B, Flajšhans M, Rab P.** (2010): Sympatric occurrence of triploid, intermediate aneuploid and tetraploid weatherfish *Misgurnus fossilis* (Cypriniformes, Cobitidae). *J Fish Biol.* 77: 2163–2170.
- Dubcovský J, Dvořák J.** (1995): Ribosomal RNA multigene loci: Nomads of the triticeae genomes. *Genetics.* 140:1367–1377.
- Duchemin W, Dupont P-Y, Campbell MA, Ganley ARD, Cox MP.** (2015): HyLiTE: accurate and flexible analysis of gene expression in hybrid and allopolyploid species. *BMC Bioinformatics.* 16:14–17.
- Dumas D, Catalan J, Britton-Davidian J.** (2015): Reduced recombination patterns in Robertsonian hybrids between chromosomal races of the house mouse: chiasma analyses. *Heredity.* 114:56–64.
- Ehrlich J, Sankoff D, Nadeau JH.** (1997): Synteny conservation and chromosome rearrangements during mammalian evolution. *Genetics.* 147:189–296.
- Eickbush TH, Eickbush DG.** (2007): Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics.* 175:477–485.
- Ellegren H.** (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 5:435–445.
- Elmore LW, Norris MW, Sircar S, Bright AT, McChesney PA, Winn RN, Holt SE.** (2008): Upregulation of telomerase function during tissue regeneration. *Exp Biol Med.* 233: 958–967.
- ENCODE Project Consortium.** (2004): The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) project. *Science.* 306:636–640.
- Ene AC.** (2003): Chromosomal polymorphism in the goby *Neogobius eurycephalus* (Perciformes: Gobiidae). *Mar Biol.* 142:583–588.
- Escobar JS, Glémin S, Galtier N.** (2011): GC-biased gene conversion impacts ribosomal DNA evolution in vertebrates, angiosperms, and other eukaryotes. *Mol Biol Evol.* 28:2561–2575.
- Eschmeyer WN, Fricke R, van der Laan R.** (2016): Catalog of fishes: genera, species. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Accessed 25.2.2016.
- Esmaili HR, Pirvar Z, Ebrahimi M, Geiger MF.** (2015): Karyological and molecular analysis of three endemic loaches (Actinopterygii: Cobitoidea) from Kor River basin, Iran. *Mol Biol Res Commun.* 4:1–13.

- Ezaz T, Valenzuela N, Grützner F, Miura I, Georges A, Burke RL, Graves JAM.** (2006): An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. *Chromosom Res.* 14:139–150.
- Ezaz T, Quinn AE, Miura I, Sarre SD, Georges A, Graves JAM.**(2005): The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosom Res.* 13:763–776.
- Fantinatti BEA, Mazzuchelli J, Valente GT, Cabral-de-Mello DC, Martins C.** (2011): Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica.* 139:1273–1282.
- Faria R, Navarro A.** (2010): Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol Evol.* 25:660–669.
- Favarato RM, Silva M, de Oliveira RR, Matoso D.** (2016): Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish.* doi:10.1089/zeb.2015.1140.
- Feder JL, Nosil P.** (2009): Chromosomal inversions and species differences: when are genes affecting adaptive divergence and reproductive isolation expected to reside within inversions? *Evolution.* 63: 3061–3075.
- Ferguson-Smith MA.** (2015): History and evolution of cytogenetics. *Mol Cytogenet.* 8:1–8.
- Fernandes CA, Alves DS, Guterres Z da R, Martins-Santos IC.** (2015): Cytogenetic analysis of two locariid species (Teleostei, Siluriformes) from Iguatemi River (Parana River drainage) in Brazil. *Comp Cytogenet.* 9:67–78.
- Ferreira IA, Martins C.** (2008): Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron.* 39:411–418.
- Ferreira IA, Bertollo LAC, Martins C.** (2007): Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* “species complex.”. *Cytogenet Genome Res.* 118:78–83.
- Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F.** (2011a): Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in three fish species in the subfamily hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res.* 132:64–70.
- Ferreira DC, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F.** (2011b): Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mob Genet Elements.* 1:112–117.
- Ferris SD, Whitt GS.** (1980): Genetic variability in species with extensive gene duplication: the tetraploid catostomid fishes. *Am Nat.* 115:650–666.
- Ferro DA, Néó DM, Moreira-Filho O, Bertollo LAC.** (2001): Nucleolar organizing regions, 18S and 5S RDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): Populations distribution and functional diversity. *Genetica.* 110:55–62.
- Feschotte C, Pritham EJ.** (2007): DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet.* 41:331–368.
- Fischer C, Bouneau L, Coutanceau J-P, Weissenbach J, Volff J-N, Ozouf-Costaz C.** (2004) Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene.* 336:175–183.
- Flajšhans M, Ráb P, Linhart O.** (2013): Polyploidie a genomové manipulace u ryb. In: Genetika a šlechtění ryb. Martin Flajšhans (editor). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. pp. 151–196.
- Fontana F.** (1994): Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces). *Genome.* 37:888–892.
- Fontana F.** (2015): Primary cell lines. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF (editors): Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts). CRC Press, Inc., Enfield, USA. pp 49-57.
- Fontana F.** (2016): Geneweb: <http://sveb.unife.it/it/ricerca-1/laboratori/geneweb>. Accessed 18.2.2016.

- Fontana F, Lanfredi M, Chicca M, Aiello V, Rossi R.** (1998a): Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> in four sturgeon species. *Chromosom Res.* 6:303–306.
- Fontana F, Tagliavini J, Congiu L, Lanfredi M, Chicca M, Laurente C, Rossi R.** (1998b): Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso*, by multiple staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization. *Mar Biol.* 132:495–501.
- Fontana F, Tagliavini J, Congiu L.** (2001): Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives. *Genetica.* 111:359–373.
- Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, Chicca M, Rossi R.** (2003): Chromosomal mapping of 18S–28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent *in situ* hybridization in six sturgeon species. *Genome.* 46:473–477.
- Fontana F, Bruch RM, Binkowski FP, Lanfredi M, Chicca M, Beltrami N, Congiu L.** (2004): Karyotype characterization of the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens* (Rafinesque 1817) by chromosome banding and fluorescent *in situ* hybridization. *Genome.* 47:742–746.
- Fontana F, Zane L, Pepe A, Congiu L.** (2007): Polyploidy in Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. *In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG* (editors): *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, Enfield. pp 385–403.
- Fontdevila A.** (2005): Hybrid genome evolution by transposition. *Cytogenet Genome Res.* 110:49–55.
- Fortes GG, Bouza C, Viñas A, Martínez P, Sánchez L.** (2007): Diversity in isochore structure and chromosome banding in fish. *In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG* (editors): *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, Enfield. pp 405–420.
- Froese R, Pauly D.** (2016): FishBase. world wide web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (01/2016). Accessed 7.3.2016.
- Froschauer A, Braasch I, Volff J-N.** (2006): Fish genomes, comparative genomics and vertebrate evolution. *Current Genomics.* 7:43–57.
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Yoshida MC.** (1998): Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chromosom Res.* 6:463–471.
- Furutani-Seiki M, Wittbrodt J.** (2004): Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech Dev.* 121:629–637.
- Gaffaroglu M, Karasu M, Unal S.** (2012): Karyotype of river loach *Turcinoemacheilus kosswigi* Bănărescu and Nalbant, 1964 (Cypriniformes, Balitoridae) from the Euphrates river, Turkey. *J Agric Sci Technol.* 14:821–826.
- Gallagher DS, Womack JE.** (1992): Chromosome conservation in the Bovidae. *J Hered.* 83:287–298.
- Gallardo MH, Bickham JW, Honeycutt RL, Ojeda RA, Köher N.** (1999): Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature.* 401:341.
- Gallardo MH, Kausel G, Jiménez A, Bacquet C, González C, Figueora J, Köher N, et al.** (2004): Whole-genome duplications in South American desert rodents (Octodontidae). *Biol J Linn Soc.* 82:443–451.
- Galetti Jr PM, Aguilar CT, Molina WF.** (2000): An overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia.* 420:55–62.
- Gao B, Shen D, Xue S, Chen C, Cui H, Song C.** (2016): The contribution of transposable elements to size variations between four teleost genomes. *Mob DNA.* 7:4.
- Gao Y, Wang SY, Luo J, Murphy RW, Du R, Wu S-F, Zhu C-L.** (2012): Quaternary palaeoenvironmental oscillations drove the evolution of the eurasian *Carassius auratus* complex (cypriniformes, cyprinidae). *J Biogeogr.* 39:2264–2278.
- Garagna S, Broccoli D, Redi CA, Searle JB, Cooke HJ, Capanna E.** (1995): Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. *Chromosoma.* 103:685–692.

- Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Capanna E, Redi CA.** (2001): Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:171–175.
- Garcia S, Garnatje T, Hidalgo O, McArthur ED, Siljak-Yakovlev S, Valles J.** (2007): Extensive ribosomal DNA (18S-5.8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. *Plant Syst Evol*. 267:79–92.
- García-Cegarra A, Merlo MA, Ponce M, Portela-Bens S, Cross I, Manchado M, Rebordinos L.** (2013): A preliminary genetic map in *Solea senegalensis* (Pleuronectiformes, Soleidae) using bac-fish and next-generation sequencing. *Cytogenet Genome Res*. 141:227–240.
- García-Souto D, Troncoso T, Pérez M, Pasantes JJ.** (2015): Molecular cytogenetic analysis of the European hake *Merluccius merluccius* (Merlucciidae, Gadiformes): U1 and U2 snRNA gene clusters map to the same location. *PLoS One*. 10:e0146150.
- Garrido-Ramos MA, de la Herrán R, Rejón CR, Rejón CR.** (1998): A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenet Cell Genet*. 83:3–9.
- Gerbi SA, Borovjagin AV, Lange TS.** (2003): The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr Opin Cell Biol*. 15:318–325.
- Getlekha N, Molina WF, de Bello Cioffi M, Yano CF, Maneechot N, Bertollo LAC, et al.** (2016): Repetitive DNAs highlight the role of chromosomal fusions in the karyotype evolution of *Dascyllus* species (Pomacentridae, Perciformes). *Genetica*. doi: 10.1007/s10709-016-9890-5.
- Ghigliotti L, Cheng CHC, Bonillo C, Coutanceau J-P, Pisano E.** (2013): *In situ* gene mapping of two genes supports independent evolution of sex chromosomes in cold-adapted antarctic fish. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2013/243938.
- Gibbons JG, Branco AT, Yu S, Lemos B.** (2014): Ribosomal DNA copy number is coupled with gene expression variation and mitochondrial abundance in humans. *Nat Commun*. 5:4850.
- Gill N, Findley S, Walling JG, Hans C, Ma JX, Doyle J, Stacey G, et al.** (2009): Molecular and chromosomal evidence for allopolyploidy in soybean. *Plant Physiol*. 151:1167–1174.
- Giles V, Thode G, Alvarez MC.** (1985): A new Robertsonian fusion in the multiple chromosome polymorphism of a mediterranean population of *Gobius paganellus* (Gobiidae, Perciformes). *Heredity*. 55:255–260.
- Go Y, Rakotoarisoa G, Kawamoto Y, Randrianjafy A, Koyama N, Hirai H.** (2000): PRINS analysis of the telomeric sequence in seven lemurs. *Chromosom Res*. 8:57–65.
- Gold JR, Li CZ, Shipley NS, Powers PK.** (1990): Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *J Fish Biol*. 37:563–575.
- Gonzalez-Garcia M, Gonzalez-Sanchez M, Puertas MJ.** (2006): The high variability of subtelomeric heterochromatin and connections between nonhomologous chromosomes, suggest frequent ectopic recombination in rye meiocytes. *Cytogenet Genome Res*. 115:179–185.
- Goodier JL, Davidson WS.** (1998): characterization of novel minisatellite repeat loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their phylogenetic distribution. *J Mol Evol*. 46:245–255.
- Gornung E.** (2013): Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: a review of research. *Cytogenet Genome Res*. 141:90–102.
- Gornung E, Mannarelli ME, Rossi AR, Sola L.** (2004): Chromosomal evolution in Mugilidae (Pisces, Mugiliformes): FISH mapping of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric repeat in the six Mediterranean mullets. *Hereditas*. 140:158–159.
- Graphodatsky AS, Yang F, O'Brien PCM, Perelman P, Milne BS, Serdukova N, Kawada SI, et al.** (2001): Phylogenetic implications of the 38 putative ancestral chromosome segments for four canids species. *Cytogenet. Cell Genet*. 92:243–247.
- Green DM, Sessions SK.** (2007): Karyology and cytogenetics, *In*: Heatwole H, Tyler M (editors): *Amphibian Biology*, Vol 7. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton. Pp 2758–2842.



- Gregory TR.** (2016): Animal genome size database. <http://www.genomesize.com>. Accessed 16.1.2016.
- Grewal SIS, Jia S.** (2007): Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet.* 8:35–46.
- Gromicho M, Collares-Pereira MJ.** (2007): The evolutionary role of hybridization and polyploidy in an Iberian cyprinid fish - a cytogenetic review. *In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (editors): Fish Cytogenetics.* Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. pp 41–67.
- Gromicho M, Coutanceau J-P, Ozouf-Costaz C, Collares-Pereira MJ.** (2006): Contrast between extensive variation of 28S rDNA and stability of 5S rDNA and telomeric repeats in the diploid-polyploid *Squalius alburnoides* complex and in its maternal ancestor *Squalius pyrenaicus* (Teleostei, Cyprinidae). *Chromosome Res.* 14:297–306.
- Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Martins C, Feldberg E.** (2010): Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *J Fish Biol.* 76:1117–1127.
- Grummt I.** (2013): The nucleolus-guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma.* 122:487–497.
- Guerrero RF, Kirkpatrick M.** (2014): Local adaptation and the evolution of chromosome fusions. *Evolution.* 68:2747–2756.
- Guillén AKZ, Hirai Y, Tanoue T, Hirai H.** (2004): Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees. *Chromosom Res.* 12:225–237.
- Haaf T, Schmid M.** (1984): An early stage of ZZ/ZW sex chromosomes differentiation in *Poecilia sphenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma.* 89:37–41.
- Hall KJ, Parker JS.** (1995): Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosom Res.* 3:417–422.
- Hardie DC, Hebert PD.** (2004): Genome-size evolution in fishes. *Can J Fish Aquat Sci.* 61:1636–1646.
- Han FP, Fedak G, Benabdelmouna A, Armstrong K, Ouellet T.** (2003): Characterization of six wheat x *Thinopyrum intermedium* derivatives by GISH, RFLP, and multicolor GISH. *Genome.* 46:490–495.
- Han F, Liu B, Fedak G, Liu Z.** (2004): Genomic constitution and variation in five partial amphiploids of wheat-*Thinopyrum intermedium* as revealed by GISH, multicolor GISH and seed storage protein analysis. *Theor Appl Genet.* 109:1070–1076.
- Hanson RE, Islam-Faridi MN, Percival EA, Crane CF, Ji Y, McKnight TD, Stelly DM, Price HJ.** (1996): Distribution of 5S and 18S–28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma.* 105:55–61.
- Hartl DL, Ruvolo M.** (2012): Genetics: Analysis of genes and genomes. 8<sup>th</sup> edition. Jones and Bartlett Publishers, London, UK.
- Hartmann N, Scherthan H.** (2004): Characterization of ancestral chromosome fusion points in the Indian muntjac deer. *Chromosoma.* 112:213–220.
- Harvey SC, Boonphakdee C, Campos-Ramos R, Ezaz MT, Griffin DK, Bromage NR, Penman DJ.** (2003): Analysis of repetitive DNA sequences in the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*. *Cytogenet Genome Res.* 101:314–319.
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Foresti F, Porto-Foresti F.** (2011): Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet Genome Res.* 134:64–71.
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Prado FD, Foresti F, Porto-Foresti F.** (2013): Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Cytogenet Genome Res.* 139:102–106.
- Hatanaka T, Galetti PM Jr.** (2004): Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica.* 122:239–244.

- Hatanaka T, Henrique-Silva F, Galetti PM Jr.** (2002): A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenet Genome Res.* 98:308–310.
- Hauffe HC, Searle JB.** (1998): Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from Northern Italy. *Genetics.* 150:1143–1154.
- Hauffe HC, Giménez MD, Searle JB.** (2012). Chromosomal hybrid zones in the house mouse. *In:* Macholán M, Baird SJE, Munchlinger P, Piálek J (editors): *Evolution of the House Mouse.* Cambridge University Press. pp 407–430.
- Havelka M (2013):** Molekulární aspekty mezidruhové hybridizace jeseterovitých ryb ve vztahu k polyploidii a *in situ* konzervaci. Dizertační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Havelka M, Bytyutskyy D, Symonová R, Ráb P, Flajšhans M.** (2016): The second highest chromosome count among vertebrates is observed in cultured sturgeon and is associated with genome plasticity. *Genet Sel Evol.* 48:12.
- Havelka M, Hulák M, Ráb P, Rábová M, Lieckfeldt A, Rodina M, Gela D, et al.** (2014): Fertility of a spontaneous hexaploid male Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *BMC Genet.* 15:5.
- Havelka M, Kašpar V, Hulák M, Flajšhans M.** (2011): Sturgeon genetics and cytogenetics: a review related to ploidy levels and interspecific hybridization. *Folia Zool.* 60:93–103.
- He W, Qin Q, Liu S, Li T, Wang J, Xiao J, Xie L, et al.** (2012): Organization and variation analysis of 5S rDNA in different ploidy-level hybrids of red crucian carp ?? topmouth culter. *PLoS One.* 7:27–37.
- Heliot L, Kaplan H, Lucas L, Klein C, Beorchia A, Doco-Fenzy M, Menager M, et al.** (1997): Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. *Mol Biol Cell.* 8:2199–2216.
- Henikoff S, Ahmad K, Malik HS.** (2001): The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science.* 293:1098–1102.
- Henning F, Moysés CB, Calcagnotto D, Meyer A, Almeida-Toledo LF.** (2011): Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*). *Heredity* (Edinb). 106:391–400.
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF.** (2008): Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res.* 121:55–58.
- Hett AK, Nirchio M, Oliveira C, Siccha ZR, Rossi AR, Sola L.** (2011): Karyotype characterization of *Mugil incilis* Hancock, 1830 (Mugiliformes: Mugilidae), including a description of an unusual co-localization of major and minor ribosomal genes in the family. *Neotrop Ichthyol.* 9:107–112.
- Highett MI, Beven AF, Shaw PJ.** (1993): Localization of 5S genes and transcripts in *Pisum sativum* nuclei. *J Cell Sci.* 105:1151–1158.
- Hillis DM, Dixon MT.** (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol.* 66:411–453.
- Hinegardner R.** (1968): Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. *American Naturalist.* 102:517–523.
- Hinegardner, R, Rosen DE.** (1972): Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *American Naturalist.* 106:621–644.
- Hirai H, Taguchi T, Godwin AK.** (1999): Genomic differentiation of 18S ribosomal DNA and beta-satellite DNA in the hominoid and its evolutionary aspects. *Chromosom Res.* 7:531–540.
- Hirai Y, Yamamoto M-T, Taylor RW, Imai HT.** (1996): Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma.* 105:190–196.
- Hoegg S, Brinkmann H, Taylor JS, Meyer A.** (2004): Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J Mol Evol.* 59:190–203.

- Hoffmann AA, Rieseberg LH.** (2008): Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 39:21–42.
- Hoffmann AA, Sgrò CM, Weeks AR.** (2004): Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. *Trends Ecol Evol.* 19:482–488.
- Howell WM, Black DA.** (1980): Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 36:1014.
- Hua-Van A, Le Rouzic A, Boutin TS, Filée J, Capy P.** (2011): The struggle for life of the genome's selfish architects. *Biol Direct.* 6:19.
- Huang X, Bi K, Lu W, Wang S, Zhang L, Bao Z.** (2015): Genomic *in situ* hybridization identifies parental chromosomes in hybrid scallop (*Bivalvia*, Pectinoida, Pectinidae) between female *Chlamys farreri* and male *Argopecten irradians irradians*. *Comp Cytogenet.* 9:189–200.
- Huang CRL, Burns KH, Boeke JD.** (2012): Active transposition in genomes. *Annu Rev Genet.* 46:651–675.
- Hudson AG, Vonlanthen P, Seehausen O.** (2011): Rapid parallel adaptive radiations from a single hybridogenetic ancestral population. *P Roy Soc B Biol.* 278:58–66.
- Hurley IA, Mueller RL, Dunn KA, Schmidt EJ, Friedman M, Ho RK, Prince VE, et al.** (2007): A new time-scale for ray-finned fish evolution. *Proc R Soc B Biol Sci.* 274:489–498.
- Chalopin D, Naville M, Plard F, Galiana D, Volff J-N.** (2015a): Comparative analysis of transposable elements highlights mobilome diversity and evolution in vertebrates. *Genome Biol Evol.* 7:567–580.
- Chalopin D, Volff J-N, Galiana D, Anderson JL, Scharl M.** (2015b): Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. *Chromosom Res.* doi: 10.1007/s10577-015-9490-8
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W.** (1994): The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature.* 371:215–220.
- Chaves R, Frönicke L, Guedes-Pinto H, Wienberg J.** (2004): Multidirectional chromosome painting between the Hirola antelope (*Damaliscus hunteri*, Alcelaphini, Bovidae), sheep and human. *Chromosom Res.* 12:495–503.
- Chen S, Zhang G, Shao C, Huang Q, Liu G, Zhang P, Song W, et al.** (2014): Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nat Genet.* 46:253–260.
- Chenuil A, Galtier N, Berrebi P.** (1999): A test of the hypothesis of an autopolyploid vs. allopolyploid origin for a tetraploid lineage: application to the genus *Barbus* (Cyprinidae). *Heredity.* 82: 373–380.
- Chester M, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE.** (2010): Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). *Genes* (Basel) 1:166–192.
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM.** (2006): Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture.* 255:1–29.
- Chmátal L, Gabriel SI, Mitsainas GP, Martínez-Vargas J, Ventura J, Searle JB, Schultz RM, et al.** (2014): Centromere strength provides the cell biological basis for meiotic drive and karyotype evolution in mice. *Curr Biol.* 24:2295–2300.
- Choleva L, Janko K.** (2013): Rise and persistence of animal polyploidy: evolutionary constraints and potential. *Cytogenet Genome Res.* 140:151–170.
- Choleva L, Janko K, De Gelas K, Bohlen J, Šlechtová V, Rábová M, Ráb P.** (2012): Synthesis of clonality and polyploidy in vertebrate animals by hybridization between two sexual species. *Evolution.* 66:2191–2203.
- Christoffels A, Koh EGL, Chia J-m, Brenner S, Aparicio S, Venkatesh B.** (2004): Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol Biol Evol.* 21:1146–1151.

- Ide S, Miyazaki T, Maki H, Kobayashi T.** (2010): Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science*. 327:693–696.
- Inoue JG, Donoghue PCJ, Yang Z.** (2010): Impact of the representation of fossil calibrations on Bayesian estimation of species divergence times. *Systematic Biology*. 59:74–89.
- Inoue JG, Miya M, Venkatesh B, Nishida M.** (2005): The mitochondrial genome of Indonesian coelacanth *Latimeria menadoensis* (Sarcopterygii: Coelacanthiformes) and divergence time estimation between the two coelacanths. *Gene*. 349: 227–235.
- Izsvák Z, Ivics Z, Hackett PB.** (1995): Characterization of a *Tc1*-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Gen Genet*. 247:312–322.
- Jack CV, Cruz C, Hull RM, Keller MA, Ralser M, Houseley J.** (2015): Regulation of ribosomal DNA amplification by the TOR pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 112:201505015.
- Jacobina UP, Vicari MR, Martinez PA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF.** (2013): Atlantic moonfishes: Independent pathways of karyotypic and morphological differentiation. *Helgol Mar Res*. 67:499–506.
- Jaillon O, Aury J-M, Brunet F, Petit J-L, Stange-Thomas N, Mauceli E, Bouneau L, et al.** (2004): Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*. 431:946–957.
- Jaillon O, Aury JM, Wincker P.** (2009): ‘Changing by doubling’, the impact of whole genome duplications in the evolution of eukaryotes. *C R Biol*. 332: 241–253.
- Jakovlić I, Gui JF** (2011): Recent invasion and low level of divergence between diploid and triploid forms of *Carassius auratus* complex in Croatia. *Genetica*. 139:789–804.
- Jakubczak JL, Burke WD, Eickbush TH.** (1991): Retrotransposable elements *R1* and *R2* interrupt the rRNA genes of most insects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:3295–3299.
- Jang TS, Weiss-Schneeweiss H.** (2015): Formamide-free genomic in situ hybridization allows unambiguous discrimination of highly similar parental genomes in diploid hybrids and allopolyploids. *Cytogenet Genome Res*. doi: 10.1159/000441210.
- Janko K, Flajšhans M, Choleva L, Bohlen J, Šelchtová V, Rábová M, Lajbner Z, et al.** (2007): Diversity of European spined loaches (genus *Cobitis* L.): An update of the geographic distribution of the *Cobitis taenia* hybrid complex with a description of new molecular tools for species and hybrid determination. *J Fish Biol*. 71:387–408.
- Jankun M.** (2000): Standard karyotype of sea trout (*Salmo trutta* morpha *trutta*) based on replication banding patterns. *Cytobios*. 103:79–89.
- Jankun M.** (2004): Fish chromosomes – current status of knowledge. *Animal Science Papers and Reports*. 22(Suppl 2):49–56.
- Jankun M, Klinger M, Woznicki P.** (1995): Chromosome variability in European vendace (*Coregonus albula* L.) from Poland. *Caryologia*. 48:165–172.
- Jankun M, Martinez P, Pardo BG, Kirtiklis L, Ráb P, Rábová M, Sanchez L.** (2001): Ribosomal genes in coregonid fishes (*Coregonus lavaretus*, *C. albula* and *C. peled*) (Salmonidae): single and multiple nucleolus organizer regions. *Heredity* (Edinb). 87:672–679.
- Jankun M, Ocalewicz K, Woznicki P.** (1998): Replication, C- and fluorescent chromosome banding patterns in European whitefish, *Coregonus lavaretus* L. *Hereditas*. 128:195–199.
- Jankun M, Ráb P, Vuorinen J.** (1991): A karyotype study of vendace, *Coregonus albula* (Pisces, Coregoninae). *Hereditas*. 115:291–294.
- Jankun M, Woznicki P, Ocalewicz K, Furgala-Selezniow G.** (2007): Chromosomal evolution in the three species of Holarctic fish of the genus *Coregonus* (Salmoniformes). *Advances in Limnology*. 60:25–37.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** (1985): Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature*. 314:67–73.
- Jiang J, Gill BS.** (1994): Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the diphyletic origin of polyploid wheats. *Chromosom Res*. 2:59–64.

- Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, Chanderbali AS, Landherr L, Ralph PE, Tomsho LP, et al.** (2011): Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*. 473: 97–100.
- John B.** (1981): Chromosome change and evolutionary change: a critique. In: Atchley W, Woodruff D (editors): Evolution and Speciation. Essays in Honor of MJD White. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp 23–51.
- Jorge LC, Moreira-Filho O.** (2004): Nucleolar organizer regions as markers of chromosomal polymorphism in *Apareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia*. 57:195–199.
- Jurka J, Kapitonov VV, Kohany O, Jurka MV.** (2007): Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 8: 241–259.
- Jurka J, Kapitonov VV, Pavlíček A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J.** (2005): Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res*. 110:462–467.
- Kaewmad P, Monthatong M, Supiwong W, Saowakoon S, Tanomtong A.** (2014): Natural autotetraploid and chromosomal characteristics in the subfamily Botiinae (Cypriniformes, Cobitinae) from Northeast Thailand. *Cytologia (Tokyo)*. 79:299–313.
- Kalendar R, Tanskanen J, Chang W, Antonius K, Sela H, Peleg O, Schulman AH.** (2008): *Cassandra* retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:5833–5838.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D.** (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 258:818–821.
- Kallman KD.** (1984): A new look at sex determination in poeciliid fishes, In: Turner BJ (editor): Evolutionary Genetics of Fishes. Plenum Publishing, New York. pp 95–171.
- Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, Fujita M, et al.** (2012): A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genet*. 8:e1002798.
- Kato A, Vega JM, Han F, Lamb JC, Bircher JA.** (2005): Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Curr Opin Plant Biol*. 8:148–154.
- Kavalco KF, Almeida-Toledo LF.** (2007): Molecular cytogenetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish*. 4:103–111.
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O.** (2005): Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity (Edinb)*. 94:180–186.
- Kawakami T, Butlin RK, Cooper SJB.** (2011): Chromosomal speciation revisited: modes of diversification in Australian morabine grasshoppers (*Vandiemena*, *viatica* species group). *Insects*. 2:49–61.
- Kejnovský E, Hobza R, Čermák T, Kubát Z, Vyskot B.** (2009): The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity*. 102:533–541.
- Kejnovský E, Michalovová M, Šteflová P, Kejnovská I, Manzano S, Hobza R, Kubát Z.** (2013): Expansion of microsatellites on evolutionary young Y chromosome. *PLoS One*. 8(1): e45519.
- Kidwell MG.** (2002): Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*. 115:49–63.
- Kidwell MG, Lisch D.** (1997): Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:7704–7711.
- King M.** (1993): Species Evolution: The Role of Chromosome Change. Cambridge, University Press. 360 pp.
- Kirkpatrick M, Barton N.** (2006): Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics*. 173:419–434.
- Kirtiklis L, Porycka K, Boroń A, Coutanceau J-P, Dettai A.** (2010): Use of chromosomal collocation of the minor 5S and the major 28S rDNA as a cytogenetic marker within the genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae). *Folia Biol*. 58:245–249.
- Kitano J, Ross JA, Mori S, Kume M, Jones FC, Chan YF, Absher DM.** (2009): A role for a neo-sex chromosome in stickleback speciation. *Nature*. 461:1079–1083.

- Kitano J, Peichel CL.** (2012): Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. *Environ Biol Fishes*. 94:549–558.
- Knytl M, Kalous L, Symonová R, Rylková K, Ráb P.** (2013a): Chromosome studies of european cyprinid fishes: Cross-species painting reveals natural allotetraploid origin of a *Carassius* female with 206 chromosomes. *Cytogenet Genome Res*. 139:276–283.
- Knytl M, Kalous L, Ráb P.** (2013b): Karyotype and chromosome banding of endangered crucian carp, *carassius carassius* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Cyprinidae). *Comp Cytogenet*. 7:205–215.
- Kobayashi Y, Nagahama Y, Nakamura M.** (2012): Diversity and plasticity of sex determination and differentiation in fishes. *Sex Dev*. 7:115–125.
- Koga A, Sakaizumi M, Hori H.** (2002): Transposable elements in medaka fish. *Zoolog Sci*. 19:1–6.
- Kohn M, Högell J, Vogel W, Minich P, Kehrer-Swatzki H, Graves JAM, Hameister H.** (2006): Reconstruction of a 450-My-old ancestral vertebrate protokaryotype. *Trends Genet*. 22:203–10.
- Kocher TD.** (2004): Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nat Rev Genet*. 5:288–298.
- Koop BF, Davidson WS.** (2008): Genomics and the genome duplication in salmonids. *Fish Global Welf Environ*. 77–86.
- Kondo M, Nanda I, Hornung U, Schmid M, Schartl M.** (2004): Evolutionary origin of the medaka Y chromosome. *Curr Biol*. 14:1664–1669.
- Kottelat M.** (2012): Conspectus Cobitidum: an inventory of loaches of the world (Teleostei: Cypriniformes: Cobitoidei). *Raffles Bull Zool*. 26(Suppl):1–199.
- Koubová M, Pokorná MJ, Rovatsos M, Farkáčová K, Altmanová M, Kratochvíl L.** (2014): Sex determination in Madagascar geckos of the genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae): are differentiated sex chromosomes indeed so evolutionary stable? *Chromosom Res*. 22:441–452.
- Kovařík A, Dadejová M, Lim YK, Chase MW, Clarkson JJ, Knapp S, Leitch AR.** (2008): Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: A potential link between rDNA homogenization and epigenetics. *Ann Bot*. 101:815–823.
- Krasikova A, Daks A, Zlotina A, Gaginskaya E.** (2009) Polymorphic heterochromatic segments in japanese quail microchromosomes. *Cytogenet Genome Res*. 126:148–155.
- Krasnov A, Koskinen H, Afanasyev S, Mölsä H.** (2005): Transcribed *Tc1*-like transposons in salmonid fish. *BMC Genomics*. 6:107.
- Krylov V, Mácha J, Tlapáková T, Takáč M, Jonák J.** (2003): The *c-src1* gene visualized by in situ hybridization on *Xenopus laevis* chromosomes. *Cytogenet Genome Res*. 103:169–172.
- Krylov V, Tlapakova T, Mácha J.** (2007): Localization of the single copy gene *Mdh2* on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA. *Cytogenet Genome Res*. 116:110–112.
- Kubát Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovský E.** (2008): Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome*. 51:350–356
- Kubičková S, Černohorská H, Musilová P, Rubeš J.** (2002): The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromom Res*. 10:571–577.
- Kumar R, Sahoo PK, Vishwanath W, Barat A.** (2014): Karyotype of a new loach *Schistura obliquofascia* and a mahseer *Puntius chelynoides* from Kumaun Hills of Himalaya. *Cytologia*. 79:243–246.
- Kusunoki T, Arai K, Suzuki R.** (1994): Production of viable gynogens without chromosome duplication in the spinous loach *Cobitis biwae*. *Aquaculture*. 119:11–23.
- Lamatsch DK, Stöck M.** (2009): Sperm-dependent parthenogenesis and hybridogenesis in teleost fishes. In: Schön, I, Martens, K., van Dijk, P (editors): *Lost Sex. The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*. Springer. pp 399 – 432.



- Lampert KP, Lamatsch DK, Epplen JT, Scharl M.** (2005): Evidence for a monophyletic origin of triploid clones of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Evolution*. 59:881–889.
- Lan T, Albert VA.** (2011): Dynamic distribution patterns of ribosomal DNA and chromosomal evolution in *Paphiopedilum*, a lady's slipper orchid. *BMC Plant Biol*. 11:126.
- Landry L, Bernatchez L.** (2010): Role of epibenthic resource opportunities in the parallel evolution of lake whitefish species pairs (*Coregonus* sp.). *J Evol Biol*. 23:2602–2613.
- Lanfredi M, Congiu L, Garrido-Ramos M, de la Herrán R, Leis M, Chicca M, Rossi R, et al.** (2001): Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosom Res*. 9:47–52.
- Laporte M, Rogers SM, Dion-Côté A-M, Normandeau E, Gagnaire P-A, Dalziel AC, Chebib J, Bernatchez L.** (2015): RAD-QTL mapping reveals both genome-level parallelism and different genetic architecture underlying the evolution of body shape in Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) species pairs. *G3 (Bethesda)*. 5:1481–1491.
- Larhammar DC, Risinger C.** (1994): Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol Phylogenet Evol*. 3:59–68.
- Laudicina A, Mühlmann MC.** (2015): Fish chromosome microdissection and its utilization in the synthesis of fluorescence *in situ* hybridization probes. *In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF (editors): Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts)*. CRC Press, Inc., Enfield, USA. pp. 132 – 143.
- Layat E, Probst AV, Tourmente S.** (2013): Structure, function and regulation of transcription factor IIIA: from *Xenopus* to *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta*. 1829:274–282.
- Lee GM, Wright JE.** (1981): Mitotic and meiotic analyses of brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J Hered*. 72:321–327.
- Leggatt RA, Iwama GK.** (2003): Occurrence of polyploidy in the fishes. *Rev Fish Biol Fish*. 13:237–246.
- Lercher MJ, Urrutia AO, Hurst LD.** (2002): Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. *Nat Genet*. 31:180–183.
- LeRiche K, Eagle SHC, Crease TJ.** (2014): Copy number of the transposon, Pokey, in rDNA is positively correlated with rDNA copy number in *Daphnia obtusa*. *PLoS One*. 9:e114773.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA.** (1964): Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52:201–220.
- Lewin HA, Larkin DM, Pontius J, O'Brien SJ.** (2009): Every genome sequence needs a good map. *Genome Res*. 19:1925–1928.
- Li J, Phillips RB, Harwood AS, Koop BF, Davidson WS.** (2011): Identification of the sex chromosomes of brown trout (*Salmo trutta*) and their comparison with the corresponding chromosomes in atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet Genome Res*. 133:25–33.
- Li X-Y, Zhang X-J, Li Z, Hong W, Liu W, Zhang J, Gui J-F.** (2014): Evolutionary history of two divergent Dmrt1 genes reveals two rounds of polyploidy origins in gibel carp. *Mol Cytogenet Evol*. 78:86–104.
- Libertini A, Vitturi R, Lannino A, Maone MC, Franzoi P, Riccato F, Colomba S.** (2006): FISH mapping of 18S rDNA and (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in two pipefish species (Gasterosteiformes: Syngnathidae). *J Genet*. 85:153–156.
- Lim KY, Kovařík A, Matyášek R, Chase MW, Clarkson JJ, Grandbastien MA, Leitch AR.** (2007): Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years. *New Phytol*. 175:756–763.
- Lim KY, Kovařík A, Matyášek R, Chase MW, Knapp S, McCarthy E, Clarkson JJ, Leitch AR.** (2006): Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section Alatae. *Plant J*. 48:907–919.
- Lima-Filho PA, Amorim KDJ, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF.** (2014a): Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Gobionellus oceaniczs* and *G. stomatus* (Gobiidae;

- Perciformes): A shared XX/XY system and an unusual distribution of 5S rDNA sites on the Y chromosome. *Cytogenet Genome Res.* 144: 333–340.
- Lima-Filho PA, Bertollo LAC, Cioffi MB, Costa GWWF, Molina WF.** (2014b): Karyotype divergence and spreading of 5S rDNA sequences between genomes of two species: darter and emerald gobies (*Ctenogobius*, Gobiidae). *Cytogenet Genome Res.* 142:197–203.
- Lima-Filho PA, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF.** (2012): Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin goby *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). *J Exp Mar Biol Ecol.* 43:63–70.
- Lin KW, Yan J.** (2008): Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutat Res.* 658:95–110.
- Linares C, González J, Ferrer E, Fominaya A.** (1996): The use of double fluorescence in situ hybridization to physically map the positions of 5S rDNA genes in relation to the chromosomal location of 18S–5.8S–26S rDNA and a C genome specific DNA sequence in the genus *Avena*. *Genome.* 39:535–542.
- Liu Z, Yue W, Li DY, Wang RRC, Kong XY, Lu K, Wang GX, Dong YS, Jin WW, Zhang XY.** (2008): Structure and dynamics of retrotransposons at wheat centromeres and pericentromeres. *Chromosoma.* 117:445–456.
- Long EO, Dawid IB.** (1980): Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem.* 49:727–764.
- Lönnig W-E, Saedler H.** (2002): Chromosome rearrangements and transposable elements. *Annu Rev Genet.* 36:389–410.
- López-Flores I, Garrido-Ramos MA** (2012): The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *In: Garrido-Ramos MA (editor): Repetitive DNA. Genome Dyn, vol 7. Karger, Basel. pp 1–28.*
- Lippman Z, Gendrel A-V, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, Lavine K, et al.** (2004): Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature.* 430:471–476.
- Luo J, Gao Y, Ma W, Bi X-y, Wang S-y, Wang J, Wang Y-q, et al.** (2014): Tempo and mode of recurrent polyploidization in the *Carassius auratus* species complex (Cypriniformes, Cyprinidae). *Heredity* (Edinb). 112:415–427.
- Lynch M, Conery JS.** (2000): The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science.* 290:1151–1155.
- Lysák MA, Schubert I.** (2013): Mechanisms of chromosome rearrangements. *In: Leitch IJ, Greilhuber J, Doležel J, Wendel JF (editors): Plant Genome Diversity Volume 2: Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes. Springer – Verlag, Vídeň. pp 137–147.*
- Ma XF, Gustafson JP.** (2005): Genome evolution of allopolyploids: A process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenet Genome Res.* 109:236–249.
- Mable BK.** (2004): 'Why polyploidy is rarer in animals than in plants': myths and mechanisms. *Biol J Linn Soc.* 82:453–466.
- Mable BK, Alexandrou MA, Taylor MI.** (2011): Genome duplication in amphibians and fish: an extended synthesis. *J Zool.* 284:151–182.
- Macqueen DJ, Johnston IA.** (2014): A well-constrained estimate for the timing of the salmonid whole genome duplication reveals major decoupling from species diversification. *Proc Biol Sci.* 281:20132881.
- Madlung A.** (2013): Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity.* 110:99–104.
- Maggini FT, Cremonini R, Zolfino C, Tucci GF, D'Ovidio R, Delre V, De Pace C, et al.** (1991): Structure and chromosomal localization of DNA sequences related to ribosomal subrepeats in *Vicia faba*. *Chromosoma.* 100:229–234.
- Mahelka V, Kopecký D, Baum BR.** (2013): Contrasting patterns of evolution of 45S and 5S rDNA families uncover new aspects in the genome constitution of the agronomically important grass *Thinopyrum intermedium* (Triticeae). *Mol Biol Evol.* 30:2065–2086.

- Mahelka V, Kopecký D, Paštová L.** (2011): On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae). *BMC Evol Biol.* 11:127.
- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Foresti F, et al.** (2011): Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *BMC Genet.* 12:65.
- Majtánová Z, Choleva L, Symonová R, Ráb P, Kotusz J, Pekárik L, Janko K.** (2016a): Asexual reproduction does not apparently increase the rate of chromosomal evolution: karyotype stability in diploid and triploid clonal hybrid fish (*Cobitis*, Cypriniformes, Teleostei). *PLoS One.* 11:1–18.
- Majtánová Z, Symonová R, Arias-Rodriguez L, Mořkovský L, Flajšhans M, Ráb P.** (2016b): Cytogenomická analýza bazálních linií paprskoploutvých ryb. Zoologické dny, České Budějovice, Česká republika. 11.–12.2.2016. Book of Abstracts: 134–135.
- Majtánová Z, Symonová R, Rodrigues LA, Sallan L, Cavin L, Havelka M, Flajšhans M, et al.** (2015): Cytogenetics of non-teleostean ray-finned fishes (Actinopterygii) and the Halecostomi - Holostei problem. XVI Simpósio de cytogenética e Genética de Peixes, Cuiabá, Mato Grosso, Brazilie. 25.–28.10.2015.
- Makunin AI, Dementyeva P V, Graphodatsky AS, Volobouev VT, Kukeková AV, Trifonov VA.** (2014): Genes on B chromosomes of vertebrates. *Mol Cytogenet.* 7:1–10.
- Malik HS.** (2009): The centromere drive hypothesis: a simple basis for centromere complexity. *Prog Mol Subcell Biol.* 48:33–52.
- Mallet J.** (2007): Hybrid speciation. *Nature* 446:279–283.
- Mandrioli M.** (2000): *Mariner*-like transposable elements are interspersed within the rDNA-associated heterochromatin of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Chromosom Res.* 8: 177–179.
- Mandrioli M, Manicardi GC.** (2001): Cytogenetic and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Genetica.* 111:433–438.
- Mandrioli M, Manicardi GC, Machella N, Caputo V.** (2001): Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). *Genetica.* 110:73–78.
- Manechot N, Yano CF, Bertollo LAC, Getlekha N, Molina WF, Ditcharoen S, Tengjaroenkul B, et al.** (2016): Genomic organization of repetitive DNAs highlights chromosomal evolution in the genus *Clarias* (Clariidae, Siluriformes). *Mol Cytogenet.* 9:4.
- Mank JE, Avise JC.** (2006): Phylogenetic conservation of chromosome numbers in actinopterygian fishes. *Genetica.* 127:321–327.
- Mank JE, Avise JC.** (2009): Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. *Sex Dev.* 3:60–67.
- Mank JE, Promislow DEL, Avise JC.** (2006): Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. *Biol J Linn Soc.* 87:83–93.
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA, Moreira-Filho O.** (2000): Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica.* 109:161–168.
- Mantovani M, Abel LDS, Moreira-Filho O.** (2005): Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica.* 123:211–216.
- Margarido VP, Galetti PM Jr.** (2000): Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). *Genet Mol Biol.* 23:569–573.
- Mariotto S, Centofante L, Miyazawa CS, Bertollo LAC, Moreira-Filho O.** (2009): Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotrop Ichthyol.* 7:595–600.

- Mariotto S, Centofante L, Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O.** (2011): Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comp Cytogenet.* 5:31–42.
- Markova M, Vyskot B.** (2010): New horizons of genomic in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res.* 126:368–375.
- Marquioni V, Bertollo LAC, Diniz D, Cioffi MB.** (2013): Comparative chromosomal mapping in *Triportheus* fish species. Analysis of synteny between ribosomal genes. *Micron.* 45:129–135.
- Marshall OJ, Chueh AC, Wong LH, Choo KHA.** (2008): Neocentromeres new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *Am J Hum Genet.* 82:261–282.
- Martinez PA, Ezaz T, Valenzuela N, Georges A, Graves JAM.** (2008): An XX/XY heteromorphic sex chromosome system in the Australian chelid turtle *Emydura macquarii*: a new piece in the puzzle of sex chromosome evolution in turtles. *Chromosom Res.* 16:815–825.
- Martins C.** (2007): Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of the fish genome. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (editors): *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. pp 421–453.
- Martins C, Galetti PM Jr.** (1999): Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosom Res.* 7:363–367.
- Martins C, Galetti PM Jr.** (2001): Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica.* 111:439–446.
- Martins C, Wasko AP.** (2004): Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR (editor): *Focus on Genome Research*. Hauppauge: Nova Science Publishers. p.335–363.
- Martins C, Cabral-de-Melo DC, Targino GV, Mazzuchelli J, Oliveira SG.** (2011): Cytogenetic mapping and contribution to the knowledge of animal genomes. In: Urbano KV (editor): *Advances in Genetics Research, Vol 4*. Nova Science Publisher, New York. pp 1–82.
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PM Jr.** (2006): A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica.* 127:133–141.
- Martins C, Oliveira C, Wasko AP, Wright JM.** (2004): Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - a review. *Aquaculture.* 231:37–49.
- Martins NF, Bertollo LAC, Troy WP, Feldberg E, Valentin FCS, Cioffi MB.** (2013): Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): comparative chromosome mapping of repetitive sequences. *Rev Fish Biol Fish.* 23:261–269.
- Mason AS, Pires JC.** (2015): Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? *Trends Genet.* 31:5–10.
- Matoba H, Soejima A, Hoshi Y.** (2007): Identification of parental genomes and genomic organization in *Aster microcephalus* var. *ovatus*. *J Plant Res.* 120:585–593.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, et al.** (2002): *DMY* is a Y specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature.* 417:559–563.
- Matthey R.** (1945): L' evolution de la formule chromosomiale chez les vertebrees. *Experientia.* 1:50–6 a 78–86.
- Matzke MA, Matzke AJM.** (1998): Polyploidy and transposons. *Trends Ecol Evol.* 13:241.
- Mayden RL, Chen WJ, Bart HL, Doosey MH, Simons AM, Tang KL, Wood RM, et al.** (2009): Reconstructing the phylogenetic relationships of the earth's most diverse clade of freshwater fishes-order Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): a case study using multiple nuclear loci and the mitochondrial genome. *Mol Phylogenet Evol.* 51:500–514.

- Mayden RL, Tang KL, Conway KW, Freyhof J, Chamberlain S, Haskins M, Schneider M, et al.** (2007): Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 308:642–654.
- Mayr B, Ráb P, Kalat M.** (1985): Localisation of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). *Genetica.* 67:51–56.
- Mazzei F, Ghigliotti L, Bonillo C, Coutanceau J-P, Ozouf-Costaz C, Pisano.** (2004): Chromosomal patterns of major and 5S ribosomal DNA in six icefish species (Perciformes, Notothenioidei, Channichthyidae). *Polar Biol.* 28:47–55.
- Mazzuchelli J, Kocher T, Yang F, Martins C.** (2012): Integrating cytogenetics and genomics in comparative evolutionary studies of cichlid fish. *BMC Genomics.* 13:463.
- Mazzuchelli J, Martins C.** (2009): Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica.* 136:461–469.
- McClintock B.** (1984): The significance of responses of the genome to challenge. *Science.* 226:792–801.
- McCluskey BM, Postlethwait JH.** (2014): Phylogeny of zebrafish, a “model species,” within *Danio*, a “model genus.” *Mol Biol Evol.* 32:635–652.
- McStay B, Grummt I.** (2008): The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24:131–157.
- Medrano L, Bernardi G, Couturier J, Dutrillaux B, Bernardi G.** (1988): Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromosoma.* 96:178–183.
- Medstrand P, van de Lagemaat LN, Dunn C, Landry J-R, Svenback D, Mager DL.** (2005): Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. *Cytogenet Genome Res.* 110:342–352.
- Mestriner CA, Galetti PM Jr, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM.** (2000): Structural and functional evidence that a B chromosome in the characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity.* 85: 1–9.
- Merlo MA, Cross I, Machado M, Cárdenas S, Rebordinos L.** (2013): The 5S rDNA high dynamism in *Diplodus sargus* is a transposon-mediated mechanism. Comparison with other multigene families and sparidae species. *J Mol Evol.* 76:83–97.
- Merlo MA, Cross I, Chairi H, Machado M, Rebordinos L.** (2010): Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. *Genes Genet Syst.* 85:341–349.
- Merlo MA, Cross I, Palazon JL, Ubeda-Manzanaro M, Sarasquete C, Rebordinos L.** (2012a): Evidence for 5S rDNA horizontal transfer in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. *BMC Evol Biol.* 12:201.
- Merlo MA, Pacchiarini T, Portela-Bens S, Cross I, Machado M, Rebordinos L.** (2012b): Genetic characterization of *Plectorhinchus mediterraneus* yields important clues about genome organization and evolution of multigene families. *BMC Genet.* 13:33.
- Messias LHV, Ferreira DC, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F, Martins C.** (2003): 5S rDNA organization in the fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchidae, Synbranchiformes). *Hereditas.* 139:228–231.
- Mertcalfe CJ, Eldridge MDB, Johnston PG.** (2004): Mapping the distribution of the telomeric sequence  $(T_2AG_3)_n$  in the  $2n=14$  ancestral marsupial complement and in the macropodines (Marsupialia: Macropodidae) by fluorescence in situ hybridization. *Chromosom Res.* 12:405–414.
- Mertcalfe CJ, Eldridge MDB, Toder R, Johnston PG.** (1998): Mapping the distribution of the telomeric sequence  $(T_2AG_3)_n$  in the Macropodoidea (Marsupialia), by fluorescence *in situ* hybridization. I. The swamp wallaby, *Wallabia bicolor*. *Chromosom Res.* 6:603–610.
- Meyer A, van de Peer Y.** (2005): From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays.* 27:937–945.

- Meyne J, Baker JR, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, et al.** (1990): Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*. 1990;99:3–10.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK.** (1989): Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:7049–7053.
- Milani D, Cabral-de-Mello DC.** (2014): Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. *PLoS One*. 9:38–44.
- Milhomem SSR, Castro RR, Nagamachi CY, Souza ACP, Feldberg E, Pieczarka JC.** (2010): Different cytotypes in fishes of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu river (Amazon region, Brazil). *Comp Cytogenet*. 4:45–54.
- Milhomem SSR, Scacchetti PC, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA, Pansonato-Alves JC, O'Brien PCM, Foresti F, et al.** (2013): Are NORs always located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). *PLoS One*. 8:e55608.
- Miller DA, Dev VG, Tantravahi R, Miller O.** (1976): Suppression of human nucleolar organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp Cell Res*. 101:235–243.
- Mishima M., Ohmido N., Fukui K., Yahara T.** (2002) Trends in site-number change of rDNA loci during polyploid evolution in *Sanguisorba* (Rosaceae). *Chromosoma*. 110:550–558.
- Mizuochi H, Marasek A, Okazaki K.** (2007): Molecular cloning of *Tulipa fosteriana* rDNA and subsequent FISH analysis yields cytogenetic organization of 5S rDNA and 45S rDNA in *T. gesneriana* and *T. fosteriana*. *Euphytica*. 155:235–248.
- Moghadam HK, Ferguson MM, Danzmann RG.** (2005): Evidence for *Hox* gene duplication in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a tetraploid model species. *J Mol Evol*. 61:804–818.
- Molina WF.** (2007): Chromosomal changes and stasis in marine fish groups. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (editors): *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. pp 69–110.
- Molina WF, Galetti PM Jr.** (2002): Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genet Mol Biol*. 25:373–377.
- Molina WF, Galetti PM Jr.** (2004): Multiple pericentric inversions and chromosomal divergence in the reef fishes *Stegastes* (Perciformes, Pomacentridae). *Genet Mol Biol*. 27:543–548.
- Molina WF, Martinez PA, Bertollo LAC, Bidau CJ.** (2014): Evidence for meiotic drive as an explanation for karyotype changes in fishes. *Mar Genomics*. 15:29–34.
- Molina WF, Shibatta O, Galetti PM Jr.** (2008): Chromosomal evidence of population subdivision in the freshwater fish *Leporinus elongatus* in the Upper Paraná River basin. *Genet Mol Biol*. 31:270–274.
- Morán P, Martínez JL, Garcia-Vásquez E, Pendás AM.** (1996): Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet Cell Genet*. 75:145–150.
- Morescalchi MA, Liguori I, Rocco L, Stingo V.** (2007): Karyotypic characterization and genomic organization of the 5S rDNA in *Erpetoichthys calabaricus* (Osteichthyes, Polypteridae). *Genetica*. 131:209–216.
- Morishima K, Yoshikawa H, Arai K.** (2008): Meiotic hybridogenesis in triploid *Misgurnus loach* derived from a clonal lineage. *Heredity* (Edinb). 100:581–586.
- Moss T, Stefanovsky VY.** (1994): Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol*. 50:25–66.
- Mota-Velasco JC, Ferreira IA, Cioffi MB, Ocalewicz K, Campos-Ramos R, Shirak A, Lee B-Y, et al.** (2010): Characterization of the chromosome fusions in *Oreochromis karongae*. *Chromosom Res*. 18:575–586.
- Motta-Neto CC, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF.** (2011a): Extensive chromosomal homologies and evidence of karyotypic stasis in Atlantic grunts of the genus *Haemulon* (Perciformes). *J Exp Mar Biol Ecol*. 401:75–79.



- Motta-Neto CC, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF.** (2011b): Molecular cytogenetic analysis of Haemulidae fish (Perciformes): evidence of evolutionary conservation. *J Exp Mar Biol Ecol.* 407:97–100.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, et al.** (1988): A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:6622–6626.
- Nakajima RT, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Venere PC, Martins C.** (2012): Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish. *BMC Evol Biol.* 12:198.
- Nakatani Y, Takeda H, Kohara Y, Morishita S.** (2007): Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome Res.* 17:1254–1265.
- Nalbant TT.** (2002): Sixty million years of evolution: Part one: Family Botiidae (Pisces: Ostariophysi: Cobitoidea). *Trav Mus Natl Hist Nat Grigore Antipa.* 44:309–333.
- Nanda I, Feichtinger W, Schmid M, Schröder JH, Zischler H, Epplen JT.** (1990): Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex-chromosomes in the guppy fish. *J Mol Evol.* 30:456–462.
- Nanda I, Fugate M, Steinlein C, Schmid M.** (2008): Distribution of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. *Cytogenet Genome Res.* 122:396–400.
- Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, et al.** (2002a): A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:11778–11783.
- Nanda I, Schneider-Rasp S, Winking H, Schmmid M.** (1995): Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosom Res.* 3:399–409.
- Nanda I, Schories S, Tripathi N, Dreyer C, Haaf T, Schmid M, Scharrtl M.** (2014): Sex chromosome polymorphism in guppies. *Chromosoma.* 123:373–383.
- Nanda I, Schrama D, Feichtinger W, Haaf T, Scharrtl M, Schmid M.** (2002b): Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in avian chromosomes. *Chromosoma.* 111:215–227.
- Nani TF, Cenzi G, Pereira DL, Davide LC, Techio VH.** (2015): Ribosomal DNA in diploid and polyploid *Setaria* (Poaceae) species: number and distribution. *Comp Cytogenet.* 9:645–660.
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, Batista JA, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA.** (2013): Chromosome painting reveals multiple rearrangements between *Gymnotus capanema* and *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes). *Cytogenet Genome Res.* 141:163–168.
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, de Souza ACP, and Ferguson-Smith MA.** (2010): Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. *BMC Genet.* 11:28.
- Naruse K, Tanaka M, Mita K, Shima A, Postlethwait J, Mitani H.** (2004): A medaka gene map: the trace of ancestral vertebrate proto-chromosomes revealed by comparative gene mapping. *Genome Res.* 14:820–828.
- Navarro A, Barton NH.** (2003): Chromosomal speciation and molecular divergence-accelerated evolution in rearranged chromosomes. *Science.* 300:321–324.
- Near TJ, Eytan RI, Dornburg A, Kuhn KK, Moore JA, Davis MP, Wainwright PC, et al.** (2012): Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proc Natl Acad Sci.* 109:13698–13703.
- Nei M, Rooney APOD.** (2005): Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet.* 39:121–152.
- Nelson JS.** (2006): *Fishes of the world*. 4th edition. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey. 601 pp.

- Németh A, Conesa A, Santoyo-Lopez J, Medina I, Montaner D, Péterfia B, Solovei I, et al.** (2010): Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet.* 6:e1000889.
- Nergadze SG, Santagostino MA, Salzano A, Mondello C, Giulotto E.** (2007): Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. *Genome Biol.* 8:R260.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F.** (2010): Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica.* 138:343–354.
- Noletto RB, Vicari MR, Cipriano RR, Artoni RF, Cestari MM.** (2007): Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). *Genetica.* 130:133–138.
- Noor M a, Grams KL, Bertucci LA, Reiland J.** (2001): Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:12084–12088.
- Ocalewicz K.** (2013): Telomeres in fishes. *Cytogenet Genome Res.* 141:114–125.
- Ocalewicz K, Dobosz S.** (2009): Karyotype variation in the albino rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)). *Genome.* 52:347–352.
- Ocalewicz K, Furgala-Selezniow G, Szmyt M, Lisboa R, Kucinski M, Lejk AM, Jankun M.** (2013): Pericentromeric location of the telomeric DNA sequences on the European grayling chromosomes. *Genetica.* 141:409–416.
- Ocalewicz K, Sliwinska A, Jankun M.** (2004): Autosomal localization of interstitial telomeric sites (ITS) in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Pisces, Salmonidae). *Cytogenet Genome Res.* 105:79–82.
- Ocalewicz K, Woznicki P, Jankun M.** (2008): Mapping of rRNA genes and telomeric sequences in Danube salmon (*Hucho hucho*) chromosomes using primed *in situ* labeling technique (PRINS). *Genetica.* 134:199–203.
- Ohlberger J, Mehner T, Staaks G, Hölker F.** (2008): Temperature-related physiological adaptations promote ecological divergence in a sympatric species pair of temperate freshwater fish, *Coregonus* spp. *Funct Ecol.* 22:501–508.
- Ohno S.** (1970): Evolution by Gene Duplication. New York: Springer-Verlag.
- Ohno S.** (1999): Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970–1999. *Semin Cell Dev Biol.* 10:517–522.
- Ojima Y, Ueda T.** (1978): New C-banded marker chromosomes found in carp-funa hybrids. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 54:15–20.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Mori L, Toledo-Filho SA.** (1992): Extensive chromosomal rearrangements and nuclear-DNA content changes in the evolution of the armored catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *J Fish Biol.* 40:419–431.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS.** (2009): Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem.* 35:81–100.
- Oliveira C, Foresti F, Rigolino MG, Tabata YA.** (1995): Synaptonemal complex analysis in spermatocytes and oocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae): the process of autosome and sex chromosome synapsis. *Chromosom Res.* 3:182–190.
- Olovnikov AM.** (1973): A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 41:181–190.
- Orgel LE, Crick FH.** (1980): Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature.* 284: 604–607.
- O’Sullivan RJ, Karlseder J.** (2010): Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:171–181.
- Østbye K, Amundsen P-A, Bernatchez L, Klemetsen A, Knudsen R, Kristoffersen R, Naesje TR, et al.** (2006): Parallel evolution of eco-morphological traits in European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) during postglacial times. *Mol Ecol.* 15:3983–4001.
- Østbye K, Bernatchez L, Naesje TR, Himberg M, Hindar K.** (2005): Evolutionary history of European whitefish *Coregonus* (L.) species complex as inferred from mtDNA phylogeography and gill-raker numbers. *Mol Ecol.* 14:4371–4388.
- Otto SP.** (2007): The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell.* 131:452–462.

- Otto SP, Whitton J.** (2000): Polyploid incidence and evolution. *Ann Rev Genet.* 34: 401–437.
- Ozouf-Costaz C, Brandt J, Körting C, Pisano E, Bonillo C, Coutanceau J-P, Volff J-N.** (2004): Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. *Antarct Sci.* 2004;16:51–57.
- Ozouf-Costaz C, Coutanceau J-P, D'Hont A, Chassoux D, Lecointre G.** (2015): Extending DNA fibers and fiber-FISH. *In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida-Toledo LF* (editors): *Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts)*. CRC Press, Inc., Enfield, New Hampshire, USA. pp 166–174.
- Pandian TJ, Koteeswaran R.** (1998): Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia.* 384:167–243.
- Pandian TJ, Koteeswaran R.** (1999): Natural occurrence of monoploids and polyploids in the Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Curr Sci.* 76:1134–1137.
- Panopoulou G, Poustka AJ.** (2005): Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications - the adventure of a hypothesis. *Trends Genet.* 21:559–567.
- Pansonato-Alves JC, Hilsdorf AWS, Utsunomia R, Silva DMZA, Oliveira C, Foresti F.** (2013a): Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). *Cytogenet Genome Res.* 141:133–142.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F.** (2013b): Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei: Siluriformes: Locariidae): analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fish.* 23:477–489.
- Pansonato-Alves JC, Serrano ÉA, Utsunomia R, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F.** (2014): Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. *PLoS One.* 9:e107169.
- Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F.** (2007): Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet Genome Res.* 116:218–223.
- Parisod C.** (2012): Polyploids integrate genomic changes and ecological shifts. *New Phytol.* 193:297–300.
- Parisod C, Alix K, Just J, Petit M, Sarilar V, Ainouche M, Chalhoub B, et al.** (2010a): Impact of transposable elements on the organization and function of allopolyploid genomes. *New Phytol.* 186:37–45.
- Parisod C, Holderegger R, Brochmann C.** (2010b): Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytol.* 186:5–17.
- Pasquier L, Fradin M, Chérot E, Martin-Coignard, Colin E, Journal H, Demurger F, et al.** (2016): Karyotype is not dead (yet)! *Eur J Med Genet.* 59:11–15.
- Paule MR, White RJ.** (2000): Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28:1283–1298.
- Paun O, Forest F, Fay MF, Chase MW.** (2011): Parental divergence and hybrid speciation in angiosperms revisited. *Taxon.* 60:1241–1244.
- Pazian MF, Shimabukuro-Dias CK, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F.** (2013): Chromosome painting of Z and W sex chromosomes in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). *Genetica.* 141:1–9.
- Pedrosa-Harand A, de Almeida CCS, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M** (2006): Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor Appl Genet.* 112:924–933.
- Peichel CL, Ross JA, Matson CK, Dickson M, Grimwood J, Schmutz J, Meyers RM, et al.** (2004): The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Curr Biol.* 14:1416–1424.

- Pendás AM, Morán P, Freije JP, García-Vázquez E.** (1994b): Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Cell Genet.* 67:31–36.
- Pendás AM, Morán P, García-Vázquez E.** (1993a): Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. *Chromosom Res.* 1:63–67.
- Pendás AM, Morán P, García-Vázquez E.** (1993b): Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet Cell Genet.* 63:128–130.
- Pendás AM, Morán P, García-Vázquez E.** (1994a): Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. *Chromosoma.* 103:147–152.
- Penton EH, Crease TJ.** (2004): Evolution of the transposable element *Pokey* in the ribosomal DNA of species in the subgenus *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Mol Biol Evol.* 21:1727–1739.
- Pereira CSA, Aboim MA, Ráb P, Collares-Pereira MJ.** (2014): Introgressive hybridization as a promoter of genome reshuffling in natural homoploid fish hybrids (Cyprinidae, Leuciscinae). *Heredity* (Edinb) 112:343–350.
- Pereira CSA, Pazian MF, Ráb P, Collares-Pereira MJ.** (2015): Dynamics of *Rex3* in the genomes of endangered Iberian Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) and their natural hybrids. *Mol Cytogenet.* 8:81.
- Pereira CS a, Ráb P, Collares-Pereira MJ.** (2012): Chromosomes of European cyprinid fishes: Comparative cytogenetics and chromosomal characteristics of ribosomal DNAs in nine Iberian chondrostomine species (Leuciscinae). *Genetica.* 140:485–495.
- Pereira CS a, Ráb P, Collares-Pereira MJ.** (2013): Chromosomes of iberian leuciscinae (cyprinidae) revisited: Evidence of genome restructuring in homoploid hybrids using dual-color fish and CGH. *Cytogenet Genome Res.* 141:143–152.
- Pérez J, Morán P, García-Vázquez E.** (1999): Physical mapping of three minisatellite sequences in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome. *Anim Genet.* 30:371–374.
- Phillips RB.** (2001): Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) to fish genetics and genome mapping. *Mar Biotechnol* (NY). 3:S145–S152.
- Phillips RB, Kapuscinski AR.** (1987): A Robertsonian polymorphism in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) involving the nucleolar organizer region. *Cytogenet Cell Genet.* 44:148–152.
- Phillips RB, Kapuscinski AR.** (1988): High frequency of translocation heterozygotes in odd year populations of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Cytogenet Cell Genet.* 48:178–182.
- Phillips RB, Konkol NR, Reed KM, Stein JD.** (2001) Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica.* 111:119–123.
- Phillips R, Ráb P.** (2001): Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 76:1–25.
- Phillips RB, Matsuoka MP, Smoker WW, Gharrett AJ.** (1999): Inheritance of chromosomal polymorphism in odd-year pink salmon from southeastern Alaska. *Genome.* 42:816–820.
- Phillips RB, Nichols KM, DeKoning JJ, Morasch MR, Keatley KA, Rexroad III C, Gahr SA, et al.** (2006): Assignment of rainbow trout linkage groups to specific chromosomes. *Genetics.* 174: 1661–1670.
- Phillips RB, Noakes M a., Morasch M, Felip A, Thorgaard GH.** (2004): Does differential selection on the 5S rDNA explain why the rainbow trout sex chromosome heteromorphism is not linked to the SEX locus? *Cytogenet Genome Res.* 105:122–125.
- Phillips RR, Reed KM.** (1996): Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture.* 140:197–216.
- Pie MR, Torres RA, Brito DMA** (2007): Evolution of genome size in fishes: a phylogenetic test of the Hinegardner and Rosen hypothesis. *Genetica.* 131:51–58.

- Piferrer F, Beaumont A, Falguiere JC, Flajšhans M, Haffray P, Kolombo L.** (2009): Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*. 239:125–156.
- Pich U, Fuchs J, Schubert I.** (1996): How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Res.* 4:207–213.
- Pinhal D, Yoshimura TS, Araki CS, Martins C.** (2011): The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. *BMC Evol Biol.* 11:151.
- Pires JC, Lim KY, Kovařík A, Matyásek R, Boyd A, Leitch AR, Leitch IJ, Bennett M D, Soltis PS., Soltis DE.** (2004): Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (Asteraceae) allopolyploids reveal a karyotype that is additive of the diploid progenitors. *Amer J Bot.* 91: 1022–1035.
- Pisano E, Ghigliotti L.** (2009): Ribosomal genes in notothenioid fishes: focus on the chromosomal organisation. *Mar Genomics.* 2:75–80.
- Pisano E, Ozouf-Costaz C.** (2000): Chromosome change and the evolution in the Antarctic fish suborder Notothenioidei. *Antarct Sci.* 12:334–342.
- Piscor D, Alves AL, Parise-Maltempi PP.** (2015): Chromosomal microstructure diversity in three *Astyanax* (Characiformes, Characidae) species: comparative analysis of the chromosomal locations of the 18S and 5S rDNAs. *Zebrafish.* 12:81–90.
- Piskurek O, Nishihara H, Okada N, Line B.** (2009): The evolution of two partner LINE/ SINE families and a full-length chromodomain-containing *Ty3 / Gypsy* LTR element in the first reptilian genome of *Anolis carolinensis*. *Gene.* 441:111–118.
- Plíštil J.** (2016): Aquatab. World wide web electronic publication. <http://www.aquatab.net/>. Accessed 12.3.2016.
- Plohl M, Luchetti A, Meštrović N, Mantovani B.** (2008): Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene.* 409:72–82.
- Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E.** (2011): Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genet.* 12:90.
- Poletto AB, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Nakajima RT, Mazzuchelli J, Ribeiro HB, Venere PC.** (2010a): Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genet.* 11:50.
- Poletto AB, Ferreira IA, Martins C.** (2010b): The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. *BMC Genet.* 11:1.
- Poltronieri J, Marquioni V, Bertollo LAC, Kejnovsky E, Molina WF, Liehr T, Cioffi MB.** (2014): Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 142:40–45.
- Pomianowski K, Jankun M, Ocalewicz K.** (2012): Detection of interstitial telomeric sequences in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) (Teleostei: Salmonidae). *Genome.* 55:26–32.
- Porto FE, de Rossi Vieira MM, Barbosa LM, Borin-Carvalho LA, Vicari MR, Portela-Castro ALB, Martins-Santos IS.** (2014): Chromosomal polymorphism in *Rineloricaria Lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): evidence of fusions and their Consequences in the population. *Zebrafish.* 11:318–324.
- Porto-Foresti F, Oliveira C, Gomes EA, Tabata YA, Rigolino MG, Foresti F.** (2004): A lethal effect associated with polymorphism of the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genet Mol Biol.* 27: 51–54.
- Porto-Foresti F, Oliveira C, Tabata YA, Rigolino MG, Foresti F.** (2007): NOR markers in the identification and management of cultured fish species: the case of rainbow trout stocks

- reared in Brazil. *In*: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (editors): Fish Cytogenetics. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. pp 333–357.
- Post A.** (1974): Ergebnisse ders Forschungsreisen des FRV Walter Hertwig nach Sudamerika. die Chromosomen von drei Arten aus der Familie Gonostomatidae. *Arch Fishereiwiss.* 25:51–55.
- Prokopowich CD, Gregory TR, Crease TJ.** (2003): The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome.* 46:48–50.
- Pucci MB, Barbosa P, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Pansonato-Alves JV, Foresti F, et al.** (2014): Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. *Biol J Linn Soc.* 111:541–553.
- Qumsiyeh MB.** (1994): Evolution of number and morphology of mammalian chromosomes. *J Hered.* 85:455–465.
- Ráb P.** (2004): Karyotypová evoluce ryb řádu Esociformes. Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Ráb P, Collares-Pereira MJ.** (1995): Chromosomes of European cyprinid fishes (Cyprinidae, Cypriniformes) - a review. *Folia Zool.* 44:193–214.
- Ráb P, Bohlen J, Rábová M, Flajšhans M, Kalous M.** (2007): Cytogenetics as a tool in fish conservation: the present situation in Europe. *In*: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (editors): Fish Cytogenetics. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, pp 215–240.
- Ráb P, Rábová M, Pereira CS, Collares-Pereira MJ, Pelikánová Š.** (2008): Chromosome studies of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker - the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species painting. *Chromosom Res.* 16:863–873.
- Ráb P, Rábová M, Reed KM, Phillips RB.**(1999): Chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the primitive semionotiform fish, longnose gar *Lepisosteus osseus*. *Chromosom Res.* 7:475–480.
- Ráb P, Rábová, M, Bohlen J, Lusk S.** (2000): Genetic differentiation of the two hybrid diploid-polyploid complexes of loaches, genus *Cobitis* (Cobitidae), involving *C. taenia*, *C. elongatioides* and *C. spp.* in the Czech Republic. *Folia Zool.* 49(Suppl 1):55–66.
- Rábová M, Ráb P, Ozouf-Costaz C.** (2001): Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in a loach fish, *Cobitis vardarensis* (Ostariophysi, Cobitidae) detected by different banding techniques and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetica.* 111:413–422.
- Rábová M, Völker M, Pelikánová Š, Ráb P.** (2015): Sequential chromosome banding in fishes. *In*: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF (editors): Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts). CRC Press, Inc., Enfield, USA. pp 92–102.
- Raina SN, Rani V.** (2001): GISH technology in plant genome research. *Methods Cell Sci.* 23:83–104.
- Rampin M, Bi K, Bogart JP, Collares-Pereira MJ.** (2012): Identifying parental chromosomes and genomic rearrangements in animal hybrid complexes of species with small genome size using genomic *in situ* hybridization (GISH). *Comp Cytogenet.* 6:287–300.
- Ramsey J, Schemske DW.** (1998): Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst.* 29:467–501.
- Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A.** (2008): Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res.* 120:351–357.
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E.** (2004): Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:14818–14823.



- Ravi V, Venkatesh B.** (2008): Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. *Curr Opin Genet Dev.* 18:544–550.
- Rebordinos L, Cross I, Merlo A.** (2013): High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: state of the art. *Cytogenet Genome Res.* 141:103–113.
- Rebollo R, Horard B, Hubert B, Vieira C.** (2010): Jumping genes and epigenetics: towards new species. *Gene*, 454:1–7.
- Redi CA, Garagna S, Della Valle G, Bottiroli G, Dell’Orto P, Viale G, et al.** (1990): Differences in the organization and chromosomal allocation of satellite DNA between the European long tailed house mice *Mus domesticus* and *Mus musculus*. *Chromosoma.* 99:11–17.
- Rieseberg LH.**(2001): Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol Evol.* 16:351–358.
- Rishi KK, Haobam MS.** (1984): Karyotypes of three forms of fishes having high chromosome number. *Int J Acad Ichthyol Modinagar.* 5:1–2.
- Roa F, Guerra M.** (2015): Non-random distribution of 5S rDNA sites and its association with 45S rDNA in plant chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 146:243-249.
- Robertson WRB.** (1916): Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of Tettigidae and Acrididae. V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae, Locustidae and Gryllidae: chromosomes and variation. *Morph.* 27:179–331.
- Robinson TJ, Harrison WR, de Leon AP, Davis SK, Elder FFB.** (1998): A molecular analysis of X chromosome repatterning in the Bovidae: transpositions, inversions and phylogenetic inference. *Cytogenet. Cell Genet.* 80:179–184.
- Robinson TJ, Ruiz-Herrera A, Avise JC.** (2008): Hemiplasy and homoplasy in the karyotypic phylogenies of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:14477–14481.
- Robinson-Rechavi M, Marchand O, Escriva H, Bardet P-L, Zelus D, Hughes S, Laudet V.** (2001): Euteleost fish genomes are characterized by expansion of gene families. *Genome Res.* 11:781–788.
- Robles F, de la Herrán R, Ludwig A, Rejón CR, Rejón MR, Garrido-Ramos A.** (2004): Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene.* 338:133–142.
- Roček Z.** (2002): Historie obratlovců: evoluce, fylogeneze, systém. Academia. 511 pp.
- Rodionov AV.** 1996. Micro vs. macro: a review of structure and functions of avian micro- and macrochromosomes. *Genetika.* 32:597–608.
- Roest Crolius H, Jaillon O, Bernot A, Dasilva C, Bouneau L, Fischer C, Fizames C, et al.** (2000): Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using *Tetraodon nigroviridis* DNA sequence. *Nat Genet.* 25:235–238.
- Romanenko SA, Biltueva LS, Serdyukova NA, Kulemzina A, Beklemisheva VR, Gladkikh OL, Lemskaya NA, et al.** (2015): Segmental paleotetraploidy revealed in sterlet (*Acipenser ruthenus*) genome by chromosome painting. *Mol Cytogenet.* 8:90.
- Rong J, Feltus FA, Liu L, Lin L, Patterson AH.** (2010): Gene copy number evolution during tetraploid cotton radiation. *Heredity.* 105:463-472.
- Ropiquet A, Gerbault-Seureau M, Deuve JL, Gilbert C, Pagáčová E, Chai N, Rubeš J, et al.** (2008): Chromosome evolution in the subtribe Bovina (Mammalia, Bovidae): The karyotype of the Cambodian banteng (*Bos javanicus birmanicus*) suggests that Robertsonian translocations are related to interspecific hybridization. *Chromosom Res.* 16:1107–1118.
- Rosa R, Bellafronte E, Moreira-Filho O, Margarido VP.** (2006): Constitutive heterochromatin, 5S and 18 rDNA genes in *Apareiodon* sp. (Characiformes, Parodontidae) with a ZZ/ZW sex chromosome system. *Genetica.* 128:159–166.
- Rosa KO, Zienniczak K, de Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Artoni RF, et al.** (2012): Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol Fish.* 22:739–749.

- Rosato M, Moreno-Saiz JC, Galián JA, Rosselló JA.** (2015): Evolutionary site-number changes of ribosomal DNA loci during speciation: complex scenarios of ancestral and more recent polyploid events. *AoB Plants*. 7:plv135.
- Ross JA, Urton JR, Boland J, Shapiro MD, Peichel CL.** (2009): Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (Gasterosteidae). *PLoS Genet*. 5:e1000391.
- Rossi AR, Gornung E.** (2005): Cytogenetic analysis of three Italian populations of *Coregonus lavaretus* (Pisces, Salmoniformes) with chromosomal localization of major and minor ribosomal genes, and telomeric repeats. *Hereditas*. 142:15–21.
- Rossi AR, Milana V, Hett AK, Tancioni L.** (2012): Molecular cytogenetic analysis of the Apennine endemic cyprinid fish *Squalius lucumonis* and three other Italian leuciscines using chromosome banding and FISH with rDNA probes. *Genetica*. 140:469–476.
- Roukos V, Misteli T.** (2014): The biogenesis of chromosome translocations. *Nat Cell Biol*. 16:293–300.
- Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, Bresson JL.** (2005): Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res*. 111:291–296
- Ruiz-Herrera A, Farré M, Ponsá M, Robinson TJ.** (2010): Selection against Robertsonian fusions involving housekeeping genes in the house mouse: integrating data from gene expression arrays and chromosome evolution. *Chromosom Res*. 18:801–808.
- Ruiz-Herrera A, Nergadze SG, Santagostino M, Giulotto E.** (2008): Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res*. 122:219–228.
- Russell J, Zomerdijsk CBM.** (2005): RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci*. 30:87–96.
- Saitoh K.** 1989. Multiple sex-chromosome system in a loach fish. *Cytogenet Cell Genet*. 52:62–64.
- Saitoh K, Chen W-J, Mayden RL.** (2010): Extensive hybridization and tetraploidy in spined loach fish. *Mol Phylogenet Evol*. 56:1001–1010.
- Saitoh K, Sado T, Doosey MH, Bart HL Jr., Inoue JG, Nishida M, Mayden RL, et al.** (2011): Evidence from mitochondrial genomics supports the lower Mesozoic of South Asia as the time and place of basal divergence of cypriniform fishes (Actinopterygii: Ostariophysii). *Zool J Linn Soc*. 161:633–662.
- Sakai C, Konno F, Nakano O, Iwai T, Yokota T, Lee J, Nishida-Umehara C, et al.** (2007): Chromosome elimination in the interspecific hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. hubbsi*. *Chromosom Res*. 15:697–709.
- Sakamoto T, Danzmann RG, Gharbi K, Howard P, Ozaki A, Khoo SK, Woram RA, et al.** (2000): A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics*. 155:1331–1345.
- Sallan LC.** (2014): Major issues in the origins of ray-finned fish (Actinopterygii) biodiversity. *Biol Rev*. 89:950–971.
- Salvadori S, Deiana A, Coluccia E, Florida G, Rossi E, Zuffardi O.** (1995): Colocalization of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Res*. 3:54–58,
- Sampaio TR, Pires LB, Rosa R, Dias AL.** (2014): Activity patterns of nucleolar organizer region during spermatogenesis of different curimatid species (Characiformes: Curimatidae). *Genome*. 57:119–124.
- Sandler L, Novitski E.** (1957): Meiotic drive as an evolutionary force. *Am Nat*. 91:105–110.
- Sans-Fuentes M, Garcia-Valero J, Ventura J, Lopez-Fuster MJ.** (2010): Spermatogenesis in the house mouse in a Robertsonian polymorphism zone. *Reproduction*. 140:569–581.
- Santini F, Harmon LJ, Carnevale G, Alfaro ME.** (2009): Did genome duplication drive the origin of teleosts? A comparative study of diversification in ray-finned fishes. *BMC Evol Biol*. 9:194.
- Scacchetti PC, Alves JCP, Utsunomia R, Claro FL, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, et al.** (2012): Molecular characterization and physical mapping of two classes of 5S rDNA in the

- genomes of *Gymnotus sylvius* and *G. inaequilabiatus* (Gymnotiformes, Gymnotidae). *Cytogenet Genome Res.* 136:131–137.
- Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Oliveira C, Foresti F.** (2011): Karyotypic diversity in four species of the genus *Gymnotus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): physical mapping of ribosomal genes and telomeric sequences. *Comp Cytogenet.* 5:223–235.
- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, da Costa Silva GJ, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C.** (2015b): Repetitive DNA sequences and evolution of ZZ/ZW sex chromosomes in *Characidium* (Teleostei: Characiformes). *PLoS One.* 10:e0137231.
- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, da Costa-Silva GJ, Oliveira C, Foresti F.** (2015c): Extensive spreading of interstitial telomeric sites on the chromosomes of *Characidium* (Teleostei, Characiformes). *Genetica.* 143:263–270.
- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F.** (2015a): Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei, Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 146:136–143.
- Sczepanski TS, Noletto RB, Kantek DLZ, Cortinhas MCS, Cestari MM.** (2007): Classical and molecular cytogenetics of *Atherinella brasiliensis* (Teleostei, Atheriniformes) from South coast of Brazil. *J Fish Biol.* 71:453–460.
- Sealey PG, Whittaker PA, Southern EM.** (1985): Removal of repeated sequences from hybridisation probes. *Nucleic Acids Res.* 13:1905–1922.
- Senchina DS, Alvarez I, Cronn RC, Liu B, Rong JK, Noyes RD, Paterson AH, Wing RA, Wilkins TA, Wendel JF.** (2003): Rate variation among nuclear genes and the age of polyploidy in *Gossypium*. *Mol Biol Evol.* 20:633–643.
- Sember A, Bohlen J, Šlechtová V, Altmanová M, Symonová R, Ráb P.** (2015): Karyotype differentiation in 19 species of river loach fishes (Nemacheilidae, Teleostei): Extensive variability associated with rDNA and heterochromatin distribution and its phylogenetic and ecological interpretation. *BMC Evol Biol.* 15:251.
- Shapiro JA, von Sternberg R.** (2005): Why repetitive DNA is essential to genome function. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 80:227–250.
- Sharma OP, Tripathi NK.** (1988): Female heterogamety in two Teleostean fishes. *Cytologia.* 53:81–86.
- Sharma S, Raina SN** (2005): Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 109:15–26.
- She C-W, Song Y-C, Jiang Y-H.** (2012): Comparative genomic *in situ* hybridization analysis on the chromosomes of five grass species with rice genomic DNA probe. *African J Biotechnol.* 11:9508–9515.
- Schartl M.** (2004) Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 14:634–641.
- Schartl M, Schmid M, Nanda I.** (2015): Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma.* doi: 10.1007/s00412-015-0569-y.
- Scheer U, Thiry M, Goessens G.** (1993): Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol.* 3:236 – 241.
- Schemberger MO, Bellafrente E, Nogaroto V, Almeida MC, Schühli GS, Artoni RF, Moreira-Filho O, et al.** (2011): Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica.* 139:1499–1508.
- Schlesinger S, Selig S, Bergman Y, Cedar H.** (2009): Allelic inactivation of rDNA loci. *Genes Dev.* 23:2437–2447.
- Schlötterer C.** (2000): Microsatellite analysis indicates genetic differentiation of the neo-sex chromosomes in *Drosophila americana*. *Heredity.* 85:610–616.

- Schmid M, Guttenbach M.** (1988): Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma*. 97:101–114.
- Schmid M, Steinlein C, Bogart JP, Feichtinger W, León P, La Marca E, Díaz LM, Sanz A, et al.** (2010): The chromosomes of terraran frogs: insights into vertebrate cytogenetics. *Cytogenet Genome Res*. 130-131:1-568.
- Schmid M, Steinlein C, Nanda I, Epplen TJ.** (1990): Chromosome banding in amphibia. In: Olmo E. (editor): *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*, Birkhäuser, Basel. pp 2–45.
- Schmid M, Steinlein C, Yano CF, Cioffi MB.** (2016): Hypermethylated chromosome regions in nine fish species with heteromorphic sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res*. doi: 10.1159/000444067.
- Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, Artoni RF, Vicari MR, Martins C, Feldberg E.** (2013a) Chromosomal evolution of neotropical cichlids: The role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Rev Fish Biol Fish*. 23:201–214.
- Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, do Carmo EJ, Martins C, Feldberg E.** (2013b): Evolutionary dynamics of retrotransposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* in neotropical cichlid genomes. *BMC Evol Biol*. 13:152.
- Schubert I, Fransz PF, Fuchs J, de Jong JH.** (2001): Chromosome painting in plants. *Methods Cell Sci*. 23:57-69.
- Schubert I, Lysak MA.** (2011): Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends Genet*. 27:207–216.
- Schulz M, Freyhof J.** (2003): *Coregonus fontanae*, a new spring-spawning cisco from Lake Stechlin, northern Germany (Salmoniformes: Coregonidae). *Ichthyol Explor Freshw*. 14:209-216.
- Schultz RJ.** (1969): Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *Am. Nat.* 103:606-619.
- Schwartz FJ.** (2001): Freshwater and marine fish family hybrids: a worldwide changing scene revealed by the scientific literature. *J Elisha Mitchell Sci Soc*. 117:62-65.
- Schwarzacher HG, Wachtler F.** (1993): The nucleolus. *Anat. Embryol*. 188:515–536.
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS.** (1989): *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann. Bot*. 64:315-324.
- Schweizer D and Loidl J.** (1987): A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes Today*. 9: 61–74.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano J, Daniel SN, Hashimoto DT.** (2014): Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paraneae* (Teleostei, Characiformes). *PLoS One*. 9:e94896.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, et al.** (2013): Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*. 141:329–336.
- Silva DMZA, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F.** (2015): Chromosomal mapping of repetitive DNA sequence in five species of *Astyanax* (Characiformes, characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. *Cytogenet Genome Res*. doi: 10.1159/000438813.
- Singh M, Kumar R, Nagpure NS, Kushwaha B, Mani I, Lakra WS.** (2009): Extensive NOR site polymorphism in geographically isolated populations of Golden mahseer, *Tor putitora*. *Genome*. 52:783–789.
- Slijepčević P.** (1998): Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma*. 107:136–140.
- Śliwińska-Jewsiewicka A, Kuciński M, Kirtiklis L, Dobosz S, Ocalewicz K, Jankun M.** (2015): Chromosomal characteristics and distribution of rDNA sequences in the brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1814). *Genetica*. 425–432.

- Sloan KE, Bohnsack MT, Watkins NJ.** (2013): The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep.* 5:237–247.
- Slotkin RK, Martienssen R.** (2007): Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet.* 8:272–85.
- Smith EM, Gregory TR.** (2009): Patterns of genome size diversity in the ray-finned fishes. *Hydrobiologia.* 625:1–25.
- Sola L, Gornung E.** (2001): Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): an overview. *Genetica.* 11:397–412.
- Sola L, Rossi AR, Annesi F, Gornung E.** (2003) Cytogenetic studies in *Sparus auratus* (Pisces, Perciformes): molecular organization of 5S rDNA and chromosomal mapping of 5S and 45S ribosomal genes and of telomeric repeats. *Hereditas.* 139:232–236.
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, et al.** (2009): Polyploidy and angiosperm diversification. *Am J Bot.* 96: 336–348.
- Sotero-Caio CG, Volleth M, Hoffmann FG, Scott LA, Wichman HA, Yang F, Baker R.** (2015): Integration of molecular cytogenetics, dated molecular phylogeny, and model-based predictions to understand the extreme chromosome reorganization in the Neotropical genus *Tonatia* (Chiroptera: Phyllostomidae). *BMC Evol Biol.* 15:220.
- Souza IL, Moreira-Filho O, Galetti PM Jr.** (1996): Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Braz. J. Genet.* 19: 405–410.
- Speicher MR, Carter NP** (2005): The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet.* 6:782–792.
- Steinemann S, Steinemann M.** (2005): Retroelements: Tools for sex chromosome evolution. *Cytogenet Genome Res.* 110:134–143.
- Sternberg P, Saura A.** (2013): Meiosis and its deviations in polyploid animals. *Cytogenet Genome Res.* doi: 10.1159/000351731.
- Suja JA, de la Torre J, Giménez-Abián JF, García de la Vega, C, Rufas JS.** (1990): Meiotic chromosome structure. Kinetochores and chromatid cores in standard and B chromosomes of *Arcyptera fusca* (Orthoptera) revealed by silver staining. *Genome.* 34: 19 – 27.
- Sumner AT.** (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res.* 75: 304–306.
- Sumner AT.** (1990): Chromosome Banding. Unwin Hyman Ltd, London. 434 pp.
- Sumner AT.** (2003): Chromosomes: Organization and Function. Blackwell Science, Oxford. 275 pp.
- Supiwong W, Liehr T, Cioffi MB, Chaveerach A, Kosyakova N, Pinthong K, Tanee T.** (2013): Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). *Mol Cytogenet.* 1–7.
- Supiwong W, Liehr T, Cioffi MB, Chaveerach A, Kosyakova N, Pintong K, Tanee T, et al.** (2014): Chromosomal evolution in naked catfishes (Bagridae, Siluriformes): a comparative chromosome mapping study. *Zool Anz.* 253:316–320.
- Suzuki H, Sakurai S, Matsuda Y.** (1996): Rat 5S rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet.* 72: 1–4.
- Svartman M, Stone G, Stanyon R.** (2005): Molecular cytogenetics discards polyploidy in mammals. *Genomics.* 85:425–430.
- Symonová R, Flajšhans M, Gela D, Pelikánová Š, Rábová, M, Ráb P.** (2010b): Tetraploidy in paddlefish, *Polyodon spathula*: – 34 years later. 19th ICACGM, Balice, Krakow, Polsko, 6.–9.6. 2010, Book of Abstracts: 147, *Chromosom Res.* 20: 753–754.
- Symonová R, Flajšhans M, Sember A, Havelka M, Gela D, Kořínková T, Rodina M, et al.** (2013a): Molecular cytogenetics in artificial hybrid and highly polyploid sturgeons: an evolutionary story narrated by repetitive sequences. *Cytogenet Genome Res.* 141:153–162.
- Symonová R, Majtánová Z, Sember A, Staaks GBO, Bohlen J, Freyhof J, Rábová M, et al.** (2013b): Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid

- speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evol Biol* 13:42.
- Symonová R, Sember A, Majtánová Z, Ráb P.** (2015): Characterization of fish genomes by GISH and CGH. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida-Toledo LF (editors): *Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts)*. CRC Press, Inc., Enfield, New Hampshire, USA, pp 118-131.
- Šichová J, Voleníková A, Dincă V, Nguyen P, Vila R, Sahara K, Marec F.** (2015): Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evol Biol.* 15:1–16.
- Šlechtová V, Bohlen J, Freyhof J, Ráb P.** (2006): Molecular phylogeny of the Southeast Asian freshwater fish family Botiidae (Teleostei: Cobitoidea) and the origin of polyploidy in their evolution. *Mol Phylogenet Evol.* 39:529-541.
- Šlechtová V, Bohlen J, Tan HH.** (2007): Families of Cobitoidea (Teleostei; Cypriniformes) as revealed from nuclear genetic data and the position of the mysterious genera *Barbucca*, *Psilorhynchus*, *Serpenticobitis* and *Vaillantella*. *Mol Phylogenet Evol.* 44:1358-1365.
- Taboada X, Pansonato-Alves JC, Foresti F, Martínez P, Viñas A, Pardo BG, Bouza C.** (2014): Consolidation of the genetic and cytogenetic maps of turbot (*Scophthalmus maximus*) using FISH with BAC clones. *Chromosoma.* 123:281–291.
- Takabachi N, Nishimaki S, Omae M, Okuda M, Fujita S, Ishida F, Horiguchi H, et al.** (2008): Long-term survival in a 69,XXX triploid premature infant. *Am J Med Genet Part A.* 146:1618–1621.
- Takada M, Tachihara K, Kon T, Yamamoto G, Iguchi K, Miya M, Nishida M.** (2010): Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia. *BMC Evol Biol.* 10:7.
- Takeda H, Shimada A.** (2010): The art of medaka genetics and genomics: what makes them so unique? *Annu Rev Genet.* 44:217–241.
- Tanomtong A, Supiwong W, Jearranaiprepame P, Khakhong S, Kongpironchuen C, Getlekhka N.** (2014): A new natural autotetraploid and chromosomal characteristics of dwarf snakehead fish, *Channa gachua* (Perciformes, Channidae) in Thailand. *Cytologia (Tokyo).* 79:15–27.
- Tautz D, Renz M.** (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 17:4127–4138.
- Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, van de Peer Y** (2003): Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish. *Genome Res.* 13:382–390.
- Taylor JS, Raes J.** (2004): Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu Rev Genet.* 38:615–643.
- Taylor JS, van de Peer Y, Braasch I, Meyer A.** (2001). Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356, 1661–1679.
- Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-De-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Pinhal D, Poletto AB, et al.** (2009): Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenet Genome Res.* 125:224–234.
- Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Nogaroto V, de Almeida MC, Artoni RF, Vicari MR, et al.** (2012): Repetitive sequences associated with differentiation of W chromosome in *Semaprochilodus taeniurus*. *Genetica.* 140:505–512.
- Thomas JW, Touchman JW, Blakesley RW, Bouffard GG, Beckstrom-Sternberg SM, Margulie EH, Blanchette M, et al.** (2003): Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions. *Nature.* 424: 788–793.
- Thorgaard GH.** (1976): Robertsonian polymorphism and constitutive heterochromatin distribution in chromosomes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Cytogenet Cell Genet.* 17:174–184.



- Torrell M, Cerbah M, Siljak-Yakovlev S, Vallés J.** (2003): Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescent in situ hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Pl Syst Evol.* 239: 141–153.
- Traldi JB, Vicari MR, Martinez JF, Blanco DR, Lui RL, Moreira-Filho O.** (2015): Chromosome Analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisi* (Characiformes, Parodontidae): an extensive chromosomal polymorphism of 45S and 5S ribosomal DNAs. *Zebrafish.* 13:19–25.
- Traut W, Eickhoff U, Schorch JC.** (2001): Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). *Methods Cell Sci.* 23:155–161.
- Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F.** (1999): Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma.* 108:173–180.
- Traut W, Winking H.** (2001): Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: zebrafish, platyfish and guppy. *Chromosom Res.* 9:659–672.
- Trifonov VA, Vorobieva NN, Rens W.** (2009): FISH With and Without COT1 DNA. In: Liehr T (editor): Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) – Application Guide. Springer- Verlag Berlin Heidelberg. pp 99–109.
- Tsujimoto H, Usami N, Hasegawa K, Yamada T, Nagaki K, Sasakuma T.** (1999): De novo synthesis of telomere sequences at the healed breakpoints of wheat deletion chromosomes. *Mol Gen Genet.* 262:851–856.
- Turner BJ, Brett BLH, Rasch EM, Balsano JS.** (1980): Evolutionary genetics of a gynogenetic fish, *Poecilia formosa*, the Amazon molly. *Evolution.* 34:246–258.
- Turner BJ, Grudzien TA, Adkisson KP, Worrell RA.** (1985): Extensive chromosomal divergence within a single river basin in the Goodeid fish, *Ilyodon furcidens*. *Evolution.* 39:122–34.
- Tyalé A, Parisod C.** (2013): Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. *Cytogenet Genome Res.* 140:79–96.
- Úbeda-Manzanaro M, Merlo MA, Palazón JL, Cross I, Sarasquete C, Rebordinos L.** (2010): Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica.* 138:787–94.
- Uno Y, Asada Y, Nishida C, Takehama Y, Sakaizumi M, Matsuda Y.** (2013): Divergence of repetitive dna sequences in the heterochromatin of medaka fishes: molecular cytogenetic characterization of constitutive heterochromatin in two medaka species: *Oryzias hubbsi* and *O. celebensis* (Adrianichthyidae, Beloniformes). *Cytogenet Genome Res.* 141:212–226.
- Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F.** (2014a): Scattered organization of the histone multigene family and transposable elements in *Synbranchus*. *Genet Mol Biol.* 37:30–36.
- Utsunomia R, Scacchetti PC, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F.** (2014b): Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. *Cytogenet Genome Res.* 142:286–292.
- Uyeno T, Smith GR.** (1972): Tetraploid origin of karyotype of catostomid fishes. *Science.* 175:644–646.
- Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA, Martins C.** (2011): Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenet Genome Res.* 133:34–42.
- Valente G, Kocher T, Eickbush T, Simanões RP, Martins C.** (2016): Integrated cytogenetics and genomics analysis of transposable elements in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mol Genet Genomics.* doi: 10.1007/s00438-016-1176-1.
- Valente TG, Schneider CH, Gross MC, Feldberg E, Martins C.** (2009): Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. *Chromosom Res.* 17:791–799.

- Vandepoele K, De Vos W, Taylor JS, Meyer A, van de Peer Y.** (2004): Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:1638–1643.
- Van de Peer Y, Maere S, Meyer A.**(2009): The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat Rev Genet*. 10:725-732.
- Van de Peer Y, Meyer A.** (2005): Large-scale gene and ancient genome duplications. *In: Gregory TR* (editor): *The Evolution of the Genome*. Elsevier, San Diego. pp 330 - 368.
- Van Oeveren J, de Rooter M, Jesse T, van der Poel, Tang J, Yalcin F, Janssen A, et al.** (2011): Sequence-based physical mapping of complex genomes by whole genome profiling. *Genome Res*. 21:618–625.
- Vasil'ev VP, Vasil'eva KD.** (1982): A new diploid-polyploid complex in fishes. *Dokl.Akad. Nauk SSSR*. 266:250-252.
- Vasil'ev VP, Vasil'eva ED, Osinov AG.** (1989): Evolution of diploid-triploid-tetraploid complex of fishes genus *Cobitis*. *In: Dawley RM., Bogart JP* (editors): *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*, Bulletin 446, Albany, NY: New York State Museum. pp. 153–169.
- Veltsos P, Keller I, Nichols RA.** (2009): Geographically localised bursts of ribosomal DNA mobility in the grasshopper *Podisma pedestris*. *Heredity* (Edinb) 103:54–61.
- Venkatesh B.** (2003): Evolution and diversity of fish genomes. *Curr Opin Genet Dev*. 13:588–592.
- Vicari MR, de Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF.** (2006): Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genet Mol Biol*. 29:621–625.
- Vicari MR, Artoni RF, Moreira-Filho O, Bertollo LAC.** (2008): Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeiroensis*. *Cytogenet Genome Res*. 122:67–72.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, de Almeida MC, Moreira-Filho O, et al.** (2010): Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *J Fish Biol*. 76:1094–1116.
- Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR, Moreira-Filho O.** (2003): Origin and differentiation of sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G and C-banding. *Genetica*. 119:115–120.
- Vierna J, Wehner S, Hörner zu Siederdisen C, Martínez-Lage A, Marz M.** (2013): Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity*. 111:410-421.
- Vittorazzi SE, Lourenço LB, Del-Grande ML, Recco-Pimentel SM.** (2011): Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). *Cytogenet Genome Res*. 134: 101–107 (2011).
- Volff J-N** (2005): Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* (Edinb). 94:280–294.
- Volff J-N, Körting C, Scharl M** (2000): Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Mol Biol Evol*. 17:1673–1684.
- Volff J-N, Körting C, Altschmied J, Duschl J, Sweeney K, Wichert K, Froschauer A. et al.** (2001): *Jule* from the Fish *Xiphophorus* Is the First Complete Vertebrate Ty3/Gypsy Retrotransposon from the Mag Family. *Mol Biol Evol*. 18:101–111.
- Volff J-N, Nanda I, Schmid M, Scharl M.** (2007): Governing sex determination in fish: Regulatory putsches and ephemeral dictators. *Sex Dev*. 1:85–99.
- Volff J-N, Bouneau L, Ozouf-Costaz C, Fischer C.** (2003): Diversity of retrotransposable elements in compact genomes. *Trends Genet*. 19:674-678.
- Volff J-N, Körting C, Sweeney K, Scharl M** (1999): The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Mol Biol Evol*. 16:1427–1438.
- Völker M, Sonnenberg R, Ráb P, Kullmann H.** (2007): Karyotype differentiation in *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). III: extensive karyotypic variability associated with low mitochondrial haplotype differentiation in *C. bivittatum*. *Cytogenet Genome Res*. 116:116–126.

- Völker, M., Ráb, P., Kullmann, H.** (2008): Karyotype differentiation in *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae): patterns, mechanisms and evolutionary implications. *Biol J Linn Soc.* 94: 143 – 153.
- Volkov RA, Zanke C, Panchuk II, Hemleben V** (2001): Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding. *Theor Appl Genet.* 103: 1273–1282.
- Vonlanthen P, Roy D, Hudson AG, Largiader CR, Bittner D, Seehausen O.** (2009): Divergence along a steep ecological gradient in lake whitefish (*Coregonus* sp.). *J Evolution Biol.* 22:498–514.
- Vozdová M, Šebestová H, Kubíčková S, Černohorská H, Awadova T, Vahala J, Rubeš J.** (2014): Impact of Robertsonian translocation on meiosis and reproduction: an impala (*Aepyceros melampus*) model. *J Appl Genet.* 1–10.
- Volobouev V, Aniskin V, Lecompte E, Ducroz JF.** (2002): Patterns of karyotype evolution in complexes of sibling species within three genera of African murid rodents inferred from the comparison of cytogenetic and molecular data. *Cytogenet Genome Res.* 96:261–275.
- Vrijenhoek RC.** (1989): Genetic and evolutionary constraints on the origin and establishment of unisexual vertebrates. In: Dawley RM, Bogart JP (editors): *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates.* Albany, NY: New York State Museum. pp. 24–31.
- Wang X, Zhang Q, Ren J, Jiang Z, Wang C, Zhuang W, Zhai T.** (2009): The preparation of sex-chromosome-specific painting probes and construction of sex chromosome DNA library in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Aquaculture.* 297:78–84.
- Weider LJ, Elser JJ, Crease TJ, Mateos M, Cotner B, Markow TA.** (2005): The functional significance of ribosomal (r)DNA variation: impacts on the evolutionary ecology of organisms. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 36:219–242.
- Wesche PL, Robinson TJ.** (2012) Different patterns of Robertsonian fusion pairing in Bovidae and the house mouse: the relationship between chromosome size and nuclear territories. *Genet Res (Camb).* 94:97–111..
- White MJD.** (1973): *Animal Cytology and Evolution.* 3rd edn. London, Cambridge University Press.
- White MJD.** (1978): *Modes of Speciation.* San Francisco: WH Freeman and company.
- Wicke S, Costa A, Muñoz J, Quandt D.** (2011): Restless 5S: The re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Mol Phylogenet Evol.* 61:321–332.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chaloub B, Flavell A, et al.** (2007): A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet.* 8:973–982.
- Wichman HA, Payne CT, Ryder OA, Hamilton MJ, Maltbie M, Baker RJ.** (1991): Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. *J Hered.* 82:369–377
- Woods IG, Wilson C, Friedlander B, Chang P, Reyes DK, Nix R, Kelly PD, et al.** (2005): The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 15:1307–1314.
- Woram RA, Gharbi K, Sakamoto T, Hoyheim B, Holm L-E, Naish K, McGowan C, et al.** (2003): Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes. *Genome Res.* 272–280.
- Xu D, Lou B, Bertollo LAC, Cioffi MB.** (2013): Chromosomal mapping of microsatellite repeats in the rock bream fish *Oplegnathus fasciatus*, with emphasis of their distribution in the neo-Y chromosome. *Mol Cytogenet.* 6:12.
- Yang L, Mayden RL, Sado T, He S, Saitoh K, Miya M.** (2010): Molecular phylogeny of the fishes traditionally referred to Cyprinini sensu stricto (Teleostei: Cypriniformes). *Zool Scr.* 39:527–550.
- Yang L, Sado T, Hirt MV, Pasco-Viel E, Arunachalam M, Li J, Wang X, et al.** (2015): Phylogeny and polyploidy: resolving the classification of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Mol Phylogenet Evol.* 85:97–116.

- Yano CF, Bertollo LAC, Molina WF, Liehr T, Cioffi MB.** (2014): Genomic organization of repetitive DNAs and its implications for male karyotype and the neo-Y chromosome differentiation in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comp Cytogenet.* 8:139–151.
- Yano CF, Bertollo LAC, Ezaz T, Trifonov V, Sember A, Liehr T, Cioffi MB.** Evolution of differentiated sex chromosomes in congeneric species by independent and rapid degeneration of W chromosomes. *Chromosoma. in revision.*
- Yi S, Strelman JT.** (2005): Genome size is negatively correlated with effective population size in ray-finned fish. *Trends Genet.* 21:643–646.
- Yoshida K, Terai Y, Mizoiri S, Aibara M, Nishihara H, Watanabe M, Kuroiwa A, et al.** (2011): B chromosomes have a functional effect on female sex determination in Lake Victoria cichlid fishes. *PLoS Genet.* 7:e1002203.
- Yu, Q.-X., L.C. Fan, J.-X. Cui, X.-H. Ren, K. Li and X.-J. Yu.** (1994): High resolution G-banding and idiogram on pachytene bivalents of rice field eels (*Monopterus albus* Zuiew). *Science in China (Ser. B).* 37:1090–1096.
- Yu, XY, Yu, XJ.** (1990): A Schizothoracine fish species, *Diptychus dipogon* with a very high number of chromosomes. *Chromosome Inf. Service.* 48:1718.
- Zaleśna A, Choleva L, Ogielska M, Rábová M, Marec F, Ráb P.** (2011): Evidence for integrity of parental genomes in the diploid hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus* by genomic in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res.* 134:206–212.
- Zhang, L, King CE.** (1993): Life history divergence of sympatric diploid and polyploid populations of brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Oecologia.* 93:177–183.
- Zhang X, Eickbush MT, Eickbush TH.** (2008): Role of recombination in the long-term retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics.* 180:1617–1626.
- Zhao Z-X, Xu P, Cao D-C, Kuang Y-Y, Deng H-X, Zhang Y, Xu L-M, et al.** (2014): Duplication and differentiation of common carp (*Cyprinus carpio*) myoglobin genes revealed by BAC analysis. *Gene.* 548:210-216.
- Zhou Q, Braasch I, Froschauer A, Böhne A.** (2010): A novel marker for the platyfish (*Xiphophorus maculatus*) W chromosome is derived from a *Polinton* transposon. *J Genet Genomics.* 37:181-188.
- Zhu HP, Ma DM, Gui JF.** (2006): Triploid origin of the gibel carp as revealed by 5S rDNA localization and chromosome painting. *Chromosom Res.* 14:767–776.
- Zhu HP, Gui JF.** (2007): Identification of genome organization in the unusual allotetraploid form of *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture.* 265:109–117.
- Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Scharl M, Schmid M.** (2003): The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Res.* 11:23–25.
- Ziemniczak K, Barros AC, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Moreira-Filho O, et al.** (2012): Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Ital J Zool.* 79:1–10.
- Ziemniczak K, Traldi JB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Moreira-Filho O, Vicari MR.** (2015): In situ localization of (GATA)<sub>n</sub> and (TTAGGG)<sub>n</sub> repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Cytogenet Genome Res.* 144:325–332.
- Ziemniczak K, Barros AC, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Moreira-Filho O, et al.** (2012): Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Ital J Zool.* 79:1–10
- Zijlmans JM, Martens UM, Poon SS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK, Lansdrop PM.** (1997): Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub> repeats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 7423–7428.

- Zlotina A, Galkina S, Krasikova A, Crooijmans RPMA, Groenen MAM, Gagynskaya E, Deryusheva S.** (2012): Centromere positions in chicken and Japanese quail chromosomes: de novo centromere formation versus pericentric inversions. *Chromosom Res.* 20:1017–1032.
- Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD, Islam-Faridi MN, Stelly DM, Wing RA, Price HJ, et al.** (1997): A rapid procedure for the isolation of C<sub>0</sub>t-1 DNA from plants. *Genome.* 40: 138–142.