

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Karolína Lukšíková

Analýza diferenciacce karyotypů a pohlavních chromozómů u afrických anuálních halančíků
rodu *Nothobranchius* (Teleostei: Nothobranchiidae)

Analysis of karyotype and sex chromosome differentiation in African annual killifish of the
genus *Nothobranchius* (Teleostei: Nothobranchiidae)

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Alexandr Sember, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

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

V Praze 10. 8. 2021

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala lidem, kteří mi pomáhali v průběhu psaní a řešení mé práce. Moje první a ze všech největší poděkování patří mému školiteli Mgr. Alexandru Semberovi, PhD., za veškerou pomoc, ochotu, a hlavně trpělivost při psaní této práce a také za všechny cenné rady, odborné vedení a motivaci. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Štundlové, PhD. a Mgr. Marii Altmanové, PhD. za obrovskou pomoc při zasvěcení do grafické práce s obrázky chromozómů a za cenné rady, a zároveň za velkou psychickou podporu. Zároveň bych ráda poděkovala také všem dalším kolegům z našeho týmu a liběchovské laboratoře, za pomoc a rady při experimentální fázi a příjemnou atmosféru v laboratoři, jmenovitě Bc. Tomášovi Pavlicovi, Mgr. Markovi Jankáskovi, Mgr. Matyáši Hřímanovi, Bc. Šárce Pelikánové, Petře Šejnohové a samozřejmě prof. Petru Rábovi za poskytnuté zázemí v podobě Laboratoře genetiky ryb ÚŽFG AV ČR v Liběchově. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Tomášovi Dvořákovi a RNDr. Jörgovi Bohlenovi, PhD. za asistenci při odebrání regenerátů ploutví a při preparacích. V neposlední řadě patří mé velké díky i budějovické sekci našeho týmu RNDr. Anně Voleníkové, RNDr. Martině Dalíkové, PhD., Mgr. Monice Kreklové a RNDr. Petrovi Nguyenovi, PhD. za pomoc s bioinformatickou částí a poskytnuté výsledky z BAC-FISH analýz. Další poděkování samozřejmě patří také doc. RNDr. Martinu Reichardovi, PhD. a Sergeyovi Simanovskému, PhD. za poskytnutí rybího materiálu. Závěrem bych také ráda poděkovala svému příteli, rodině a kamarádům, za neutuchající podporu, důvěru a trpělivost, kterou se mnou po celou dobu studia měli.

Abstrakt

Kostnaté ryby (Teleostei) zahrnují nadpoloviční většinu biodiverzity obratlovců na Zemi. Jejich genomy jsou charakteristické značnou flexibilitou a plasticitou, jdoucí ruku v ruce s polyploidizačními událostmi a dynamikou repetitivní DNA. Kostnaté ryby rovněž vykazují značnou diverzitu mechanismů diferenciací a determinace pohlaví. Úkolem této diplomové práce bylo studovat mechanismy diferenciací karyotypů a pohlavních chromozómů prostřednictvím cytogenetického mapování repetitivní DNA (metodou fluorescenční hybridizace *in situ*, FISH) u vybraných zástupců afrických anuálních halančíků rodu *Nothobranchius* (Cyprinodontiformes). Jedná se o unikátní taxon adaptovaný na život v dočasných sladkovodních tůních, limitovaných svou existencí na období dešťů v afrických savanách. Evolučně mladá diverzifikace druhů, alopatrická speciace v nepřekrývajících se generacích s malou populační velikostí a rovněž dosud známá cytogenetická data naznačují rychlou dynamiku chromozómových změn u halančíků. Práce těžila i) z možnosti analyzovat více populací v rámci několika blízce příbuzných druhů a ii) z paralelní analýzy genomů vybraných halančíků programem RepeatExplorer, která identifikovala nejvíce zastoupené repetitivní sekvence. Moje práce ukázala značnou dynamiku a rychlý obrat repetitivní DNA v genomech halančíků a přinesla nové vhledy do mechanismů vzniku a diferenciací jejich pohlavních chromozómů, včetně případů vnitro- i mezipopulační variability.

Klíčová slova

Teleostei, repetitivní DNA, halančíci, pohlavní chromozómy, chromozómový polymorfismus, rDNA, mezipopulační variabilita, RepeatExplorer

Abstract

Teleost fishes (Teleostei) encompass more than half of the extant vertebrate biodiversity. Their genomes display considerable plasticity and flexibility, going hand in hand with polyploidization events and repetitive DNA dynamics. Teleosts also display a striking diversity in mechanisms of sex determination and differentiation. The aim of the present thesis was to study the mechanisms underlying the karyotype and sex chromosome differentiation through cytogenetic mapping of repetitive DNA (by fluorescence *in situ* hybridization, FISH) in selected representatives of the African annual killifishes of the genus *Nothobranchius* (Teleostei: Nothobranchiidae). *Nothobranchius* spp. evolved a unique adaptation to freshwater temporary water pools whose existence is limited to periods of rainy season in African savannahs. Recent diversification, allopatric speciation in non-overlapping generations and small-sized populations together with known cytogenetics collectively suggest fast dynamics of chromosomal changes in *Nothobranchius* killifishes. The study took advantage of the availability of i) more populations of several closely related species for analysis and ii) data on specific repetitive DNA composition in selected *Nothobranchius* genomes as revealed by RepeatExplorer analysis. My work showed considerable dynamics and a fast turnover of repetitive DNA in the *Nothobranchius* genomes and provided new insights into the mechanisms underlying the origin and differentiation of killifish sex chromosomes, including cases of intra- and inter-population variability.

Keywords

Teleostei, repetitive DNA, killifish, sex chromosomes, chromosome polymorphism, rDNA, interpopulation variability, RepeatExplorer

Slovník pojmů a seznam zkratk

a – akrocentrický chromozóm, modifikace Levanovy klasifikace (v ní veden jako telocentrický)

BAC – (z angl. bacterial artificial chromosomes), vektor pro klonování DNA, využíván mj. pro účely mapování unikátních (tj. nerepetitivních) sekvencí metodou FISH

BSA – hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine), protein se širokým využitím v mol. biologických laboratořích, mj. i jako blokátor mnoha reakcí (blokuje volná vazebná místa reaktantů)

C-pruh – vizualizovaný úsek konstitutivního heterochromatinu

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindol; fluorescenční barvivo vážící se na DNA (přednostně na AT páry)

ESD – (z angl. environmental sex determination) – environmentální určení pohlaví

ETS – (z angl. external transcribed space) – mezerík v transkripční jednotce rRNA

FISH – (z angl. fluorescence *in situ* hybridization) – fluorescenční hybridizace *in situ*

GNS – (z angl. goat normal serum) – alternativa k BSA; využití v mol. biologických laboratořích jako blokátor mnoha reakcí

GSD – (z angl. genetic sex determination) – genetické určení pohlaví

IGS – (z angl. intergenic space) – mezerík v transkripční jednotce rRNA

ITS – (z angl. internal transcribed space) – mezerík v transkripční jednotce rRNA

m – metacentrický chromozóm, Levanova klasifikace

NGS – (z angl. next generation sequencing) – metody sekvenování nové generace

NOR – (z angl. nucleolar organizer region) – nukleolární organizátor, tj. oblast na chromozómu, v níž se nachází geny pro rRNA (kromě genů pro 5S rRNA)

NTS – (z angl. non-transcribed spacers) – nepřepisované mezeríky, oddělující kódující oblasti 5S rDNA

Outgroup – organizmus nebo skupina organismů užívaná v evolučních analýzách, nepatří do analyzované skupiny a slouží pro porovnání event. stanovení výchozího stavu u analyzované skupiny

PBS – (z angl. phosphate buffer saline) – pufr obsahující NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄.12H₂O

PCR – (z angl. polymerase chain reaction) – polymerázová řetězová reakce; metoda amplifikace DNA

PNA – (z angl. peptide nucleic acid) – peptidová nukleová kyselina; využívá se při citlivější modifikaci FISH (PNA-FISH), ve které je cukrfosfátová kostra nahrazena polyamidovou kostrou

rDNA – úseky DNA, které kódují geny pro ribozomální RNA

sm – submetacentrický chromozóm, Levanova klasifikace

SSC – (z angl. saline-sodium citrate) – tzv. SSC pufr; 1× SSC obsahuje 0,15M NaCl a 0,015M Na₃C₆H₅O₇

st – subtelocentrický chromozóm, Levanova klasifikace

Taq polymeráza – DNA polymeráza izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* pro účely metody PCR

Obsah

1 Úvod.....	9
1.1 Cíle práce.....	10
2 Přehled literatury.....	11
2.1 Repetitivní sekvence.....	11
2.1.1 Tandemově uspořádané repetitivní sekvence.....	13
2.2 Analýza repetitivních sekvencí u ryb.....	18
2.2.1 Distribuce různých typů tandemových repetit u ryb a jejich vypovídací hodnota pro analýzu karyotypu.....	19
2.3 Trendy karyotypové diferenciace kostnatých ryb.....	25
2.4 Determinace pohlaví a pohlavní chromozómy ryb.....	26
2.5 Anuální halančíci rodu <i>Nothobranchius</i>	28
3 Materiál a metody.....	32
3.1 Materiál.....	32
3.2 Metody.....	33
3.2.1 Příprava chromozómových preparátů.....	33
3.2.2 C-pruhování.....	35
3.2.3 Izolace genomové DNA a příprava hybridizačních sond.....	36
3.2.4 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	40
3.2.5 Telomerická FISH.....	42
3.2.6 FISH bez denaturace chromozómů (angl. non-denaturing FISH, ND-FISH).....	42
3.2.7 Recyklace preparátů po FISH analýze.....	43
3.2.8 Vyhodnocování preparátů.....	43
4 Výsledky.....	45
4.1 Analýza sekvencí tandemových repetit použitých jako hybridizační sondy.....	45
4.2 Karyotypové charakteristiky a hybridizační vzory mapovaných repetitivních sekvencí u studovaných halančíků.....	50
4.2.1 Jižní klad.....	50
4.2.2 Druhy s mnohočetnými pohlavními chromozómy.....	64
4.2.3 Mapování satelitní DNA napříč rodem <i>Nothobranchius</i>	66
5 Diskuze.....	76
5.1 Konvenční analýza karyotypu.....	76
5.2 Distribuce telomerických repetit.....	77
5.3 Distribuce a evoluční dynamika klastrů rDNA.....	78
5.4 Evoluce vybraných repetitivních sekvencí specifických pro genomy halančíků.....	81
5.5 Diferenciace pohlavních chromozómů u <i>N. furzeri</i> a <i>N. kadleci</i>	85
6 Souhrn.....	87
7 Seznam literatury.....	89

1 Úvod

Svoji diplomovou práci jsem zaměřila na halančíky rodu *Nothobranchius*, kteří jsou unikátní svými adaptacemi pro přežití v opakovaně vysychajících malých vodních plochách ve východoafrických savanách během střídajících se období dešťů a sucha. Jedná se o drobné sladkovodní ryby s výrazným pohlavním dimorfismem. Jejich životní cyklus je limitován vysycháním jejich tůň, tudíž se musejí, v závislosti na konkrétním druhu a lokalitě, vyvinout, pohlavně dospět a rozmnožit se v rámci dvou až jedenácti měsíců, přičemž jejich potomstvo je schopno přežít v dormantním stavu období sucha. Halančíci jsou tak vhodným modelem pro studium stárnutí organismu, evoluce a dynamiky populací aj. (Watters 2009, Furness 2016, Hu & Brunet 2018, Terzibas Tozzini & Cellerino 2020). Recentní práce naznačují, že tyto ryby jsou pozoruhodné i z hlediska dynamiky svých karyotypů, neboť se od sebe často jednotlivé druhy výrazně liší počtem chromozómů i zastoupením jednoramenných a dvouramenných elementů v karyotypu (Krysanov & Demidova 2018). To ukazuje na zvýšenou četnost fúzí a rozpadů chromozómů, což na jednu stranu může být silně ovlivněno životem těchto ryb v malých izolovaných populacích (Bartáková et al. 2013, 2015, Dorn et al. 2014, Cui et al. 2019), kde se přestavby fixují rychleji pod vlivem genetického driftu a příbuzenského křížení (tzv. inbreedingu) (King 1993, Nonaka et al. 2019). Na stranu druhou tyto přestavby mohou hrát důležitou roli v reprodukční izolaci a v konečném důsledku i v případné speciaci nebo adaptaci na konkrétní habitat (King 1993, Kitano et al. 2009, Guerrero & Kirkpatrick 2014, Wellband et al. 2019).

U některých druhů halančíků byly nalezeny pohlavní chromozómy vždy se samčí heterogamií a většinou (šest ze sedmi případů) se jedná o mnohočetné pohlavní chromozómy typu ♀X₁X₁X₂X₂/♂X₁X₂Y (Krysanov et al. 2016, Krysanov & Demidova 2018). Pouze v jediném případě, a to u modelového druhu *N. furzeri* byl zaznamenán systém ♀XX/♂XY. Sedm druhů s identifikovanými pohlavními chromozómy je rozmístěno v různých liniích napříč fylogenetickým stromem rodu *Nothobranchius* (Dorn et al. 2014, van der Merwe et al. 2021), tudíž lze předpokládat, že alespoň některé z nich vznikly jako nezávislé systémy (Krysanov & Demidova 2018, Sember et al. 2021), ale nejsou pro to zatím žádné empirické důkazy.

V neposlední řadě bylo u modelového druhu *N. furzeri* zjištěno, že jeho genom obsahuje velké množství repetitivní DNA (Reichwald et al. 2009, 2015). Ze všech výše zmíněných důvodů jsou halančíci rodu *Nothobranchius* ideálním modelovým objektem pro cytogenetický

výzkum. Vzhledem k velké atraktivitě modelového druhu *N. furzeri* pro různá odvětví vědeckého výzkumu včetně biomedicíny (Cellerino et al. 2016, Hu & Brunet 2018), a dostupnosti celé řady užitečných dat (včetně genomických) u tohoto druhu (např. Harel et al. 2015, Reichwald et al. 2015, Valenzano et al. 2015, Cui et al. 2019, Willemsen et al. 2020), se pro cytogenetický výzkum jeví jako vhodný začátek analýza Jižního kladu halančíků, který kromě *N. furzeri* zahrnuje ještě dalších pět druhů (*N. kadleci*, *N. krysanovi*, *N. orthonotus*, *N. pienaari* a *N. rachovii*). Dalším vhodným cílem pro výzkum jsou zejména druhy s mnohočetnými pohlavními chromozómy (*N. brieri*, *N. guentheri*, *N. lourensi*, *N. ditte*, *N. janpapi* a *N. sp.* z oblasti Kasenga).

1.1 Cíle práce

Ve své práci jsem si vytyčila následující cíle:

- 1) Analyzovat dynamiku karyotypů, pohlavních chromozómů a repetitivní DNA u různých populací *N. furzeri* a sesterského druhu *N. kadleci*
- 2) Určit trendy karyotypové diferenciace a dynamiky vybraných tandemových repetitivních sekvencí v rámci druhů Jižního kladu halančíků
- 3) Studovat dynamiku repetitivní DNA u druhů s mnohočetnými pohlavními chromozómy a přispět tak k zodpovězení některých otázek ohledně původu a míry diferenciace těchto chromozómů
- 4) Analyzovat distribuci vybraných specifických repetitivních sekvencí napříč celým rodem *Nothobranchius*

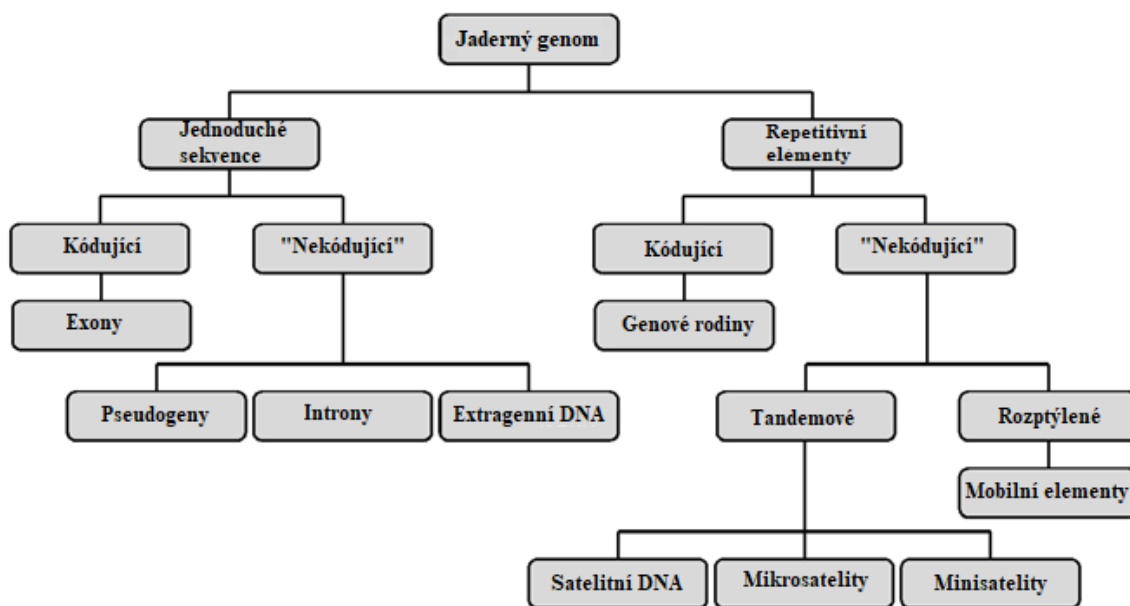
2 Přehled literatury

2.1 Repetitivní sekvence

Genom eukaryot se skládá z jedinečných a repetitivních sekvencí. Repetitivní sekvence obvykle tvoří jeho podstatnou část a jejich množství, složení a distribuce na chromozómech se mnohdy výrazně liší mezi evolučními liniemi, někdy dokonce mezi blízce příbuznými druhy či v rámci druhu/mezipopulačně. Tato dynamika a výsledná variabilita mají potenciální vliv na reprodukční izolaci a speciaci (López-Flores & Garrido-Ramos 2012, Feliciello et al. 2014, Lee et al. 2017, Bracewell et al. 2019, Robledillo et al. 2020).

Repetitivní sekvence můžeme členit podle různých kritérií. Dle množství dané repetice v genomu rozeznáváme vysoce a středně repetitivní sekvence a podle uspořádání dané repetice v genomu je členíme na rozptýlené (tj. jednotlivé kopie se vyskytující napříč genomem) a tandemové (tj. uspořádané ve shluku/klastru za sebou v rámci jedné či více oblastí v genomu). Mezi typické rozptýlené repetice patří mobilní genetické elementy (transpozóny a retrotranspozóny). Tandemové repetice dělíme na minisatelity, mikrosatelity a satelitní sekvence a patří sem také středně repetitivní geny kódující RNA nebo proteiny, jichž je v buňce potřeba velké množství (Obr. 1). Tyto tzv. multigenové rodiny kódují např. ribozomální RNA (rDNA), malé jaderné RNA (snDNA), a replikativní histony (Cabral-de-Mello & Martins 2010, López-Flores & Garrido-Ramos 2012).

V minulosti se soudilo, že repetitivní DNA nemá v buňce žádnou podstatnou funkci a že se jedná jen o jakýsi „hřbitov“ mutovaných či evolucionárně „odložených“ sekvencí. Repetitivní DNA byla proto označována jako tzv. „junk DNA“, případně díky své sobecké propagaci na úkor organismu rovněž jako „selfish DNA“. V posledních dekáдах se tato představa ale výrazně změnila (přehledy viz Biémont & Vieira 2006, Louzada et al. 2020). Zjistě k tomu svou měrou přispělo objevení aktivní transkripce v nekódujících oblastech v rámci projektu ENCODE (ENCODE Project Consortium 2004), třebaže se do jisté míry jednalo o detekci transkripčního šumu. Repetitivní DNA je nepostradatelná pro správnou úlohu centromer, kohezi chromatid, dále také hraje roli ve struktuře chromozómů a architektuře jádra a při regulaci genové exprese (např. epigenetická regulace a vznik nových regulačních sekvencí v genomu) (Cabral-de-Mello & Martins 2010, Winter et al. 2018, Underwood & Choi 2019, přehled viz Louzada et al. 2020).



Obr. 1: Složení eukaryotického genomu (upraveno podle Cabral-de-Mello & Martins 2010). Nekódující repetitivní elementy jsou v uvozovkách s ohledem na nové objevy, které ukazují, že i některé repetitivní elementy se přepisují do RNA.

Jedním z důležitých aspektů spojených se studiem repetitivních sekvencí je skutečnost, že mají dynamičtější evoluci ve srovnání s unikátními oblastmi genomu. Různé typy repetitivních sekvencí mají různou dynamiku evoluce, která se dá hodnotit dle kvantitativních a kvalitativních změn. V prvním případě se jedná o změny v počtu kopií napříč genomem a/nebo změny distribuce dané repetitivní DNA např. v důsledku nerovnoměrného crossing-overu, výměny mezi sesterským chromatidami, ektopických rekombinací mezi kopiemi repetice na nehomologních místech v genomu, aktivity mobilních elementů a v neposlední řadě v důsledku náhodné segregace těchto změn v meióze. Tyto procesy vedou často k chromozómovým aberacím nejrůznějšího typu (inverze, delece, amplifikace, translokace), a tak mohou repetitivní sekvence přispívat k nestabilitě genomu, zejména pokud jsou v genomu ve vysokém zastoupení a dále také ve fázi buněčného stáří (vzhledem k deregulaci epigenetických mechanismů) (Charlesworth et al. 1994, Eickbush & Eickbush 2007, Raskina et al. 2008, Delprat et al. 2009, Li et al. 2017). Dynamika kvalitativních změn je spjata s molekulární evolucí sekvence a délky monomeru dané repetitivní DNA. Rychlost této evoluce se výrazně liší u různých repetit. Například zatímco sekvence genů pro rRNA je vysoce konzervovaná napříč eukaryotickými organismy, obzvláště mikrosatelity a satelitní DNA se vyvíjejí natolik dynamicky, že lze zaznamenat zásadní rozdíly na úrovni blízce příbuzných

druhů (Feliciello et al. 2014, Garrido Ramos 2017, Bracewell et al. 2019, Fotsing et al. 2019, Robledillo et al. 2020). Díky své dynamice mohou být tandemové repetice využívány jako markery pro genotypování jedinců a populací (Jeffreys et al. 1985). Často lze také pozorovat výrazné polymorfizmy v jejich akumulaci a distribuci (např. Ananiev et al. 2005, Chirino et al. 2020).

2.1.1 Tandemově uspořádané repetitivní sekvence

Vzhledem k zaměření mé diplomové práce jsem se v následujícím textu blíže věnovala zejména multigenovým rodinám (rDNA), satelitní DNA, minisatelitům a telomerické DNA.

2.1.1.1 Multigenové rodiny

Mezi multigenové rodiny řadíme skupiny genů, které vznikly genovou duplikací v průběhu evoluce a zachovaly si více než 50% shodu sekvence (Martins & Wasko 2004). Tyto tzv. paralogy jsou v genomu buď rozptýleny nebo uspořádány v tandemu. Rozptýlené multigenové rodiny zahrnují např. geny pro čichové receptory savců, transferové RNA (tRNA) nebo geny proteinů vázajících mastné kyseliny (Nei & Rooney 2005). Multigenové rodiny uspořádané v tandemu mohou vytvářet středně repetitivní úseky. Příkladem jsou geny pro ribozomální RNA (rRNA), malé jaderné RNA (snRNA) a histony (López-Flores & Garrido-Ramos 2012). Tandemové uspořádání těchto genů usnadňuje jejich vizualizaci metodou FISH, na rozdíl od jedinečných sekvencí, které jsou obvykle pod detekčním limitem standardního protokolu. Další výhodou z hlediska cytogenetického mapování je fakt, že některé multigenové rodiny si zároveň zachovávají velice konzervovanou sekvenci napříč organismy a konkrétně kódující oblasti hlavního klastru (45S) rDNA se řadí mezi vůbec nejkonzervovanější sekvence napříč genomy (Hillis & Dixon 1991), a tudíž lze sondu připravenou z jednoho organismu použít na mapování rDNA u širokého spektra taxonů (Ráb et al. 1999, Silva et al. 2009).

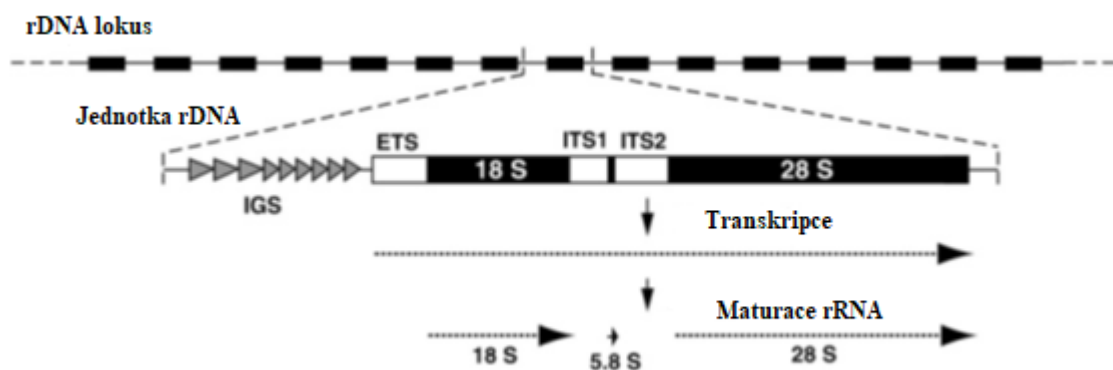
rDNA kóduje geny pro ribozomální RNA, která je esenciální stavební komponentou ribozomů. Jelikož každá buňka potřebuje mnoho ribozomů pro udržení potřebné hladiny proteosyntézy, a protože na rozdíl od mRNA se rRNA nedá využít opakovaně pro syntézu výsledného produktu (neboť každá kopie se stane součástí pouze jednoho konkrétního ribozomu), je potřeba syntézu rRNA zabezpečit nejen tandemovým uspořádáním kopií rDNA, ale i jejich velmi intenzivní transkripcí (recentní přehled viz Schöfer & Weipoltshammer 2018). Proto rRNA obvykle představuje asi 80–90 % celkové buněčné RNA (Palazzo & Lee 2015).

Hlavní klastř rDNA se skládá z genů pro 18S, 28S a 5,8S a společně je označován jako 45S rDNA (hodnoty vyplývají z pohybu částic v hustotním gradientu při izopyknické centrifugaci). Celá jedna transkripční jednotka je dále tvořena dvěma vnějšími přepisovanými mezerníky (ETS – external transcribed spacers) a dvěma vnitřními přepisovanými mezerníky (ITS – internal transcribed spacers). Oblast mezi transkripčními jednotkami je označována jako mezigenový mezerník (IGS – intergenic spacer) a obsahuje regulační oblasti (obr. 2) (Long & Dawid 1980, Eickbush & Eickbush 2007). Při expresi 45S rDNA v interfázi se kolem této oblasti vytváří jadérko, proto je také nazývána jako oblast nukleolárního organizátoru (NOR). Jadérko je nemembránová organela, ve které probíhá většina kroků biosyntézy ribozomů a zároveň se účastní celé řady dalších důležitých pochodů v buňce (Scheer et al. 1993, Tsekrekou et al. 2017)

Klastř 5S rDNA je tvořen geny pro 5S rRNA, kde se kódující oblasti pravidelně střídají s nepřepisovanými mezerníky (NTS – non-transcribed spacers). 5S rDNA se obvykle nachází na jiných chromozómech než NOR (Martins & Wasko 2004, Sochorová et al. 2018). Zatímco kódující sekvence 5S rRNA (120 bp) je mezidruhově velmi konzervativní, NTS jsou vysoce variabilní sekvenčně i délkově, jak je patrné u různých organismů, ale obzvláště u ryb (Martins & Wasko 2004, Merlo et al. 2013, Rebordinos et al. 2013, Vierna et al. 2013). Na rozdíl od genů v klastru 45S rDNA dosud není zcela objasněno, jakou úlohu hraje 5S rRNA v ribozomu, ale přisuzuje se jí role ve stabilizaci struktury ribozomu, koordinaci konformačních změn a aktivitě peptidyltransferázové domény (Dinman 2005, Huang et al. 2020).

Evoluce klastru 45S rDNA je charakterizována procesem označovaným jako tzv. „concerted evolution“. Jedná se o obecný model evoluce tandemových repetice, ve kterém se všechny kopie dané repetice v daném konkrétním taxonu vyvíjejí jako jedna jednotka, a nikoliv nezávisle na sobě. K tomu výrazně přispívají dva mechanismy: nerovnoměrný crossing-over a genová konverze. Tyto procesy pod vlivem purifikující selekce pomáhají odstraňovat mutované kopie repetice a tím udržovat homogenitu sekvence mezi klastry (Nei & Rooney 2005, Eickbush & Eickbush, 2007). Pro vysvětlení evoluce jiných multigenových rodin, zejména klastřů 5S rDNA, je nutné „concerted evolution“ doplnit o (nebo nahradit za) koncept tzv. „birth-and-death evolution“, kde se předpokládá vznik nových variant repetice genovou duplikací a pokud se následně fixují, jsou nadále udržovány v genomu výše uvedenými homogenizačními procesy jako nezávislý klastř (Nei & Rooney 2005, Pinhal et al. 2011). Výskyt různých sekvenčních variant 5S rDNA (které jsou obzvláště časté u ryb) může odrážet

např. tkáňově-specifickou úlohu nebo role v různých fázích vývoje organismu (Merlo et al. 2013, Rebordinos et al. 2013, de Barros et al. 2017, Locati et al. 2017).



Obr. 2: Struktura klastru 45S rDNA (upraveno podle Eickbush & Eickbush, 2007)

2.1.1.2 *Satelitní DNA, minisatelity a mikrosatelity*

Satelitní DNA (satDNA) představuje vysoce repetitivní tandemově uspořádané sekvenční. Svůj název dostala podle satelitního píku, který se vytvoří po centrifugaci v hustotním gradientu chloridu cesného (Kit 1961). Délka monomeru se obvykle pohybuje v rozmezí 100–1000 nukleotidů a daná repetice tvoří klastry dlouhé desítky kilobází (kb) až několik megabází (Mb). Recentní definice satDNA zahrnuje i repetice s monomery kratšími než 100 nt, pakliže tyto tvoří dostatečně dlouhé klastry. Ve své práci jsem zachovala členění na satDNA, minisatelity a mikrosatelity. SatDNA tvoří hlavní složku konstitutivního heterochromatinu, zejména v oblastech telomer a centromer (kde obvykle několik typů satDNA spolu s transponovatelnými elementy tvoří více komplexní uspořádání) a mohou se dále preferenčně akumulovat v oblastech se sníženou četností rekombinace a nižší purifikující selekcí, tedy např. v nerekombinujících částech pohlavních chromozómů a na B chromozómech (Charlesworth et al. 1994, López-Flores & Garrido-Ramos 2012, Garrido-Ramos 2017, Thakur et al. 2021). SatDNA představuje u rostlin až 20 % jaderné DNA, u některých druhů hlodavců a hmyzu až 50 %, u člověka je to pak 6–8 % (López-Flores & Garrido-Ramos 2012, Lopes et al. 2021). Struktura, organizace, sekvenční a distribuce v genomu je u satDNA do značné míry druhově specifická, a to i mezi blízce příbuznými liniemi (Felicciello et al. 2014, Garrido Ramos 2017, Bracewell et al. 2019, Robledillo et al. 2020), neboť satDNA je spolu s mikrosatelity považována za nejdynamičtější složku genomu (López-Flores & Garrido-Ramos 2012, Garrido-Ramos 2017, Fotsing et al. 2019). Vysvětlení, proč se může satDNA lišit i mezi blízce

příbuznými druhy podává tzv. „library hypothesis“, která říká, že příbuzné druhy sdílejí společnou „knihovnu“ sekvencí satDNA, a počet kopií každé satDNA může v průběhu evoluce výrazně expandovat či se redukovat, čímž se mezi danými druhy následně může výrazně lišit distribuce různých motivů satDNA (Fry & Salser 1977, Thakur et al. 2021). Díky těmto vlastnostem může analýza satDNA přispět k lepšímu pochopení evolučních vzdáleností mezi blízkými příbuznými druhy a případně naznačit možné nesrovnalosti v uspořádání fylogenetických stromů (Suárez-Santiago et al. 2007). Organismy mohou mít ve svém genomu různý počet motivů satDNA, které se mezi sebou liší svým procentuálním zastoupením (některé satDNA jsou dominantní, jiné minoritní) (Garrido Ramos 2017). Celkový souhrn satelitní DNA v genomu se označuje jako satelitom (termín navržen v práci Ruiz-Ruano et al. 2016) a dosud rekordní satelitom co do počtu motivů byl odhalen u ryby *Megaleporinus macrocephalus* (164 různých motivů; Utsunomia et al. 2019) a za zmínku stojí rovněž cvrček *Eneoptera surinamensis* s rekordní diverzitou satelitů na pohlavních chromozómu neo-Y (39 z 45 motivů nalezených u tohoto druhu; Palacios-Gimenez et al. 2017).

Dynamika satDNA s sebou zároveň přináší nevyhnutelné komplikace v tom smyslu, že pro námi studovaný organismus se často musí izolovat a charakterizovat nové specifické typy satDNA, neboť ty často bývají specifické pro danou evoluční linii, rod a někdy i omezené na konkrétní druh. Detekce nových satDNA byla v minulosti velmi pracná a prováděla se pomocí štěpení genomové DNA různými restrikčními endonukleázami, což byl postup, který v lepším případě vedl k objevení a charakterizaci jedné či několika málo nových repetitivních DNA (Cabral-de-Mello & Martins 2010, Garrido-Ramos 2017). V současné době se čím dál častěji používá efektivnější způsob, který je založen na sekvenování genomu pomocí technologií nové generace (next generation sequencing, NGS) o nízké úrovni pokrytí genomu (tzv. „coverage“). Hrubá sekvenční data, která při nízké „coverage“ zahrnují velmi málo unikátních oblastí genomu (na které v tomto případě není zacíleno), zároveň nemají odfiltrované žádné repetitivní sekvence a ty se následně analyzují různými bioinformatickými přístupy, např. pomocí programu RepeatExplorer. Cílem této analýzy není poskládat jednotlivé úseky sekvenčních čtení (neboli reads) do kontinuálních sekvencí (kontigů), nýbrž na základě podobnosti sekvencí vytvořit shluky frekventovaně se překrývajících readů, které jsou pak vyhodnoceny jako repetitivní sekvence (přehled viz Novák et al. 2020). Tímto způsobem se dá relativně snadno kvantifikovat a zároveň (díky možnosti grafických výstupů) taktéž kvalitativně analyzovat repetitivní DNA v daném genomu. Můžeme tak nejen objevit celou řadu nových repetitivních sekvencí (které se dají následně použít jako markery pro FISH), ale i získat informace o jejich

procentuálním zastoupení v genomu, zjistit různé sekvenční varianty a případně odhalit složitější uspořádání více druhů repetice ve společném klastru. Profily repetitivní DNA se navíc dají porovnávat mezidruhově či v rámci druhu (mezipopulačně nebo např. mezi pohlavími). Jednou z nevýhod programu RepeatExplorer je, že obvykle neidentifikuje krátké repetitivní motivy, typicky např. mikrosatelity; nicméně může odhalit některé minisatelity (Novák et al. 2020).

Oproti mikrosatelitům, které mají krátké monomery (pod 10 bp), minisatelity jsou repetice o délce monomeru 10-100 bp a počet opakování v tandemu je také v desítkách až stovkách (López-Flores & Garrido-Ramos 2012). Polymorfismus mikrosatelitů a minisatelitů se hojně využívá ke genotypizaci a u rodičovských testů ve forenzních analýzách (Jeffreys 1985, López-Flores & Garrido-Ramos 2012).

2.1.1.3 Telomery

Telomery jsou nukleoproteinové komplexy nacházející se na koncích eukaryotických chromozómů. Mezi jejich hlavní funkce patří řešení tzv. „end-replication problem“, kdy se vlivem mechanismu replikace DNA zkracují konce chromozómů při každém dělení o zhruba 40-250 nt. Další důležitou funkcí je ochrana konců chromozómů před enzymatickou degradací, před mechanismy signalizující a opravující dvouvláknové zlomy a také před fúzí mezi chromozómy, tzv. „end-protection problem“ (přehledy viz O'Sullivan & Karlseder 2010, Srinivas et al. 2020).

Telomery většiny eukaryot jsou složeny z tandemově uspořádaných G-bohatých sekvencí a dále ze specifické telomerické RNA a telomerických vazebných proteinů, které mají důležité funkce včetně regulace délky telomer. Základní jednotka opakování telomerické repetice (většinou mezi 5-8 nt) je specifická pro danou skupinu organismů (přehledy viz O'Sullivan & Karlseder 2010, Srinivas et al. 2020). U obratlovců se jedná o hexamer (TTAGGG)_n (Moyzis et al. 1988, Meyne et al. 1990).

Přestože jsou telomery definovány jako koncové úseky chromozómů, mohou být pozorovány také v jiných částech chromozómů jako tzv. intersticiální telomerické sekvence (ITS) (Meyne et al. 1990, Ocalewicz 2013). Ty se dají klasifikovat podle různých kritérií, nejčastěji však jako i) krátké s-ITSs (short ITSs), které se pravděpodobně vyskytují v každém genomu, ale často je neodhalíme cytogeneticky a ii) heterochromatinové het-ITS, které tvoří nápadné klastry amplifikovaných repetice, asociují s heterochromatinem a řadou jiných repetitivních sekvencí a často se už jedná spíše o odvozené telomere-like sekvence (Lin & Yan

2008, Ruiz-Herrera et al. 2008). Zatímco s-ITSs vznikají pravděpodobně častěji v důsledku opravných syntéz DNA, het-ITSs mohou častěji představovat marker předchozích chromozómových přestaveb, např. fúzí či inverzí, pakliže tyto události jsou evolučně relativně mladé (tj. nedošlo zatím k erozi těchto sekvencí) a/nebo v průběhu jejich vzniku nedošlo k eliminaci telomer (Meyne et al. 1990, Slijepcevic 1998, Ruiz-Herrera et al. 2008, Lin & Yan 2008). Existují ale práce, které ukazují abnormální distribuce (či absence) ITSs, které se výše uvedeným vysvětlením vymykají (např. Rovatsos et al. 2015).

Vedle analýzy dynamiky karyotypů nám mapování telomerického motivu pomocí FISH může pomoci rozluštit složité struktury párujících chromozómů v meiotických multivalentech a také určit správný počet chromozómů, které multivalent tvoří (např. Grützner et al. 2004, Šíchová et al. 2016).

2.2 Analýza repetitivních sekvencí u ryb

Mapování sekvencí DNA na chromozómech je důležitým nástrojem pro identifikaci homologních chromozómů při studiu karyotypů a pro porovnávání jejich dynamiky mezi druhy a liniemi a při objevování kryptických druhů a hybridních či jinak anomálních jedinců (Cioffi et al. 2012, Zhang et al. 2015, Goes et al. 2020). Evoluce a dynamika karyotypu mohou být spjaté se změnami na úrovni organizace jádra, včetně vývoje a exprese důležitých genů (Vara et al. 2021), a to může mít vliv na vznik reprodukčních bariér mezi populacemi původně stejného druhu (např. Kitano et al. 2009). Jedná se o velmi diskutované téma (nejen) u obratlovců (přehled viz Damas et al. 2021) a cytogenetické mapování u ryb jakožto bazální skupiny obratlovců tak přispívá k objasnění řady aspektů související s organizací genomu a vývojem obratlovců (Cabral-de-Mello & Martins 2010).

Jelikož u studenokrevných obratlovců nefunguje většina technik pruhování chromozómů tak jako u teplokrevných obratlovců (z důvodu odlišné organizace sekvencí na chromozómech; shrnuto v Rábová et al. 2015), nejpoužívanějšími markery pro cytogenetickou analýzu těchto skupin jsou různé typy repetitivních sekvencí a obzvláště ty, které jsou tandemově uspořádané (rRNA, satDNA, snDNA, histonová DNA aj.). Tyto markery mají různou dynamiku, a tudíž i různou vypovídací hodnotu. Například rDNA má mezidruhově vysoce konzervované sekvence DNA, což umožňuje využití jedné sondy (především 45S rDNA) na více příbuzných druhů, jak jsem již uvedla v kapitole 2.1.1.1. Na druhou stranu, sekvenční konzervativita a vysoká transkripční aktivita je zároveň důvodem nestability repetitivních sekvencí.

rDNA (Eickbush & Eickbush 2007, Raskina et al. 2008, Potapova & Gerton 2019, Warmerdam & Wolthuis 2019) a jejich dynamice dále napomáhá častá asociace s transponovatelnými elementy (Raskina et al. 2008, Zhang et al. 2008). U rDNA tak často sledujeme distribuci, která spíše odráží momentální dynamiku genomu nežli karyotypovou diferenciaci (Symonová et al. 2013, Sember et al. 2015, da Silva et al. 2019a). Oproti tomu klastry genů pro histony obecně lépe korelují s chromozómovými přestavbami, ale jejich sekvence DNA je často mezidruhově odlišná do té míry, že se musí připravovat druhově specifické sondy (např. Zhang et al. 2007, Provazníková et al. 2021). Možná proto u ryb takové studie nejsou příliš časté (např. Silva et al. 2013). Naopak přibývá studií využívajících geny pro malé jaderné RNA, především U2 snDNA, kde konzervativita sekvence umožňuje aplikovat sondu i na více či méně blízce příbuzné druhy a distribuce klastrů obvykle mezidruhově odpovídá homeologickým chromozómům (např. Sember et al. 2018, 2020). Nejvíce evolučně dynamickými tandemovými repeticemi jsou satDNA a mikrosatelity (Garrido-Ramos 2017, Fotsing et al. 2019, Thakur et al. 2021) a v případě satDNA je nutné obvykle nejdříve charakterizovat druhově specifické motivy (viz kapitola 2.1.1.2).

2.2.1 Distribuce různých typů tandemových repetit u ryb a jejich vypovídací hodnota pro analýzu karyotypu

2.2.1.1 rDNA

rDNA je zdaleka nejvyužívanějším cytogenetickým markerem u nemodelových organismů (Sochorová et al. 2018). U paprskoploutvých ryb bylo doposud (ke dni 3.8.2021) publikováno přes 700 prací, ve kterých byly mapovány 5S, 45S nebo oba klastry rDNA u různě velkého souboru druhů (A. Sember, nepublikovaný přehled). 5S i 45S rDNA se u většiny druhů nacházejí na jednom chromozómovém páru, přičemž většinou okupují jiné chromozómové páry (Gornung 2013, Sochorová et al. 2018). U mnoha druhů ale FISH odhalila vyšší počet signálů jedné či druhé, nebo dokonce obou rDNA (např. Mantovani et al. 2005, Sember et al. 2015, Traldi et al. 2016) a mezidruhové rozdíly mohou být i velmi výrazné (Lima-Filho et al. 2014). Čím vyšší počet klastrů, tím vyšší pravděpodobnost, že se 45S a 5S rDNA vyskytnou na stejném chromozómu (= jsou tzv. syntenní); někdy k sobě oba klastry bezprostředně přiléhají a jindy dokonce přímo kolokalizují (např. Bueno et al. 2014, Sember et al. 2015). Nepravidelný výskyt syntenní organizace 5S a 45S rDNA napříč fylogenetickým stromem ryb naznačuje, že se jedná spíše o vedlejší produkt dynamiky rDNA než o pozitivně selektovanou asociaci, která by se

trvale fixovala v evoluci (např. Sember et al. 2015). V některých případech je tato asociace ale vhodným markerem pro detekci druhu nebo taxonomické skupiny (Barby et al. 2018, Glugoski et al. 2020).

Použití rDNA jako cytotaxonomického markeru se vyplácí zejména tam, kde je obtížné jednotlivé druhy navzájem od sebe odlišit na základě morfologických znaků (Glugoski et al. 2020), z důvodů rychlé karyotypové evoluce v geograficky oddělených populacích (Cioffi et al. 2012, do Nascimento et al. 2018) a také u skupin, kde je mezidruhově vysoce konzervována struktura karyotypu (např. Barby et al. 2018, Motta-Neto et al. 2019). Při relativně stabilním počtu signálů můžeme odhalit i hybridní jedince (např. Goes et al. 2020), potvrdit polyploidii a odlišit autopolyploida od allopolyploida (Zhang et al. 2015) nebo odhalit synonymní rybí druhy (Bellafronte et al. 2005). Nicméně při interpretaci dat je třeba brát v potaz různé možné komplikace; např. i tehdy, pokud počet klastrů není příliš variabilní a pozice rDNA mezi druhy se může zdát konzervovaná, komplementární metodou (např. pomocí malovacích celochromozómových sond) se může ukázat, že konkrétní pár signálů rDNA vlastně neleží na homeologních chromozómech, jak bylo například zjištěno u jihoamerických paúhořovců rodu *Gymnotus* (Milhomem et al. 2013). Dále se u řady druhů ryb vyskytují polymorfizmy rDNA nejrozličnějšího typu. Nejčastější je délkový polymorfismus klastru (především 45S) rDNA mezi homology, který se vyskytuje velmi hojně i u jiných organismů a je způsoben zejména nerovnoměrným crossing-overem, ale může také odrážet odlišnou úroveň spiralizace DNA mezi homologními klastry (např. Ghigliotti et al. 2010, Sember et al. 2015). Délkový polymorfismus může naopak v extrémním případě vést i ke snížení kopií rDNA na jednom z homologů pod úroveň rozlišovací schopnosti FISH (případně byl na daném chromozómu lokus rDNA skutečně zcela eliminován). My poté pozorujeme polymorfismus ve smyslu přítomnosti/absence signálu (např. Pereira et al. 2012, Bueno et al. 2014, Sember et al. 2015). Tato variabilita je v dalších generacích podpořena náhodnou meiotickou segregací chromozómů s/bez signálu do gamet (diskutováno v Rábová et al. 2001). Podobně se může v populaci vyskytnout polymorfismus asociovaný s inverzí klastru rDNA na jednom z homologních chromozómů (Bueno et al. 2014, Sember et al. 2015) a byl popsán i případ, kdy inverze zahrnující klastr rDNA byla letální u inverzních homozygotů (Porto-Foresti et al. 2004). Pravděpodobnost odhalení polymorfismu souvisí s velikostí analyzovaného vzorku (počet jedinců a zastoupení různých populací) a ta je v mnoha studiích zaměřených na ryby omezená. Uvedené typy polymorfizmů se totiž mohou projevit na různých úrovních – mezi různými populacemi (např. Singh et al. 2009, Rosa et al. 2012, Bueno et al. 2014) nebo v rámci populace

(např. Rábová et al. 2001, Utsunomia et al. 2014) a dokonce jsou známy i případy polymorfizmu rDNA mezi buňkami v rámci jedince (např. Spóz et al. 2017).

Mezi další úskalí mapování rDNA patří možnost rozšíření pouze části klastru rDNA po některých chromozómech, takže odhalený hybridizační vzor závisí na tom, k jakému úseku je komplementární naše hybridizační sonda (Lohe & Roberts 1990, Symonová et al. 2013). Navíc jak již bylo řečeno výše, 5S rDNA se v genomech ryb může vyskytovat ve více sekvenčních variantách (Merlo et al. 2013, Rebordinos et al. 2013, Barros et al. 2017, Locati et al. 2017) a dokonce byl u ryb také dokázán horizontální přenos 5S rDNA mezi vzdálenými druhy, konkrétně mezi žabohlavcem východoatlantským (*Halobatrachus didactylus*) a mořanem zlatým (*Sparus aurata*) (Merlo et al. 2012). Poslední úskalí mapování rDNA souvisí s nedávnou studií, ve které se ukázalo, že míra znečištění životního prostředí může výrazně měnit distribuci rDNA v genomech jedinců stejného druhu (da Silva et al. 2019b). To ale, na druhou stranu, může pomoci při studiu vlivu prostředí na dynamiku genomu.

Zatím nejvyšší počet signálů 5S rDNA v rámci ryb byl objeven u keříčkovce žabího *Clarias batrachus* (54 signálů; Maneechot et al. 2016). Dalším zajímavým příkladem je štika *Esox lucius*, u které klastry 5S rDNA leží v koncových částech 37 z 50 chromozómů jejího karyotypu a bylo zjištěno, že většina kopií 5S rDNA je schopna vytvořit funkční 5S rRNA, tj. nejedná se o pseudogeny (Symonová et al. 2017). Rekordních 54 signálů bylo zaznamenáno i pro klastr 45S, konkrétně u trnobřiché ryby *Schizodon fasciatus* (de Barros et al. 2017).

Určité vlastnosti klastrů rDNA jako je vysoká transkripční aktivita (tj. náchylnost k poškození DNA z důvodu velmi rozvolněného chromatinu a možné kolize s replikační mašinerií), tendence akumulovat transponovatelné elementy, náchylnost k ektopickým rekombinacím a možné kontakty klastrů 45S rDNA z různých chromozómů ve sdíleném jádru (Eickbush & Eickbush 2007, Raskina et al. 2008, Zhang et al. 2008, Potapova & Gerton 2019, Warmerdam & Wolthuis 2019) způsobují, že se klastry rDNA v relativně vyšší míře zúčastňují chromozómových přestaveb a mohou tedy, působit jako cytogenetické markery těchto přestaveb. U ryb napomáhá tomuto scénáři častá přítomnost konkrétně klastru 45S rDNA na koncích chromozómů (kolem 58 %; Sochorová et al. 2018), neboť toto uspořádání podporuje ektopickou rekombinaci (např. Cazaux et al. 2011). Na druhou stranu, i když se minoritní klastr 5S rDNA vyskytuje s vyšší četností spíše v intersticiálních oblastech chromozómů, jeho dynamiku u ryb to oproti původním předpokladům (Martins & Galetti 2001), zdá se, příliš neomezuje (např. da Silva et al. 2011). rDNA se vedle detekce inverzí (např. Porto-Foresti et al. 2004, Bueno et al. 2014) projeví jako marker centrických

fúzí, jelikož byly nalezeny přímo v předpokládaných fúzních místech nebo v jejich bezprostřední blízkosti. Většina zaznamenaných případů u ryb zahrnuje 5S rDNA, která byla nalezena ve fúzním místě bez (Sember et al. 2015, Sember et al. 2020a) nebo s dalším markerem (typicky s ITSs; např. Rosa et al. 2012, Favarato et al. 2016, de Barros et al. 2017). Klastř 45S rDNA ve fúzním místě byl taktéž nalezen (např. Supiwong et al. 2019, Sember et al. 2020a).

Klastry rDNA se vyskytují i na pohlavních chromozómech a mohou tak být nápomocné při studiu evoluce těchto specifických oblastí genomu. 45S rDNA je například přítomna na W chromozómech všech studovaných tetér rodu *Triportheus* (systém ♂ZZ/♀ZW; Yano et al. 2017) a vyskytuje se na obou (ZW) pohlavních chromozómech tří druhů characidií (*Characidium timbuiense*, *C. lanei* a *C. pterostictum*; Scacchetti et al. 2015). Dále, pozice klastru 45S rDNA na pohlavních chromozómech u dvou karyotypových forem trahira *Hoplias malabaricus* pomohla objasnit mechanismus vzniku mnohočetného systému ♀X₁X₁X₂X₂/♂X₁X₂Y (karyomorfa D) ze systému ♀XX/♂XY (karyomorfa C) (Cioffi & Bertollo 2010). Repetice 5S rDNA byly také nalezeny na pohlavních chromozómech, konkrétně např. na X chromozómu hadaře *Ophisurus serpens* (Salvadori et al. 2018) nebo u jinožábrovky *Aulopus japonicus*, kde se amplifikovaly téměř po celé délce chromozómu W (Ota et al. 2003). U hlavačky *Dormitator latifrons* bylo možné určit pohlavní systém ♀XX/♂XY právě s přispěním detekce klastru 5S rDNA, který se nachází u tohoto druhu pouze na X chromozómu (Paim et al. 2020). Některé práce u ryb bohužel nebyly příliš důsledné v odlišení běžného polymorfizmu v počtu signálů rDNA od pohlavně vázané přítomnosti/absence signálu (diskutováno v Matoso et al. 2011). 5S rDNA se může nacházet i na mnohočetných pohlavních chromozómech ryb (např. Sember et al. 2015, přehled viz Sember et al. 2021) a konkrétně u antarktické ryby *Chionodraco hamatus* pomohla distribuce této multigenové rodiny objasnit mechanismus vzniku systému X₁X₂Y (Ghigliotti et al. 2013). U hartie *Harttia punctata* se na mnohočetných pohlavních chromozómech vyskytují dokonce oba klastry rDNA (5S rDNA na Y a 45S rDNA na X₁ v systému X₁X₂Y; Blanco et al. 2014).

2.2.1.2 Telomerické repetice a ITSs

ITSs byly objeveny u řady rybích druhů (Meyne et al. 1990, Ocalewicz 2013). V některých případech mohou ITS ko-lokalizovat ve fúzním místě s lokusem 5S rDNA (Rosa et al. 2012, Favarato et al. 2016, de Barros et al. 2017). ITSs se také objevují na mnohočetných

pohlavních chromozómech, např. na metacentrickém chromozómu Y u trahira *Erythrinus erythrinus* (Cioffi & Bertollo 2010), ale u přibližně poloviny systémů mnohočetných pohlavních chromozómů ryb, kde byla použita telomerická FISH, nebyly ITSs zaznamenány i přesto, že tyto systémy evidentně vznikly mechanismem fúze (shrnutí v Sember et al. 2021). Posledním a velmi neobvyklým příkladem distribuce telomerických sekvencí je jejich amplifikace po celé délce dvou mikrochromozómů u jesetera jezerního *Acipenser fulvescens* (Fontana et al. 2004).

2.2.1.3 Satelitní DNA

Jak jsem již podrobně popsala výše (kapitola 2.1.1.2), analýza satelitní DNA je vzhledem k její rychlé evoluci komplikovaná a má určitá specifika. Pomocí restričních endonukleáz byla objevena u ryb řada motivů, které pomohly charakterizovat některé aspekty evoluce genomu, karyotypu či specializovaných chromozómů. U jedné z bazálních skupin paprskoploutvých ryb, u jeseterů, probíhá evoluce satelitní DNA velmi pomalu a sekvence *PstI* a *HindIII* se vyskytují napříč celým řádem a jsou tak pro ně specifické (Robles et al. 2004). Konzervovanou satDNA lze najít i v rámci kostnatých ryb, kde byl modernějším způsobem analýzy (viz dále) objeven satelit CharSat01-52 vyskytující se napříč taxony trnoblíhých ryb (Characiformes) (dos Santos et al. 2021). Naopak řada satelitních DNA ryb se vyskytuje jen u blízce příbuzných druhů nebo pouze u jediného druhu. Například satelit 5S*HindIII* je specifický pro genom trahira malabarského *H. malabaricus*, vznikl z repetice 5S rDNA a vyskytuje se výhradně v centromerách, ve kterých může hrát funkční úlohu. Tento satelit pomohl objasnit mechanismus vzniku mnohočetných pohlavních chromozómů u tohoto druhového komplexu (Cioffi & Bertollo 2010). Podobně byl využit satelit Le*SpeI*, který se u *Megaleporinus elongatus* vyskytuje na třech (u samic) nebo na dvou (u samců) chromozómech a na základě pozorování této pohlavně-specifické distribuce autoři studie navrhli, že *M. elongatus* má místo klasického systému ♂ZZ/♀ZW pravděpodobně mnohočetný systém ♂Z₁Z₁Z₂Z₂/♀Z₁W₁Z₂W₂ (Parise-Maltempi et al. 2007). Důležitý vhlad do evoluce pohlavních chromozómů ZW u jihoamerických sladkovodních rodů *Parodon* a *Apareiodon* přineslo také mapování satelitu pPh2004 a specifického bloku heterochromatinu mikrodisekovaného z W chromozómu *Apareiodon ibitiensis* (sekvence WAp) (např. Schemberger et al. 2011). Mechanismus vzniku B chromozómu byl zase studován u tetry *Astyanax scabripinnis* mj. pomocí mapování satelitu As51 (Mestriner et al. 2000).

V posledních několika letech se objevily nové bioinformatické možnosti, jak využít data NGS z celogenomového sekvenování pro analýzu satelitní DNA. Jedním z nejběžněji používaných programů je RepeatExplorer, díky kterému byly rozšířeny možnosti identifikace a následného mapování nejrůznějších repetitivních sekvencí také u ryb. Např. u leporina velkohlavého *Megaleporinus macrocephalus* bylo identifikováno rekordních 164 motivů satDNA a 14 z nich bylo nalezeno specificky pouze na pohlavním chromozómu W (Utsunomia et al. 2019). Obdobně u příbuzného druhu *M. elongatus* se vyskytuje 9 typů satDNA exkluzivně pouze na dlouhém raménku pohlavního chromozómu W₁ (Crepaldi & Parise-Maltempi 2020). Pro evoluci pohlavního chromozómu W u rodu *Apareiodon* je zase typická akumulace transponovatelných elementů a mikrosatelitů, jak ukázaly analýzy programů RepeatExplorer a RepeatMasker (Schemberger et al. 2019). Sdílené motivy satDNA byly nalezeny u různých druhů teter rodu *Astyanax* (Silva et al. 2017) a distribuce některých satDNA naznačily vznik B chromozómu z pohlavních chromozómů u characíí (rod *Characidium*; Serrano-Freitas et al. 2020). Posledním zajímavým případem jsou sekavci rodu *Cobitis*, kde Marta et al. (2020) popsali sedm motivů satDNA, z nichž některé mohou sloužit jako druhově specifické markery (druhů *C. elongatoides*, *C. taenia*) a pomoci tak při charakterizaci rodičovských genomů hybridů a polyploidů, kteří se u těchto ryb hojně vyskytují.

2.2.1.4 Minisatelite

Minisatelity byly prozatím u ryb mapovány pouze na malém počtu druhů, konkrétně např. u lososa obecného (*Salmo salar*) (Pérez et al. 1999), čtverzubce zeleného (*Tetraodon nigroviridis*) (Fischer et al. 2004) a v neposlední řadě také u halančíka tyrkysového (*Nothobranchius furzeri*), u kterého byl konkrétně objeven GC-bohatý minisatelit s monomerem o délce 77 nt (Reichwald et al. 2009, 2015).

2.2.1.5 Mikrosatelite

Mikrosatelity jsou hojně používané v cytogenetických studiích u ryb, ale jelikož je často velmi obtížné interpretovat jejich hybridizační vzory, největší uplatnění mají při charakterizaci pohlavních a B chromozómů (např. Piscor & Parise-Maltempi 2016, Yano et al. 2016). Moje práce mapování mikrosatelitů nezahrnuje, tudíž se jimi zde nebudu detailněji zabývat.

2.3 Trendy karyotypové diferenciace kostnatých ryb

Kostnaté ryby (Teleostei) tvoří drtivou většinu druhové diverzity paprskoploutvých ryb a zároveň představují více než polovinu všech obratlovců na Zemi (Nelson et al. 2016). Navíc je tato skupina charakterizována vysokou plasticitou genomu (Ravi & Venkatesh 2008), která může souviset s tolerancí k hybridizaci a polyploidizaci a je pravděpodobně důvodem pozorovaného velkého rozsahu ve velikostech genomů (0,39–248 pg na haploidní genom) a diploidního počtu chromozómů ($2n = 12\text{--}446$) (Arai 2011). Analýzu karyotypů kostnatých ryb někdy zpestřuje přítomnost pohlavních chromozómů (viz dále), B chromozómů a různých chromozómových polymorfizmů či karyotypových forem (Phillips & Ráb 2001, Ene 2003, Cabral-de-Mello & Martins 2010, Arai 2011, Cioffi et al. 2012, Piscor & Parise Maltempi 2016, Glugoski et al. 2020).

I přes výše zmíněnou variabilitu se u většiny Teleostei počty chromozómů pohybují v rozmezí $2n = 44\text{--}52$ a nejčastěji (zhruba polovina případů) je dokumentován počet 48 nebo 50 chromozómů (Mank & Avise 2006, Molina et al. 2014). Za ancestrální stav se u kostnatých ryb považuje 48 jednoramenných (konkrétně akrocentrických) chromozómů (Kohn et al. 2006).

Různé skupiny kostnatých ryb se mohou výrazně lišit dynamikou a mechanismy karyotypové evoluce (Yoshida & Kitano 2021). Některé skupiny si udržují velmi stabilní $2n$ a případně i karyotypovou strukturu. Vhodným příkladem je řád máloostných ryb (Cypriniformes), kde nepolyploidní druhy mají velmi často 48 nebo 50 chromozómů (Arai 2011, Pereira et al. 2012, Sember et al. 2015, Sember et al. 2020b), ale na druhou stranu je zde častý výskyt polyploidie (Flajšhans et al. 2013). Na úrovni čeledi je pak vysoká stabilita $2n$ i struktury karyotypu u skupin Notopteridae (nožovcovití; sladkovodní) a Haemulidae (chrochtalovití; mořské) (Barby et al. 2018, Motta-Neto et al. 2019). Naopak u jiných skupin byla dokumentována značná mezidruhová či vnitrodruhová variabilita $2n$ a struktury karyotypu. Na úrovni rodu jsou vysoce variabilní např. paúhořovci rodu *Gymnotus* ($2n=34\text{--}54$; Milhomem et al. 2013, Silva et al. 2019) taxonomicky dosud neuspokojivě charakterizovaný rod sumcovitých ryb (krunýřovci) rodu *Ancistrus* ($2n=34\text{--}54$; Glugoski et al. 2020) a dále taxony zahrnující kryptické druhy a druhové komplexy a různé chromozómové polymorfizmy jako např. tetry rodu *Astyanax* (Silva et al. 2013, Piscor & Parise-Maltempi 2016) či hojně studovaný druhový komplex trahira malabarského (*Hoplias malabaricus*) (Cioffi et al. 2012). Dále se na různých taxonomických úrovních odehrávají výrazné změny karyotypů prostřednictvím přestaveb Robertsonova typu (centrické fúze či rozpady), a to typicky např. u lososovitých ryb (čeleď Salmonidae; Phillips & Ráb 2001), antarktických Notothenoidei (Ghigliotti et al. 2013,

Auvinet et al. 2020), štik (čeleď Umbridae; Ráb 2004), hadařovitých (Ophichthidae; Salvadori et al. 2018) a dále pak u jihoamerických drobnoustek rodu *Nannostomus* (Sember et al. 2020a) a halančíků rodů *Chromaphysomion* (Völker et al. 2008) a *Nothobranchius* (Krysanov & Demidova 2018), přičemž právě halančíci rodu *Nothobranchius* jsou předmětem mého cytogenetického výzkumu. Známý jsou i populační polymorfizmy z hlediska přítomnosti homozygotů/heterozygotů pro centrickou fúzi. Hojně se vyskytují u lososovitých (Phillips & Ráb 2001) a dále pak u některých zástupců čeledi Gobiidae (Giles et al. 1985, Ene 2003) nebo např. u mřenky *Schistura notostigma* (Sember et al. 2015).

2.4 Determinace pohlaví a pohlavní chromozómy ryb

Kostnaté ryby jsou známé značnou variabilitou mechanismů, které určují jejich pohlaví. Druhy s environmentálním určením pohlaví (ESD) jsou citlivé na faktory prostředí v kritickém období vývoje gonád. Nejčastěji je kritickým parametrem teplota vody, ale může to být i pH a další vlivy jako sociální interakce jedinců v populaci aj. (Shen & Wang 2019). Genetické určení pohlaví (GSD) je u ryb buď polygenní (tj. buď působením většího počtu genů malého účinku na autozómech nebo přechodnou přítomností dvou různých systémů pohlavních chromozómů, mezi nimiž je ustanoven vztah dominance a recesivity) anebo monogenní (tj. určeno ústředním genem determinujícím pohlaví, který se nachází na jednom z pohlavních chromozómů). GSD a ESD se navíc zdají být jen krajními body kontinua, neboť existují případy, kdy např. genetická determinace pohlaví může být ovlivněna teplotou prostředí apod. (Devlin & Nagahama 2002, Guiguen et al. 2019, Shen & Wang, 2019).

Znalost mechanismů determinace pohlaví u ryb je důležitá s ohledem na proměnlivost podmínek v prostředí a obzvláště vzhledem k probíhajícím globálním změnám klimatu, kdy např. dlouhodobé výkyvy teplot mohou u druhů s environmentálním určením pohlaví způsobovat výrazné vychýlení poměru pohlaví od očekávaného 1:1, což může mít neblahý vliv na přežívání populací daného druhu (např. Honeycutt et al. 2019). Dále se těchto znalostí využívá v chovech za účelem konzervace druhů anebo pro komerční účely (produkce masa, kaviáru, prodej akvarijních ryb aj.), kde se u druhů s výrazným pohlavním dimorfismem často preferenčně chová jen jedno pohlaví (Guiguen et al. 2019, Shen & Wang 2019).

U ryb bylo dosud odhaleno (cytogeneticky, genomicky nebo jiným způsobem) minimálně 440 případů taxonů s pohlavními chromozómy (Sember et al. 2021). Nejedná se přímo o 440 druhů, neboť není neobvyklé, že různé populace téhož rybího druhu disponují

jiným systémem pohlavních chromozómů, případně je zjištěna přítomnost druhového komplexu nebo kryptických druhů (Cioffi et al. 2012, do Nascimento et al. 2018, Sember et al. 2021). U ryb bylo dosud popsáno devět systémů chromozómového určení pohlaví, pokud nepočítáme situace, kdy na determinaci pohlaví má vliv přítomnost nadpočetného tzv. B chromozómu (např. Gammerdinger & Kocher 2018). Kromě standardních systémů ♀XX/♂XY a ♂ZZ/♀ZW, můžeme u ryb pozorovat systémy odvozené (♀XX/♂X0, ♂ZZ/♀Z0) a mnohočetné (♀X₁X₁X₂X₂/♂X₁X₂Y, ♀XX/♂XY₁Y₂, ♀X₁X₁X₂X₂/♂X₁Y₁X₂Y₂, ♂ZZ/♀ZW₁W₂, ♂Z₁Z₁Z₂Z₂/♀Z₁W₁Z₂W₂) (Devlin & Nagahama 2002, Kitano & Peichel 2012, přehled viz Sember et al. 2021).

Systémy pohlavních chromozómů se mohou u ryb výrazně lišit na úrovni blízce příbuzných druhů, mezidruhově i – jak již zmiňuji výše – mezi populacemi stejného druhu (Mank & Avise 2009, Cioffi et al. 2012, Scharl et al. 2016, Glugoski et al. 2020). Například u čeledi koljuškovitých (Gasterosteidae) se mezi jednotlivými druhy vyskytují systémy XY, X₁X₂Y a také ZW, které vznikly nezávisle na sobě a zahrnují různé vazebné skupiny (Kitano et al. 2009, Ross et al. 2009). Vysoká a dobře prostudovaná variabilita pohlavních chromozómů je známa i u cichlid z jezer východní Afriky (Malawi, Tanganyika a Viktoriino jezero) a dále u medak rodu *Oryzias* (zahrnující modelový druh, medaku japonskou *Oryzias latipes*) (přehled viz. Gammerdinger & Kocher 2018). Vedle častých přechodů mezi systémy pohlavních chromozómů je u některých taxonů ryb znám i polymorfismus v míře degenerace nepárového pohlavního chromozómu (Y nebo W). Typickým případem je polymorfismus Y chromozómu u pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss* (Felip et al. 2004, Phillips et al. 2004, Ocalewicz et al. 2007). Dále, Nanda et al. (2014) objevili mezidruhový polymorfismus ve velikosti heterochromatinového bloku na Y chromozómu v rámci tří druhů živorodek (*Poecilia reticulata*, *P. wingei*, *P. obscura*); u druhu *P. reticulata* byl polymorfismus pozorován i mezi populacemi (Nanda et al. 2014). Mezipopulační polymorfismus v diferenciaci Y chromozómu byl zjištěn i u halančíka tyrkysového *Nothobranchius furzeri* (Reichwald et al. 2015), tedy druhu, který je předmětem i mé práce.

Výhodou a zároveň nevýhodou výzkumu rybích pohlavních chromozómů je jejich často výrazně homomorfní charakter. To znamená, že úroveň jejich diferenciaci není natolik pokročilá, aby se to projevilo v cytologických rozdílech mezi párovým a nepárovým pohlavním chromozómem, takže jejich přítomnost může standardní cytogenetické analýze uniknout. Důvodem časté homomorfie může být relativní evoluční mládí rybích pohlavních chromozómů, ale tento parametr může být zavádějící. Například velmi mladé pohlavní chromozómy u cichlid

a některých jihoamerických sladkovodních ryb (Henning et al. 2011, Gammerdinger & Kocher 2018) vznikly teprve před pouhými několika sty tisíci až dvěma miliony let, nicméně i evolučně poměrně staré (a kupodivu stále homomorfní) pohlavní chromozómy jsou u ryb známy - např. minimálně 56 milionů let starý systém XY u štikotvárných ryb (Pan et al. 2021) a nelze nezmínit pravděpodobně 180 milionů let starý homomorfní systém ZW u jeseterů (Kuhl et al. 2021). Jiným důvodem homomorfie rybích pohlavních chromozómů jsou časté přechody mezi systémy, které znamenají návrat na začátek procesu diferenciace (diskutováno v Sember et al. 2021). Rybí pohlavní chromozómy jsou tak vhodnými objekty pro studium časných fází evoluce těchto specializovaných oblastí genomu, protože na rozdíl např. od silně degenerovaného savčího systému XY lze lépe rozpoznat a charakterizovat jednotlivé fáze diferenciace a zkoumat zodpovědné molekulární mechanismy a selekční tlaky (Schartl et al. 2016).

2.5 Anuální halančící rodu *Nothobranchius*

Halančící rodu *Nothobranchius*, jenž patří do čeledi halančíkovití (Nothobranchiidae) z řádu halančíkovců (Cyprinodontiformes), představují jednu z šesti skupin tohoto řádu kostnatých sladkovodních ryb, u kterých se vyvinul periodický reprodukční cyklus přizpůsobený každoročnímu střídání období sucha a období dešťů (Furness 2016).

Rod *Nothobranchius* zahrnuje v současnosti více než 90 druhů (Fricke et al. 2021). Všechny druhy halančíků jsou drobné ryby o délce 3-15 cm, v průměru jsou menší než 7 cm. Objevuje se u nich značný pohlavní dimorfismus ve velikosti a zbarvení těla, kdy samci jsou obvykle výrazně zbarvení, mohou se vyskytovat v jedné nebo více (obvykle dvou) barevných formách a barevné ornamenty jsou u samců druhově specifické. Zatímco samičky jsou nevýrazné (většinou světle hnědé) a dorůstají menších velikostí těla (Wildekamp 2004, Reichard et al. 2009, Reichard & Polačik 2019).

Halančící se vyskytují hlavně v oblastech savany na východní části afrického kontinentu, konkrétně od Jihoafrické republiky až po Jižní Súdán (Wildekamp 2004, Terzibasi Tozzini & Cellerino 2020). Všechny druhy obývají periodické tůně, které vznikají během období dešťů a jsou oddělené od ostatních vodních toků. Životní cyklus halančíků tedy musí proběhnout urychleně, neboť je limitován vyschnutím jejich tůně. S příchodem období dešťů se tůně naplní vodou a embrya z předchozí generace se mohou začít líhnout. Embrya se rychle vyvíjejí a pohlavní dospělosti mohou dosáhnout např. již za 17 dní svého života (u *N. kadleci*;

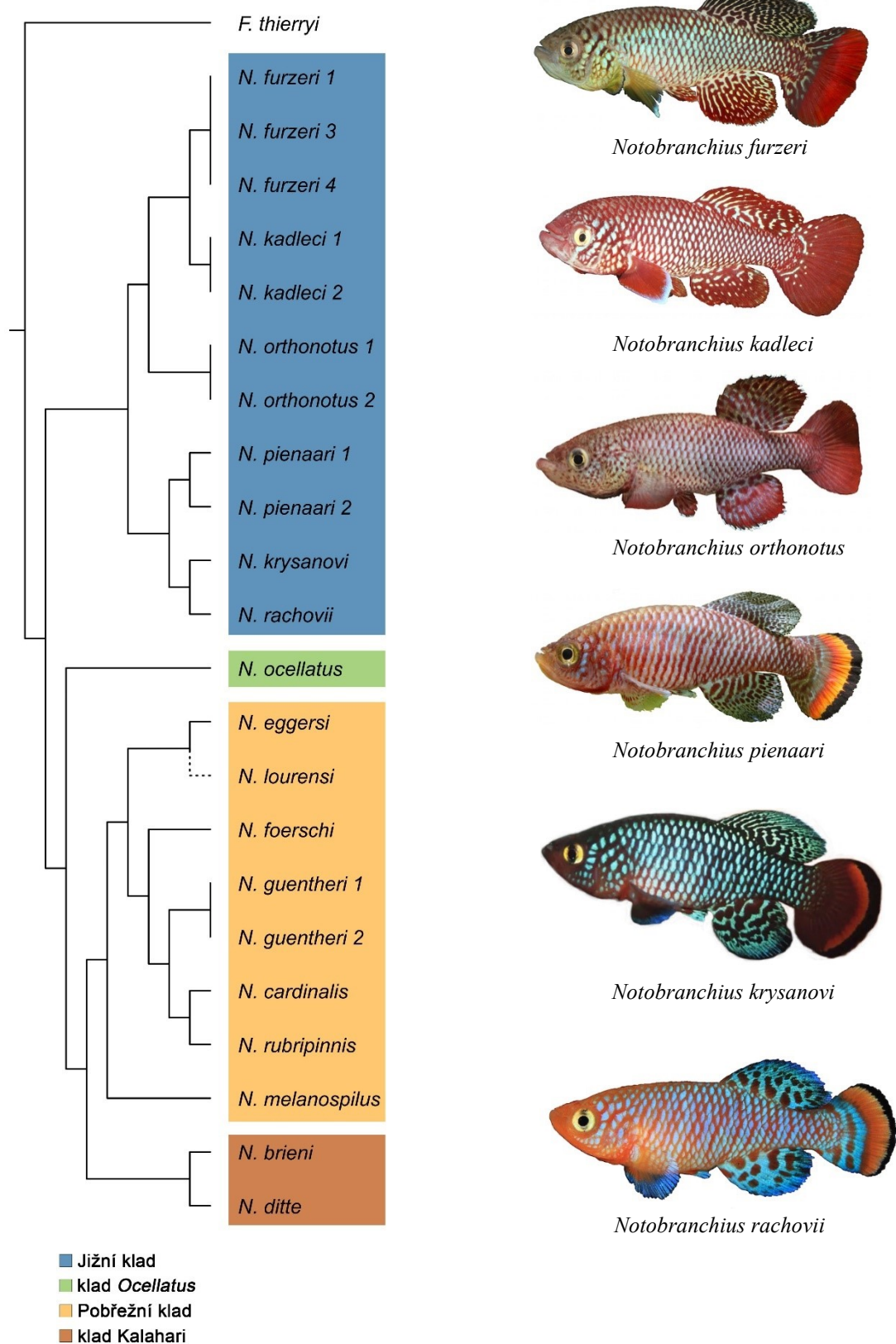
Blažek et al. 2013). Na dokončení cyklu mají halančici 2–11 měsíců, prakticky do vyschnutí tůně. Tehdy všichni dospělí jedinci umírají. Jikry halančici kladou od dovršení dospělosti denně a oplozené jikry, tedy embrya, přečkávají období sucha v přechodném dormantním stavu zvaném diapauza. Jikry ovšem mohou přežít období sucha pouze ve vhodné (vertisolové) půdě. Cyklus začíná na novo s příchodem dalšího období dešťů (Wildekamp 2004, Watters 2009, Blažek et al. 2013, Furness 2016, Hu & Brunet 2018, Terzibasi Tozzini & Cellerino 2020).

Halančici se tedy adaptovali na proměnlivé podmínky prostředí tím, že výrazně zkrátily svůj životní cyklus. Jak již bylo zmíněno, jedná se řádově o týdny až měsíce. Například halančík tyrkysový (*N. furzeri*) z inbrední laboratorní linie GRZ (odchované ze samce a samice z lokality národního zimbabwského parku Gona-Re-Zhou) se dožívá v laboratoři průměrně pouhých 10–12 týdnů a je tak označován za obratlovce s nejkratší délkou života, kterého je možné chovat v zajetí (Valdesalici & Cellerino 2003). Stárnutí je v rychlém životním cyklu halančíků doprovázeno stejnými degenerativními procesy jako u ostatních obratlovců. Halančici a zejména pak modelový druh *N. furzeri* se tedy stali atraktivním modelem pro studium stárnutí organismu a zároveň jsou díky svým vlastnostem vhodným modelem pro studium evoluce a dynamiky populací, alopatrické speciace a vývoje genomu v nepřekryvných generacích za přispění výrazného genetického driftu aj. (Cellerino et al. 2016, Hu & Brunet 2018, Reichard & Polačik 2019, Terzibasi Tozzini & Cellerino 2020).

Biodiverzita rodu *Nothobranchius* se dělí do čtyř evolučních linií – tzv. Jižní, Severní, Pobřežní a Vnitrozemský klad (Dorn et al. 2014, van der Merwe et al. 2021). U báze fylogenetického stromu halančíků (obr. 3) se nachází Jižní linie, která zahrnuje i modelový taxon *N. furzeri* a jeho sesterský druh *N. kadleci*. Ty spolu tvoří tzv. klad F, zatímco dalšími dvěma klady jsou klad O (*N. orthonotus*; někdy je z něj vyčleňovaný jako nezávislý druh *N. kuhntae*) a klad R (*N. kryanovi*, *N. pienaari*, *N. rachovii*) (Reichard 2010, Bartáková et al. 2013, 2015, Vrtílek & Reichard 2016).

Zatímco genomika halančíků je v posledních letech na vzestupu (genom *N. furzeri* byl sekvenován několika vědeckými týmy nezávisle na sobě a publikovány byly recentně i genomy některých dalších druhů; Reichwald et al. 2015, Valenzano et al. 2015, Cui et al. 2019, Willemsen et al. 2020), cytogenetické analýzy byly doposud u halančíků omezeny pouze na konvenční cytogenetiku (barvení chromozómů pomocí Giemsova barviva a konstrukce karyotypů). Jelikož ale tyto analýzy byly provedeny u širokého souboru druhů ($N=65 + N. sp.$ z oblasti Kasenga), odhalují značnou diverzitu v diploidních počtech chromozómů ($2n = 16–50$), která naznačuje důležitou úlohu přestaveb Robertsonova typu, jejichž fixace mohla být

podpořena malou velikostí alopatrických populací (Ewulonu et al. 1985, Krysanov et al. 2016, Krysanov & Demidova 2018). Dále se napříč fylogenetickým stromem halančků vyskytují v různých liniích také druhy s pohlavními chromozómy. Konkrétně byl nalezen systém XY u *N. furzeri* (Reichwald et al. 2015) a dále mnohočetné pohlavní chromozómy typu X_1X_2Y u druhů *N. guentherii*, *N. brienii*, *N. ditte*, *N. janpapi*, *N. lourensi* a *N. sp* z oblasti Kasenga (Ewulonu et al. 1985, Krysanov et al. 2016, Krysanov & Demidova 2018). Ten samý systém pohlavních chromozómů byl odhalen i u druhu *Fundulosoma thierryi* (Krysanov & Demidova 2018), tj. druh halančika, který se oddělil od linie vedoucí k rodu *Nothobranchius* a patří mezi důležité tzv. „outgroup“ druhy.



Obr. 3: Fylogenetický strom (upraveno podle van der Merwe et al. 2021) afrických anuálních halančíků vybraných pro tuto práci a fotografie druhů patřících do Jižního kladu (foto laskavě poskytnuto doc. RNDr. Martinem Reichardem Ph.D.). Fylogenetická pozice *N. lourensi* nebyla studována a v rámci našeho parciálního

fylogenetického stromu byla přibližně odhadnuta na základě morfologických znaků a geografického rozšíření (M. Reichard, osobní sdělení).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Ve své práci jsem studovala 11 populací afrických halančíků rodu *Nothobranchius*, mezi kterými je zahrnuto všech šest druhů Jižního kladu, tj. vedle modelového druhu *Nothobranchius furzeri* také *N. kadleci*, *N. orthonotus*, *N. piensari*, *N. krysanovi* a *N. rachovii*. Dále byly studovány dva druhy z Pobřežního kladu, u nichž byl zjištěn výskyt mnohočetných pohlavních chromozómů typu X_1X_2Y (*N. guentheri* a *N. lourensi*). Pro analýzu distribuce vybraných nejvíce abundantních tandemových repetit (identifikovaných programem RepeatExplorer v genomech *N. furzeri* a *N. rubripinnis*, viz dále) byli navíc vybráni jedinci z dalších devíti druhů včetně tzv. „outgroup“ taxonu *Fundulosoma thierryi*. Detailní údaje o analyzovaných druzích, populacích a počtech jedinců jsou uvedeny v Tab. 1. Převážnou většinu studovaných jedinců laskavě poskytl doc. RNDr. Martin Reichard, Ph.D. z Ústavu biologie obratlovců, AV ČR. Jeden samec *N. guentheri* (populace 2, viz Tab. 1) a jediný analyzovaný samec druhu *N. lourensi* stejně jako jedinci druhů *N. cardinalis*, *N. ditte* a *N. brieni* (viz Tab. 1) byli poskytnuti v rámci spolupráce se zahraničním kolegou, Dr. Segreyem Simanovskym (Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Ruská akademie věd, Moskva).

Ryby byly chovány v akváriích (50 l) při teplotě vody 26–27 °C, a krmeny byly mraženými larvami pakomárů (rod *Chironomus*). S analyzovanými jedinci ryb bylo zacházeno podle evropských standardů v souladu s §17 zákona č. 246/1992 Sb. Na manipulaci s živými zvířaty dohlížel člen institucionálního výboru pro péči a použití zvířat Ústavu fyziologie a genetiky zvířat AV ČR, v.v.i., s číslem osvědčení CZ 02361 (certifikováno a vydáno Ministerstvem zemědělství ČR). Při odebírání vzorků ocasní ploutve byly ryby anestetizovány pomocí metansulfonátu MS-222 (Merck), pro přímé preparace byly ryby anestetizovány smrtící dávkou 2-fenoxyetanolu (Sigma-Aldrich).

Tab. 1: Seznam studovaných druhů a jejich lokality

Druh	ID kód populace	N (počet jedinců)	Původ
<i>N. brienii</i> (Poll, 1938) *	CD 2013-04	1♂	Kongo
<i>N. cardinalis</i> (Watters, Cooper, Wildekamp, 2008) *	-	1♂	Tanzánie
<i>N. ditte</i> (Nagy, 2018) *	-	1♂	jezero Mweru, Kongo
<i>N. eggersi</i> (Seegers, 1982)	t52	2♂/3♀	Tanzánie
<i>N. foerschi</i> * (Wildekamp, Berkenkamp, 1979)	TAN 97/45	1♂	Tanzánie
<i>N. furzeri</i> (Jubb, 1971) pop. 1 pop. 3 pop. 4	p222 p121 pGRZ	15♂/13♀ 11♂/9♀ 7♂/7♀	Chefu (Mosambik) Limpopo (Mosambik) Chefu (inbrední kmen)
<i>N. guentheri</i> (Pfeffer, 1893) pop. 1 pop. 2 *	ZAN 14-02 -	4♂/8♀ 1♂	akvariální populace (Zanzibar) Tanzánie
<i>N. kadleci</i> (Reichard, 2010) pop. 1 pop. 2	p430 p091	6♂/6♀ 7♂/9♀	Pungwe (Mosambik) Gorongosa (Mosambik)
<i>N. krysanovi</i> (Shidlovskiy, Watters, Wildekamp, 2010)	p249	6♂/6♀	akvariální populace
<i>N. lourensi</i> (Wildekamp, 1977) *	TNKS 2013-02	1♂	Tanzánie
<i>N. melanospilus</i> (Pfeffer, 1896)	T163	1♂	Tanzánie
<i>N. ocellatus</i> (Seegers, 1985)	-	2♂/1♀	směs populací ¹
<i>N. orthonotus</i> (Peters, 1844) pop. 1 pop. 2	p2 p528	4♂/5♀ 6♂/4♀	Limpopo (Mosambik) Pungwe (Mosambik)
<i>N. pienaari</i> (Shidlovskiy, Watters, Wildekamp, 2010) pop. 1 pop. 2	p505 p514	5♂/4♀ 6♂/5♀	Limpopo (Mosambik) Pungwe (Mosambik)
<i>N. rachovii</i> (Ahl, 1926)	p096	8♂/3♀	Mosambik
<i>N. rubripinnis</i> (Seegers, 1986)	t33	1♂/1♀	Tanzánie
<i>F. thierryi</i> (Ahl, 1924)	GH 06/5	2♂/3♀	Ada (Ghana)

*Druhy označené hvězdičkou pocházejí z chovu v Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Ruská akademie věd, Moskva (stejně populace byly zkoumány v práci Krysanov a Demidova 2018). Ostatní druhy pocházejí z chovu Ústavu biologie obratlovců, AV ČR a případné další detaily k populacím lze dohledat v následujících publikacích: Bartáková et al. 2013, 2015, Blažek et al. 2017, Reichard et al. 2020.

¹ směs populací z dolní části povodí Ruvu a Rufiji, Tanzánie

3.2 Metody

3.2.1 Příprava chromozómových preparátů

Příprava preparátů z regenerátů ocasních ploutví

U všech druhů halančíků byly chromozómové preparáty připraveny preferenčně z regenerátů ocasních ploutví dle protokolu Völker & Rába (2015), s drobnými úpravami (Sember et al. 2015). Po odstrižení tenkého proužku ocasní ploutve byla regenerovaná tkáň odebírána obvykle po jednom týdnu (u některých druhů zejména z Pobřežního kladu po dvou týdnech). Regeneráty jsem následně kultivovala 2 h v Petriho miskách s kultivačním roztokem při pokojové teplotě (RT, z angl. „room temperature“). Kultivační roztok byl připraven

zředěním zásobního roztoku (zásobní roztok: 7,48g NaCl + 0,18g KCl + 0,2g CaCl₂ + 0,016g NaHCO₃ do 1 litru vody) destilovanou vodou v poměru 1:6 a přidáním kolchicinu (Serva) do výsledné koncentrace 0,025 %. Po 2 hodinách jsem kultivaci ukončila přidáním 5 ml čerstvého fixativa – methanol (Lach:ner): kyselina octová (99,8%; Lach:ner) v poměru 3:1 (v/v). Vzorky jsem poté nechala inkubovat 20 minut (min) v lednici (tj. při 8 °C). Následně jsem veškerý roztok z Petriho misek odstranila (odlitím a pipetováním), přidala 5 ml čerstvé fixáže a znovu inkubovala (20 min, 8 °C). Tento krok jsem ještě jednou zopakovala a ve třetí fixáži jsem regeneráty ponechala přes noc při 8 °C. Následující den jsem každý regenerát postupně přemístila na kovovou mřížku, zakápla 40 µl 50% kyseliny octové a pinzetou ploutvičku jemně macerovala na mřížce (po dobu 10 vteřin). Získaná suspenze se následně z mřížky přenesla do příslušné zkumavky a tento proces jsem ještě jednou nebo dvakrát opakovala.

Přímá preparace z ledvin a gonád

U některých vybraných jedinců jsem chromozómy získala přímou preparací z ledvin a gonád. Vzhledem k omezenému počtu jedinců, které jsem takto zpracovávala, pitvu provedli zkušenější kolegové (Mgr. Tomáš Dvořák, RNDr. Jörg Bohlen, PhD. nebo Bc. Tomáš Pavlica). Ledviny a gonády byly vypreparovány a přeneseny na kovovou mřížku, ostatní orgány a tkáně (mozek, játra, slezina, svaly, ploutve) byly přeneseny do mikrozkušavek, zamraženy v tekutém dusíku a uskladněny ve hluboko mrazícím boxu (-80 °C). Orgány na mřížce byly zakápnuty hypotonickým roztokem, tj. 0,075M roztokem chloridu draselného (KCl, Lach:ner) a rozetřeny pinzetou. Vzniklou suspenzi jsem přenesla do 15ml kónické zkumavky a nechala inkubovat po dobu 10 min při pokojové teplotě. Hypotonizaci jsem ukončila přidáním několika kapek (cca 1 ml) čerstvě připravené fixáže a po promíchání jsem zkumavky centrifugovala (10 min, 259 × g, 4 °C). Po stočení jsem odsála supernatant a objem doplnila čerstvou fixáží na 5 ml. Po promíchání se vzorky nechaly inkubovat na 20 min v lednici (8 °C) a poté jsem je opět centrifugovala. Krok byl opakován ještě jednou, po posledním stočení na centrifuze jsem odpipetovala supernatant na požadovaný objem (tj. adekvátně vzhledem k peletu buněk), suspenzi jsem promíchala a celý objem přenesla do připravené mikrozkušavky. Suspenze byly následně buď rovnou použity pro přípravu prvních preparátů, nebo byly uloženy v mrazícím boxu při -20 °C.

Příprava chromozómových preparátů

Podložní skla jsem očistila v kyvetě s denaturovaným ethanolem (10 min, RT).

Suspenze připravené Völkerovou metodou obsahovaly 50% kyselinu octovou a musely z nich být ihned zhotoveny preparáty na histologické ploténce při 45 °C. Preparát byl připraven nanesením 40 µl suspenze na podložní sklo, přičemž po 20 vteřinách se suspenze opět odsála a aplikovala vedle. Tímto způsobem byly vytvořeny tři sousedící kruhové plochy s adherovanými chromozómy na preparátu.

Suspenze z přímých preparací z ledvin mohly být po třech kolech fixace v methanol: octové fixáži uskladněny v mrazicím boxu (-20 °C) nebo byly aplikovány na preparáty, za vlhka na ploténce nahřáté na 60 °C (dle metody popsané Bertollem et al. 2015). 10–15 µl suspenze aplikované na podložní sklo bylo před přenesením na ploténku v některých případech ještě zakápnuto 10 µl čerstvé fixáže, pro lepší rozprostření chromozómů u suspenzí s vyšší hustotou buněčných jader.

Kvalita preparátů byla stanovena pod fázovým kontrastem ve světelném mikroskopu (Olympus BX63). Vybraná skla byla buď odvodněna v ethanolové řadě (70%, 80%, 96%, po 2 minutách) a skladována v mrazicím boxu při -20 °C pro další použití, nebo obarvena 5% roztokem Giemsa-Romanowski ve fosfátovém pufru (pH 6,8) (Dr. Kulich) a analyzována pomocí mikroskopu Zeiss s platformou Metafer pro automatické hledání metafází.

3.2.2 C-pruhování

Tato metoda slouží k vizualizaci konstitutivního heterochromatinu.

Připravená skla byla po vytažení z mrazicího boxu odvodněna ethanolovou řadou (70%, 80%, 96%) a po oschnutí přemístěna na histologickou ploténku nahřátou na 60 °C, kde se inkubovala 1 hodinu. Důvodem tohoto tzv. „zapékání skel“ je lepší přilnavost materiálu k povrchu skla, aby nedošlo při následném protokolu k jeho uvolnění. Poté, co jsem preparáty nechala zchladnout na pokojovou teplotu, jsem je ponořila do 0,2M HCl (Lach:ner) na 20 minut (za účelem rozvolnění chromatinu) a poté důkladně opláchla destilovanou vodou. Následně byla skla přesunuta přesně na 3 minuty do vyhřátého (45 °C) nasyceného roztoku Ba(OH)₂ (denaturační krok) a poté rychle opláchnuta v 0,2M HCl pro zastavení reakce. Preparáty jsem dále opláchla destilovanou vodou, vložila do vyhřáté kyvety s 2× SSC a při 65 °C inkubovala po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byla skla opět opláchnuta destilovanou vodou a po oschnutí jsem na ně nanesla 25 µl montovacího media obsahujícího 4',6-diamidino-2-phenolindol (DAPI) o koncentraci 1.5 µg/ml (Cambio) pro obarvení chromozómů. Každý preparát jsem překryla krycím sklem (22 × 50 mm) a přebytečné medium s DAPI, včetně

vzduchových bublin, jsem vytlačila ven. Hotový preparát jsem očistila filtračním papírem a okraje zalakovala lakem na nehty.

3.2.3 Izolace genomové DNA a příprava hybridizačních sond

Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla izolována z jater a sleziny za použití izolační soupravy MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen) využívající magnetických kuliček. Postupovala jsem podle protokolu výrobce, ale vzhledem k vysoké koncentraci buněk z izolovaných tkání, které znesnadňovaly izolační kroky, byl protokol optimalizován použitím dvojnásobného množství všech používaných roztoků s výjimkou elučního pufru. Eluce probíhala do objemu 50 µl a byla jímána ve dvou až třech frakcích. Kvalita získané DNA byla zkontrolována pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu a koncentraci všech izolovaných frakcí DNA jsem stanovila na fluorometru Qubit (Invitrogen).

Analýza RepeatExplorer

V rámci našeho projektu byla provedena analýza programem RepeatExplorer2 (Novák et al. 2020) za účelem identifikace nejvíce zastoupených repetitivních sekvencí v genomech vybraných halančíků. Analýza byla provedena kolegyněmi z Českých Budějovic RNDr. Martinou Dalíkovou, Ph.D. a RNDr. Annou Voleníkovou. S využitím dat z publikovaného genomu *N. furzeri* (Reichwald et al. 2015) a dále námi nově sekvenovaných genomů *N. kadleci* a *N. rubripinnis* na nízké pokrytí (Illumina paired-end sequencing – platforma HiSeq, Novogene; knihovny byly připraveny s inzerty dlouhými 450 bp a délka sekvenčních čtení byla 150 bp; pokrytí genomu přibližně 3×). Pro účely mé práce byly vybrány čtyři repete s vysokým zastoupením v daných genomech: Nfu-SatA, Nfu-SatB, Nfu-SatC (genomy *N. furzeri* a *N. kadleci*) a Nru-Sat1 (genom *N. rubripinnis*). Zatímco sondy pro Nfu-SatB, Nfu-SatC byly připraveny postupem popsáným níže, minisatelity Nfu-SatA a Nru-Sat1 s krátkým monomerm byly syntetizovány na zakázku firmou Generi Biotech a během syntézy byl každý monomer značen fluorochromem Cy3 na 5' konci.

Amplifikace a klonování fragmentů repetitivní DNA

Úseky požadovaných sekvencí byly získány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s využitím primerů shrnutých v Tab. 2. Zatímco primery pro 5S a 18S rDNA byly převzaty

z předchozích cytogenetických studií, primery pro satelitní sekvence Nfu-SatB a Nfu-SatC odhalené programem RepeatExplorer v genomu *N. furzeri*, byly vygenerovány (za asistence RNDr. Petra Nguyena, Ph.D. a Mgr. Alexandra Sembera, Ph.D.) pomocí programu Primer3 (v. 0.4.0; <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Všechny primery byly syntetizovány na zakázku u firmy KRD.

Templátem pro PCR byla celogenomová DNA *N. kadleci* p430 (5S rDNA, Nfu-SatB a Nfu-SatC), *N. pienaari* p505 (5S rDNA), *N. rachovii* p096 (5S rDNA) a *N. guentheri* z akvarijní populace (18S rDNA). Jedna reakce PCR o celkovém objemu 50 µl obsahovala 25 µl PPP Master mixu (Top-Bio), 2 µl každého primeru (forward a reverse) o koncentraci 10 pmol/µl (neboli 10 µM), dále přibližně 100 ng templátové DNA a směs byla doplněna do konečného objemu ultračistou vodou PCR Ultra H₂O (Top-Bio). Termální profily pro PCR jednotlivých fragmentů jsou shrnuty v Tab. 3. Kromě amplifikace 18S rDNA, kde byl využit standardní protokol v původní verzi, byla u dalších fragmentů provedena nejdříve PCR s teplotním gradientem nasedání primerů v rozmezí 50–60 °C a následně byla zvolena optimální teplota (60 °C pro všechny tři fragmenty). U všech fragmentů byla v posledním cyklu teplota prodlužování řetězce (neboli extenze) prodloužena na 10 min z důvodu zvýšení pravděpodobnosti, že Taq polymeráza (obsažená v PPP Master mixu) přidá na konec fragmentu netemplátový adenosin, jehož přítomnost je důležitá pro mechanismus klonování (viz dále). PCR probíhala v termocykleru Bio-Rad.

Amplifikované produkty byly ověřeny na elektroforéze v 0,8% agarózovém gelu. V případě většího počtu fragmentů byl celý vzorek následně separován elektroforeticky v 1% agarózovém gelu a jednotlivé fragmenty byly vyříznuty a následně purifikovány pomocí soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel GmpH). V případě pouze jednoho fragmentu ve vzorku byl tento fragment purifikován přímo, za použití stejné purifikační soupravy, ale s modifikovaným protokolem. V obou případech jsem postupovala podle návodu výrobce.

Fragmenty DNA byly ligovány do pDrive vektoru (Qiagen), jehož přesahující U-konce párují s přesahujícím A-koncem produktu PCR. Konstrukty byly transformovány do kompetentních buněk (Qiagen EZ Competent Cells). Kolonie nesoucí vektor s inzertem byly vybrány na základě modro-bílé selekce a následně byly plazmidy z buněk izolovány pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), vše podle protokolu výrobce. Klonování a purifikace plazmidů nebylo součástí mé práce, bylo obstaráno laborantkou Petrou Šejnohovou.

Výsledné produkty z pozitivních kolonií a klonů byly sekvenovány v obou směrech na zakázku firmou Macrogen (Nizozemsko) pomocí standardních primerů z řádky M13 (M13 forward: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'; M13 reverse: 5' AACAGCTATGACCATG 3') a identita výsledných sekvencí byla ověřena analýzou BLAST/N (NCBI, Altschul et al. 1990).

Tab. 2: Přehled použitých primerů

Gen/Satelit	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Zdroj
5S rDNA	TACGCCCGATCTCGTCCGATC	CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC	Martins& Galetti, 1999
18S rDNA	CCGAGGACCTCACTAAACCA	CCGCTTTGGTGACTCTTGAT	Cioffi et al., 2009
NfuSatB	TTTCCTAAGGGGGTCAAACC	CTGGGTGCCATTTACAAACC	tato práce
NfuSatC	TGACCCCAATAGAAATGGA	CGTGTGCGAAAACCACTAAA	tato práce

Tab. 3: Termální profily PCR

PCR krok	5S rDNA	18S rDNA	Sekvence z RepeatExplorer (Nfu-SatB, Nfu-SatC)
Počáteční denaturace	94 °C / 3 min	95 °C / 5 min	95 °C / 4 min
a. Denaturace	94 °C / 30 s	95 °C / 1 min	95 °C / 1 min
b. Nasedání primerů	60 °C / 1 min	60 °C / 1 min	60 °C / 1 min
c. Elongace	72 °C / 2 min	72 °C / 1 min 30 s	72 °C / 1 min 30 s
d. Závěrečná elongace	10 min	10 min	10 min
Počet opakování cyklu a.-c.	35×	35×	35×

Značení pomocí nick translace

Sekvence 18S rDNA byla amplifikovaná pomocí metody PCR se stejným protokolem a termálním profilem jako je uvedeno výše. V převážné většině experimentů jsem používala jako templát zaklonovaný fragment 18S rDNA z tolstolobika bílého (*Hypophthalmichthys molitrix*; přístupové číslo v GenBank: MT165584), který byl úspěšně použit v hybridizačních experimentech jiných ryb (např. Sember et al. 2020b). Pro část experimentů byl použit ověřený klon 18S rDNA ze samce *N. guentheri*. Výsledný amplifikovaný produkt jsem ověřila na elektroforéze a produkt purifikovala pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel GmbH) podle návodu výrobce. Poté jsem naměřila koncentraci produktu na fluorometru Qubit. Takto získaná DNA byla značena metodou nick translace (neboli „posun zlomu“) pomocí soupravy Nick Translation kit (Abbott Molecular). Reakce o objemu 25 µl obsahovala 500 ng DNA, 2,5 µl nukleotidového mixu (viz dále), 2,5 µl NT pufru, 5 µl enzymového mixu (DNA polymeráza I a DNáza I) a reakce byla doplněna do celkového objemu vodou PCR Ultra H₂O (Top Bio). Nukleotidový mix byl (při objemu 50 µl zásobního alikvotu) tvořen 5 µl každého z nukleotidů dATP, dCTP a dGTP (koncentrace 2,5 mM), dále 3,4 µl dTTP

(2,5 mM) a 4 µl s dUTP konjugovaného s digoxigeninem (digoxigenin-11-dUTP; Roche) nebo s biotinem (biotin-16-dUTP; Roche). Zbytek objemu tvořila ultračistá voda PCR Ultra H₂O (Top Bio). Po namíchání nick translační reakce byla směs inkubována v termobloku při 15 °C po dobu 1 h 40 min až 2 h v závislosti na stáří kitu (u staršího kitu bylo potřeba více času k dosažení ideálního rozsahu značených fragmentů 200-500 bp). Reakce byla následně zastavena přidáním 1 µl 0,5M EDTA (ethyldiamintetraoctová kyselina; pH 8.0) a vložením na 10 min do termobloku (65 °C).

Většinu sond jsem značila nick translací, ve které byl nukleotid dUTP konjugovaný přímo s fluorochromem. V tomto případě byly použity soupravy Fluorescein NT Labeling Kit nebo Cy3 NT Labeling Kit (Jena Bioscience). Fluorescein-dUTP byl použit pro značení 18S rDNA, Cy3-dUTP pro značení Nfu-SatB, Nfu-SatC a některých variant 5S rDNA. Reakce o objemu 20 µl obsahovala 1-1,5 µg DNA, 2 µl nick translačního pufru (10× NT labeling buffer), 2 µl fluorescenčního mixu (Fluorescein, Cy3), 2 µl enzymového mixu a objem byl doplněn ultračistou vodou PCR Ultra H₂O (Top Bio). Reakce byla inkubována při 15 °C po dobu 30 min a poté ukončena přidáním 5 µl tzv. stop pufru.

Značení pomocí PCR

Sekvence 5S rDNA byla ve většině případů značena pomocí PCR. Templátem byl izolovaný plazmid s ověřenou sekvencí inzertu 5S rDNA a termální profil reakce byl stejný jako při standardní amplifikaci 5S rDNA (viz Tab. 3); teplota pro nasedání primerů byla zvolena 60 °C. Reakce při objemu 50 µl obsahovala: 5 µl 10× Taq buffer, 2 µl DMSO (dimethylsulfoxid), 25 µl enhanceru (všechny tři komponenty: Top Bio), 10 µl každého z dvojice primerů (10 µM; Tab. 2), 0,5 µl Taq polymerázy Unis (Top Bio), 2,5 µl nukleotidového mixu s digoxigeninem nebo biotinem konjugovaným s dUTP (stejné složení jako při nick translaci), přibližně 100 ng templátové DNA klonu a PCR Ultra H₂O (Top Bio). Dle potřeby bylo najednou mícháno 4–10 reakcí po 50 µl. Reakce probíhala v termocykleru Bio-Rad.

Amplifikační produkty byly následně sloučeny do jednoho vzorku, který byl přečištěn pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel GmpH) kitu a koncentrace byla změřena na fluorometru Qubit.

Příprava hybridizačních sond

Při míchání sondy pro dvoubarevnou rDNA FISH obvykle mix pro jedno sklo obsahoval 250 ng sondy pro 18S rDNA (obvykle značené digoxigenin-dUTP), 215 ng sondy pro 5S rDNA (obvykle značené biotin-dUTP), 25 µg neznačené sonikované DNA z lososích spermií sloužící jako nespecifická kompetitivní (neboli blokující) DNA, 3M acetát sodný a vychlazený 96% ethanol. Množství acetátu sodného odpovídalo $0,1 \times V$ a ethanolu $2,5 \times V$, kde V je součet objemu sondy a blokující DNA. Sonda byla ponechána přes noc (nebo i déle) v mrazícím boxu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby se DNA co nejlépe vysrážela. Následně byla centrifugována ($18\,600 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 25 min, poté byl odebrán supernatant a přidáno 400–700 µl vymraženého 70% ethanolu (obvykle cca $4 \times$ více, než byl původní objem sondy) a směs znovu stočena na centrifuze (tentokrát $16\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15–20 min). 70% ethanol je důležitý pro odmytí solí z DNA, zejména acetátu sodného, který se předtím přidává, aby se sonda lépe vysrážela. Po centrifugaci byl precizně odebrán supernatant a zbytky ethanolu jsem nechala odpařit při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 3–5 min. Následně byl pelet rozpuštěn v hybridizačním mixu (složení: 50% formamid, 10% dextran sulfát, $2 \times$ SSC, 0.04 M NaPO₄ pufr, 0.1% SDS, Denhardtovo činidlo) – v případě sondy pro jedno sklo byl pelet rozpouštěn v 15 µl tohoto mixu, obvykle se však jednalo o sondu na více skel. Pelet se rozpouštěl v hybridizačním mixu při inkubaci v termobloku ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 400–500 rpm, 2–4 hod) a rozpuštěná sonda byla následně uložena v mrazícím boxu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další použití.

3.2.4 Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

Principem této metody je hybridizace fluorescenčně značené sondy na komplementární úsek DNA. Ve fluorescenční mikroskopu pak v místě nasednutí sondy pozorujeme barevný signál. Pomocí FISH byly detekovány multigenové rodiny 18S rDNA a 5S rDNA, minisatelity Nfu-SatA a Nru-Sat1, satelitní DNA Nfu-SatB a Nfu-SatC a telomerické repetice (TTAGGG)_n.

FISH jsem prováděla podle protokolu v práci Sember et al. (2015), s mírnými úpravami. Den před samotným začátkem FISH byly preparáty vytaženy z mrazícího boxu, odvodněny v ethanolové řadě (70%, 80%, 96%) a inkubovány v termostatu ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc pro lepší adhezi chromozómů k preparátu (tzv. stárnutí skel neboli „aging“). První den byla skla po „agingu“ přesunuta na 1 hodinu na plotýnku nastavenou na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tzv. zapékání skel, viz kapitola 3.2.2, C-pruhování). Poté jsem preparáty opláchla v kyvetě s $2 \times$ SSC (5 min, RT) a naněla na ně 500 µl RNázy A (Sigma-Aldrich) ve $2 \times$ SSC (o konečné koncentraci 200 ng/µl),

roztok překryla krycím sklem (22 × 60 mm) a preparáty jsem inkubovala v 37 °C po dobu 70 min. Po inkubaci byla skla opláchnuta ve 2× SSC a odvodněna ethanolovou řadou. Po oschnutí jsem preparáty vložila do kyvety s 1× PBS na 5 min, následně jsem je přemístila do kyvety s pepsinem (Chemos CZ) rozpuštěném v destilované vodě na konečnou koncentraci 0,05 µg/µl; roztok rovněž obsahoval 1N HCl (pro stimulaci aktivity pepsinu) (Lach:ner), skla byla inkubována v kyvetě s pepsinem po dobu 3 min (37 °C; vodní lázeň). Poté jsem skla krátce opláchla v 1× PBS a odvodnila v ethanolové řadě. Účelem inkubace s RNázou A a s pepsinem bylo odstranění cytoplazmy a RNA z preparátů, neboť by mohly vytvářet nespecifické fluorescenční pozadí nebo bránit sondě v efektivním nasedání na chromozómy. Následně došlo k denaturaci chromozómů na preparátech v 75% formamidu (Penta) ve 2× SSC (pH 7.0) vyhřátém na 72 °C ve vodní lázni. Denaturace skel probíhala přesně 3 min a potom jsem skla prudce ochladila ve vymraženém 70% ethanolu a dokončila ethanolovou řadu (tentokrát po třech minutách v každé ze tří koncentrací). V mezičase proběhla i denaturace sondy, při 86 °C na 6 min v termobloku. Sondu jsem po denaturaci ihned zchladila na ledu, aby vlákna DNA zůstala separována. Následně došlo k nanesení hybridizační sondy na skla. Skla byla překryta krycím sklem (22 × 50 mm) a zarámovaná Rubber cementem (Marabu). Ve vlhké komůrce (obsahující 2× SSC) pak byla inkubována přes noc v termostatu při 37 °C.

Druhý den jsem odstranila Rubber cement a krycí skla, preparáty jsem krátce opláchla v 4× SSC/0,1% Tween-20 a poté přenesla postupně do dvou kyvet s 50% formamidem (Penta) ve 2× SSC, který byl vytemperován na 42 °C ve vodní lázni. V každé kyvetě se skla třepala na třepačce (140 rpm) po dobu 10 minut. Následně byla skla postupně opláchnuta 3× v roztoku 1× SSC (7 min, 42 °C, třepačka 140 rpm). Poté proběhl krátký oplach ve 2× SSC a na skla jsem přenesla 3% BSA (Vector Labs) ve 4× SSC/0,01% Tween-20, překryla krycím sklem (22 × 60 mm) a nechala inkubovat ve vlhké komůrce v termostatu (37 °C, 20 min). Účelem tohoto kroku bylo vysytit nespecifická vazebná místa pro nasednutí protilátek, které jsou aplikovány v další fázi. Po inkubaci jsem odstranila krycí skla a proběhl krátký oplach v 4× SSC/0,1% Tween-20. Dále byl nanesen detekční mix, který obsahoval Anti-Digoxigenin-FITC (Roche) zředěný 1:10 v 0,5% BSA/PBS a Streptavidin-Cy3 (Invitrogen Life Technologies) zředěný 1:100 v 10% GNS/PBS. Mix pro jedno sklo tedy obsahoval 10 µl Anti-Digoxigenin-FITC, 100 µl 0,5% BSA/PBS, 2 µl Streptavidin-Cy3 a 200 µl 10% GNS/BSA. Po nanesení byly preparáty překryty krycími skly (22 × 60 mm) a znovu vloženy do vlhké komůrky na 37 °C, tentokrát na 70 min. Po uplynutí této doby jsem odstranila krycí skla a preparáty byly čtyřikrát promyty v 4× SSC/0,1% Tween-20 (7 min, 42 °C, třepačka 140 rpm). Následoval

oplach 1 min v destilované vodě a ihned (bez oschnutí) jsem nanášela 20 µl montovacího média s DAPI o koncentraci 1.5 µg/ml (Cambio). Skla byla překryta krycím sklem (22 × 50 mm) a zbytek procedury proběhl stejně jako jsem popsala v kapitole o C-pruhování. Po zaschnutí laku byla skla minimálně 20 min v lednici a pak mohla být vyhodnocena a zdokumentována pod fluorescenčním mikroskopem (viz kapitola 3.2.8).

Při použití tzv. „přímo“ značené sondy (tj. sonda je značena dUTP konjugovaným přímo s fluorochromem) probíhalo odmývání nespecificky nasednuté sondy podle protokolu Yano et al. (2017). Z preparátů byl odstraněn Rubber cement a krycí skla jsem odmyla krátkým oplachem v 1× SSC. Následně jsem skla promývala 2krát v 1x SSC (5 min, 65 °C). Poté následovalo odmývání jednou ve 4× SSC/0,1% Tween-20 (5 min, 42 °C, třepačka 140 rpm) a následně na 1 min v 1× PBS při pokojové teplotě a třepání v ruce. Pak následoval rychlý oplach destilovanou vodou a proběhla ethanolová řada. Po uschnutí skel jsem nanesla 20 µl montovacího média s DAPI o koncentraci 1.5 µg/ml (Cambio) a zbytek procedury probíhal stejně jako jsem to popsala v kapitole o C-pruhování.

3.2.5 Telomerická FISH

Telomerické repetice byly detekovány pomocí kitu Telomere PNA FISH Kit/Cy3 (Dako) a bylo postupováno podle výrobcem přiloženého protokolu. Jedinou úpravou bylo prodloužení hybridizace z 30 minut na 1,5 hodiny. Výhodou soupravy je, že využívá tzv. peptide nucleic acid (PNA) typ sondy, kde je v kostře polymeru fosfát nahrazen cukrem, sonda tudíž nemá záporný náboj, lépe hybridizuje a je stabilnější.

3.2.6 FISH bez denaturace chromozómů (angl. non-denaturing FISH, ND-FISH)

Tato redukováná verze protokolu FISH byla v minulosti použita pro mapování mikrosatelitů. Ve své práci jsem protokol použila na mapování sekvencí Nfu-SatA a Nru-Sat1, které délkou svých monomerů spadají mezi minisatelity. Postup probíhal podle protokolu Cuadrado & Jouve 2010 s modifikacemi podle Mgr. Jany Štundlové, Ph.D. V důsledku použití sondy s již navázaným fluorochromem byl protokol zkrácen o dva promývací kroky a inkubaci s detekčním mixem mezi nimi.

Skla nebyla před experimentem nijak ošetřena ani denaturována. Nejprve jsem připravila sondu (na jedno sklo bylo nanášeno 30 µl mixu, tedy 0,6 µl značených

oligonukleotidů a 29,4 μ l 2 $\times$ SSC; výsledná koncentrace sondy byla 2 pmol/ μ l). Sondy jsem následně denaturovala při 80 °C po dobu 5 min v termobloku a poté ji ponechala 15-20 min na ledu. Po nanesení sondy na preparát probíhala hybridizace 2-3 h při pokojové teplotě. Poté následovalo odmyváání nespecifických signálů 10 min v 4 $\times$ SSC/0,2% Tween-20 a následně 5 min ve 4 $\times$ SSC/0,1% Tween-20 (oba kroky probíhaly na třepačce, 140 rpm, RT). Poté jsem nanesla 20 μ l montovacího média s DAPI o koncentraci 1.5 μ g/ml (Cambio) a zbytek procedury probíhal stejně jako jsem to popsala v kapitole o C-pruhování.

3.2.7 Recyklace preparátů po FISH analýze

Některé preparáty byly využity v sekvenčních experimentech pro více FISH analýz s různými sondami, proto bylo nutné je zrecyklovat. Preparáty jsem na 20 min vložila do kyvety s destilovanou vodou, aby povolil lak, kterým byly zarámované okraje krycích skel. Lak jsem následně opatrně odstranila skalpelem, tak aby se krycí sklo neposunulo a následně jsem skla dvakrát promyla v kyvetě s 4 $\times$ SSC/0,1% Tween-20 (30 min, 37 °C, třepačka 130 rpm), po prvním promytí jsem opatrně odstranila krycí sklo. Poté jsem preparáty odvodnila v ethanolové řadě a na 30 min přemístila do kyvety s fixativem. Dále následovaly 2 hodiny inkubace v termostatu („aging“, 37 °C) a po inkubaci jsem skla vložila do kyvety s PBS (5 min, RT). Poté jsem skla přemístila do kyvety s 1% formaldehydem na 5 min při RT (1% formaldehyd obsahoval 1350 μ l zásobního 36 - 38% formaldehydu, 125 μ l $MgCl_2$ a objem byl doplněn PBS do 50 ml). Následně jsem preparáty přemístila znovu do PBS (5 min, RT) a poté provedla ethanolovou řadu. Takto zrecyklované preparáty byly připraveny k denuraci v 75% formamidu a dále bylo postupováno stejně jako v kapitole 3.2.4.

3.2.8 Vyhodnocování preparátů

Preparáty po aplikaci metody FISH byly prohlíženy na fluorescenčním mikroskopu BX63 Olympus. Snímky jednotlivých metafází byly foceny pod objektivem 100 $\times$ pomocí digitální kamery black and white CCD camera (DP30W Olympus). Jednotlivé nasnímané černobílé snímky byly následně sloučeny a pseudokolorovány (Cy3 – červená, FITC – zelená, DAPI – modrá) v programu DP manager (Olympus). Spojené snímky byly upraveny v programu Adobe Photoshop CS6 a diploidní počet chromozómů ověřen v programu ImageJ 1.52 (<https://imagej.nih.gov/ij>) s nainstalovaným doplňkem Levan (Sakamoto & Zacaro, 2009).

Karyotypy byly sestaveny z mitotických metafází a morfologie chromozómů byla určena podle Levana et al. (1964), nicméně vedle zachovaných kategorií dvouramenných chromozómů (m = metacentrický; sm = submetacentrický) jsem jednoramenné chromozómy zahrnula do společné kategorie st-a (subtelocentrický-akrocentrický chromozóm) a zároveň jsem se odchýlila od nomenklatury citované práce (Levan et al. 1964 používají pojem „telocentrický chromozóm“, zatímco já jej označuji jako „akrocentrický“). Důvodem této odchylky je nejasná hranice mezi oběma kategoriemi jednoramenných chromozómů u halančíků i mnoha dalších skupin ryb (např. Sember et al. 2015). Zároveň jsem se odchýlila od nomenklatury citované práce (Levan et al. 1964) použitím značky „a“ místo „t“ pro akrocentrický chromozóm.

4 Výsledky

4.1 Analýza sekvencí tandemových repetic použitých jako hybridizační sondy

Na základě analýz programu RepeatExplorer, které prováděli kolegové z Jihočeské univerzity (viz kapitola 3.2.3) byly vybrány pro účely mých hybridizačních experimentů tři tandemové repetice sdílené mezi *N. furzeri* a *N. kadleci* a dále tandemová repetice z *N. rubripinnis*.

Nfu-SatA

Jedná se o minisatelit o předpokládané délce monomeru 77 bp. Je to repetice s nejvyšším procentuálním zastoupením v jaderném genomu *N. kadleci* (přibližný odhad 12 %) a druhým nejvyšším zastoupením v jaderném genomu *N. furzeri* (5,7 %). Pro mapování metodou FISH byl jako sonda použit monomer značený na 5' konci pomocí Cy3.

Sekvence monomeru (5'-3'):

GAGGAGCGTCTTGCCACATGTCAACACTGGGTCTGACTGAGCGCCTCCAGGAGAGAGGC
CCAAGCAAGACGCGCCCC

Nfu-SatB

Satelitní DNA s předpokládanou délkou monomeru 348 bp představuje co do procentuálního zastoupení nejpočetnější repetitivní DNA v jaderném genomu *N. furzeri* (přibližný odhad 12 %) a druhou nejpočetnější v genomu *N. kadleci* (7 %). Pro mapování metodou FISH byl jako sonda použit nejdelší fragment po PCR (z genomové DNA *N. kadleci*) o délce přibližně 1100 bp, který obsahoval tři kopie monomeru Nfu-SatB.

Konsenzuální sekvence monomeru Nfu-SatB zjištěná analýzou RepeatExplorer (5'-3'):

AGGTCCAATCAGGCTGAAACGTTACAGGAAGGTAGAATCTATTGAGTTGTAAGTGATCTG
AACGTTTCATGATGATAGCACTTTCCTAAGGGGGTCAAACCATGTCCCAAAGGTCACCGG
ATCTGGTGTCAATTTAAAGAAGTAGTCCAGTTACACATTTGTGGGCTTATAACTTGGCTTC
TGAATGTCCTAGAGAGATCAGGTTTGTTTTAGTGTACTCCAATCAACAGCCCCTACAACC
ACAAAAAGGAATGGAGTCATTAGCACTTATGGTTTGTAAATGGCACCCAGAATTATGTTG
CACGAAGCACAATTTACATCATCTCTGGGTTCATTTGTGTGAAAACA

Nfu-SatC

Satelitní DNA s předpokládanou délkou monomeru 634 bp zabírá v genomu *N. furzeri* pouze 1 %. Přestože analýza RepeatExplorer odhalila ještě jinou repetitivní DNA, která měla ve zkoumaných genomech mírně vyšší zastoupení než Nfu-SatC (1,8 % u *N. furzeri* a 1,1 % u *N. kadleci*), tato repetitivní DNA nakonec nebyla předmětem mé práce. Jednalo se o retrotranspozón patřící mezi long interspersed nuclear elements (LINE). Pro mapování satelitu Nfu-SatC metodou FISH byl jako sonda použit nejdelší fragment po PCR (z genomové DNA *N. kadleci*) o délce přibližně 1200 bp, který obsahoval dva nekompletní monomery Nfu-SatC.

Konsenzuální sekvence monomeru Nfu-SatC zjištěná analýzou RepeatExplorer (5'-3'):

```
TTTTTCACAGCTCCCTATTGGACTCCTTTTACCCAATCACCAGGAATCTCTGGTAAATAGC
AGCAGACAAGTTGAGGTCACCTGGTCTCCAGTACTGGCAGGTTTTGAAAAAAGGCGGGG
CTTTGGGAGCATGGCGAAATTCGCCATCACGCCATGGAAATACGTTTGCCTCTCATTTCTT
CAGTTATCGTGATATCGCCACGAAATTTCTGGTGAGTGATCCTAGTCTGACCCCCAATAG
AAATGGACAGCTGAAGTTTGTGGGCGTGGCCTATTTTCTGAAATAGCGCCCCCTAGGACC
ATTAAAACTGTCAGCCCCAAGCCATGCTTTGACTGAGGATTACGAAATTTGGTACACTAA
TGTGGTGTCTCAGGACCTACAAAAAAGTCTCTTGGAGCCAAGTGCAAAGTCGCACAGGA
AGTCGGCCATTTTGGTCCAAGTACGCGATTTAGTGGTTTTCGCACACGTTGTTTGGAGAGT
GATGCTCCGTCGCCCTTTTACCAATCACCTTCAAACCTTCTGCTATATACTCTTAAGACAT
AGAGGAAAAAATTCAACCGTCGGATTTTAAATAAGTATAAAGGTGTGGGCGTGGCTAAG
CCTCAAACCTTTGACCTTTTCGCCACGCCACTCTT
```

Nru-Sat1

Minisatelit Nru-Sat1 je procentuálně nejvíce zastoupenou repetitivní DNA v genomu *N. rubripinnis*, i když jeho kopie zaujímají pouze 2 % jaderného genomu *N. rubripinnis*. Predikovaná délka monomeru je 48 bp a jako sonda pro FISH byl použit monomer této sekvence značený na 5' konci pomocí Cy3.

Sekvence (5'-3'):

```
GACCTAGAAGGTTTTTTAGCCCTCGGTCGGACTATTTTCAGAAGTATCC
```

Ribozomální DNA

18S rDNA

Jak jsem již zmínila v kapitole 3.2.3, pro převážnou většinu experimentů byl použit pro přípravu sondy pro 18S rDNA zaklonovaný fragment z tolstolobika bílého, poskytnutý mým školitelem

(Sember et al. 2020b). Pro malou část experimentů (převážně v poslední fázi experimentální činnosti) jsem použila sondu vytvořenou ze zaklonovaného fragmentu 18S rDNA připraveného ze samce *N. guentheri*. Zaklonovaný fragment o délce přibližně 1200 bp obsahoval, jak odhalila analýza BLAST/N, sekvenci shodnou 18S rDNA mnoha ryb (identita 96 %) včetně *N. furzeri* (př. sekvence ID: EU780557.1). Jelikož editace sekvencí a vytvoření konsenzuální sekvence nebylo náplní mé práce, příkládám u této i dalších rDNA vždy neupravenou sekvenci z jednoho vybraného klonu. Vysoká kvalita původních sekvencí mi umožnila analyzovat je bez editace.

Sekvence 18S rDNA z vybraného klonu *N. guentheri* (nekompletní na 5' i 3' konci):

```
TCCGAGGACCTCACTAAACCATCCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGG
CAGGGACTTAATCGACGCGAGCTTATGACCCGCGCTTACTGGGAACCTCTCGTTGATGGG
AAATAATTGCAATCCCCAATCCCTATCACGAGTGGGGTTCAGCGGGTTACCCACGCCTCT
CGGCGAAGGGTAGACACACGCTGATCCACTCAGTGTGGCGCGCGTGCAGCCCCGGACAT
CTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCTCAATCTCGTGTGGCTGAACGCCACTTGTCCCTC
TAAGAAGTTGGACGCCGACCGCACGGGGCCGCGTAACTAGTTAGCATGCCGGAGTCTCGT
TCGTTATCGGAATTAACCAGACAAATCGCTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCA
CCCACAGAATCGAGAAAGAGCTATCAATCTGTCAATCCTTTCCGTGTCCGGGCCGGGTGA
GGTTTCCCGTGTGTGAGTCAAATTAAGCCGCAGGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCA
ATTCCTTTAAGTTTCAGCTTTGCAACCATACTCCCCCGGAACCCAAAGACTTTGGTTTCC
CGGACGCTGCCCCGGCGGGTCATGGGAATAACGCCGCCGGATCGCTAGTTGGCATCGTTTA
TGGTCGGAACACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGAACCTCCGACTTTCGTTCTTGATTAAT
GAAAACATTCTTGGCAAATGCTTTCGCTTTCGTCCGTCTTGCGCCGGTCCAAGAATTCAC
CTCTAGCGGCACAATACGAATGCCCCCGGCCGTCCCTCTTAATCATGGCCCCAGTTCAGA
GAAAAACCCACAAAATAGAACCGGAGTCCTATTCCATTATTCCTAGCTGCGGTATTCAGG
CGACCGGGCCTGCTTTGAACACTCTAATTTTTTCAAAGTAAACGCTTCGGACCCGCGGGA
CACTCAGCTAAGAGCATCGAGGGGCGCCGAGAGGCAGGGCTGGGACAGACGGTAGCTCG
CCTCGCGGCGGACGTCAGCTCGATCCGAGATCCACTACAAGCTTTTACTGCACCACTTTA
GATACGCTATGGAACCTGGAATACGCGGCTGCTGCCCAAACCTGCCCCCAATAATCCCGTTA
AGGATTAAAGGGACCCTTCCATTAAGGGCCCCAAGAATCCGTTTGTATTTTCTCCACCTCC
CAATCGGAATGGAATTGC
```

5S rDNA

5S rDNA varianta 1

Pomocí PCR jsem namnožila fragment o délce přibližně 500 bp, který byl shodný u analyzovaných druhů *N. kadleci*, *N. pienaarri* a *N. rachovii*. Zatímco u *N. kadleci* to byl jediný

produkt amplifikační reakce, u zbylých dvou druhů jsem našla ještě jeden, delší fragment (zhruba 1100-1200 bp dlouhý), který popisuji v další pasáži. Kratší fragment jsem označila jako 5S rDNA var. 1 a po analýze sekvence v BLAST/N jsem zjistila, že obsahuje neúplnou kódující sekvenci genu 5S rDNA. Úplná sekvence má vysoce konzervovaných 120 bp (Martins & Wasco 2004), zatímco kódující část sekvence ve mnou analyzovaných klonech je zkrácená na 5' konci a zahrnuje 94 nt (zvýrazněná část), zbytek sekvence (celková délka analyzované sekvence je 470 bp) zahrnuje nepřepisovaný mezerník (NTS). Červeně jsem v sekvenci označila terminátorovou sekvenci (podle Martins & Wasco 2004). Kódující sekvence 5S rDNA byla při analýze BLAST/N shodná s konzervovanou sekvencí u řady ryb; nejlepší shoda (včetně NTS) byla nalezena se sekvencí 5S rDNA *N. furzeri* (např. ID sekvence: EU780558.1), s identitou 96 %. Sekvence 5S rDNA var. 1 byly shodné mezi *N. kadleci*, *N. pienaari* a *N. rachovii*.

Sekvence 5S rDNA var. 1 z vybraného klonu *N. kadleci* (nekompletní na 5' konci):

**GCCCGATCTCGTCCGATCTCGGAAGCAATCCAGGGTTGGGCCTGGTCAGTACCTGT
ATGGGAGACCTCTTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTCACTAATTTGTTATAAA
ATACAGTTTTTTTCACTTCATCACATCTTTGAACATCTTCGTCATTGAATAATTTTAAAGCC
AGGTGTTCCACACGAAGTGCACACACCTGTTGGTAATAAACCTCCTTTGATTTGTCCCTAG
CAATAATGTCTCAGTGCTGGCATTTTAGAGACAAGAAATGGGGTGGGAGCCGATTGTTAC
TCGAAAAAAGAGCAACAGTGATGAAGACAACTGTTTAACTTAGCCTTTTACCTCCATATG
CAAGAATCTAGTCTTTGCAGTGGGCGACAAAATCATACTTTGACAAATACACAAGGGATT
TTTCAAAGATTTTTCAAGGTTTTTCCTTCGCTTACGGCCATACCAGCCTGAAT**

5S rDNA varianta 2

U *N. pienaari* a *N. rachovii* jsem izolovala druhý fragment 5S rDNA (zhruba 1100–1200 bp dlouhý) a označila jej jako 5S rDNA var. 2. Zvýrazněná oblast v níže uvedené sekvenci zobrazuje kódující oblast pro 5S rRNA a je neúplná na 5' konci stejně jako u varianty 1. Pouze konzervativní kódující oblast vykazovala při analýze BLAST/N identitu (až 96 %) s odpovídajícími úseky u jiných ryb. Zbylá oblast (předpokládaný NTS) nevykazovala podobnost k žádné sekvenci ve veřejné databázi. Celková délka sekvence 5S rDNA var. 2, kterou jsem analyzovala, je 1059 bp a od 5S rDNA var. 1 se tedy liší délkou i sekvencí mezerníku. Červeně je v sekvenci označena terminátorová oblast (podle Martins & Wasco 2004).

Sekvence 5S rDNA var. 2 u vybraného klonu *N. pienaari* (nekompletní na 5' konci):

**GGCCGATCTCGTCCGATCTCGGAAGCTAAGCAGGGTCTGGGCCTGGTTAGTACTTGG
ATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTT****TT**GTCTTGTCTTTTGAGCC
AGCAGAGGGTGCTGTTACGCACTCGCCTTTCTGAGGAACAACACATTACAGACCTCAAAC
AGTTACAACAGCATATTGCACTTTTCCTTAACACAGACATGTCAAAAAGCCCATTATCTG
GGGCAATCAGGTTTTTAAAGACCGTTTCTTCTTCAATACGTTTACATTTTACTTCCCAAGT
TGCGACAGAGAAAATCCAACATCATGTATCTGTGACTTACTTGATATTCAGGGATCTAACT
AAAGATTGTCATTAAGATTTTGTTCGGAGCAAGGCTCTGCAGCCTGCGGCTATGATGGC
ACGTCGCAAGTCTTTGCCGCTTCCCTACCAGCTAAAAGAAATGCGGGCCTTTTACTGGAA
TGGCATCAAAATGCACAAATAGGCCTTTTCCACAAAGACCCAACTAGGTTGTTGGAGAAA
CACATGGCAATTTATTGCTGCCAAACACATGAAAAGCTGAACTCACACACTAAGGAAAAT
CGAGGTGCCGGCCGGCCCGCACCTGTTTGCAAGGATTTACACACGAGGCGCGCCAGA
CAACGCCCGAACAGGGGGGCGTGGGTCCACCTTCCACGGGCCCACCACTCATTGGAGG
GACAAAGGAAAAACGAGGTGCTTCTCTCAATTGAGGTGAAGGTGGCCTTTTTGTACATCC
AAATGTTAAATAATATCGTTTGTACATTCTGATGTCTGCGATCTGAACAAATTTGGATTAA
AGCGCATGAACCAACTCTACTGTGTCACTACACAAGCTCCCCTCTCCGCTTTCACCCACGG
AGCCCGGCCAGACACAGCTCAAACCTGAGGATGAGGGTGTTTTACTGGAAAGGCCTCAAA
TTGCAGCATTCCATTCAATGGCAGCGAAGGCCACAACCTGTCTCTGCACCCTAAAAAAGG
AGGATGGAAGGACAAGCCTTCGCTTACGGCCATACCAGCCTGAAT

5S rDNA varianta 3

Při amplifikaci 5S rDNA u samce *N. lourensi* jsem odhalila jediný fragment, který měl při elektroforéze délku přibližně 800-900 bp. Fragment o této délce jsem neodhalila u žádného ze zkoumaných druhů, tudíž jsem jej nazvala 5S rDNA var. 3. Sekvenováním jsme získali sekvenci o délce 674 nt, zvýrazněná část zobrazuje opět konzervovanou kódující část genu pro 5S rRNA, která je sekvenčně shodná (nebo vykazuje vysokou identitu) napříč variantami i při srovnání s jinými sekvencemi ve veřejné databázi. 5S rDNA var. 3 se opět liší délkou i sekvencí předpokládané mezerníkové oblasti. Červeně jsou v sekvenci označeny možné terminátorové sekvence (podle Martins & Wasco 2004).

Sekvence 5S rDNA var. 3 u vybraného klonu *N. lourensi* (nekompletní na 5' konci):

**GGCCGATCTCGTCCGATCTCGGAAGCTAAGCAGGGTCTGGGCCTGGTTAGTACTTGG
ATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTT****TT**GTCTTGGCTCTACAGCC
GGCAGAGGGTGCTGTTACGCAATCACCTTCTGAGGAACAACACATTACAAACCTCAAAC
TATTAACACACAAACGTCACAAAGCCCATTTCCTGGTCATATTAGC**TTT**TTAAAAGAGTCTT
TCTTCTTCAATACGTTTATTGCAGCCTGCAGCTATGATGCCACAAATACAGAGCATCTCCT

ACTCAGTGTAACAAAAACATACTTGGGGGGGTGATACAGTTCAGTTATGCAGAGCTACAA
ATGGACGGTAATGTCATGAATATACAATTATTGCACATAGAATTGGTATAAATAGATGGT
GGTGGTCAATGGAGGAAGTGGGAAGTGCAGGGGCTGTGTTATCGGTGCATGTGTGAGTTCA
GGGTGGTTATTGCTTTGGGGAAGAACTGTTTTTGTGAGTCTGTGGGTTTTTGTGTTAACGCA
CCTGTAGCGCTTCCCTGAGGGAAGCAGTCGGAACATGTTAAAGCCAGGGTGGGAGCTGTC
CTTGATGATGTTTCTGTCTCTGCACCCATAAAAAGGAGGAAGGAAGGAGAAGCTTTCGCT
TACGGCCATACCAGCCTG

4.2 Karyotypové charakteristiky a hybridizační vzory mapovaných repetitivních sekvencí u studovaných halančíků

4.2.1. Jižní klad

Ve své práci jsem analyzovala všechny druhy afrických halančíků, které řadíme do Jižního kladu. Jsou jimi *N. furzeri*, *N. kadleci*, *N. orthonotus*, *N. pienaari*, *N. krysanovi* a *N. rachovii*. U všech těchto druhů jsem použila metody C-pruhování, rDNA FISH, telomerickou FISH a mapování (všech čtyř nebo vybraných) satelitních DNA z analýzy RepeatExplorer (viz kapitola 4.2.3).

N. furzeri a *N. kadleci*

Karyotyp obou sesterských druhů sestává u všech analyzovaných populací z 19 párů chromozómů ($2n = 38$). Z toho jsou u *N. furzeri* 3 páry metacentrické (m), 6 párů submetacentrických (sm) a 9 párů subtelocentrických až akrocentrických (st-a). U *N. kadleci* jsem identifikovala 2 metacentrické páry, 7 párů sm a 9 párů st-a chromozómů. Zbýlé dva chromozómy jsou u obou druhů pohlavní chromozómy – submetacentrický X a submetacentrický až subtelocentrický (polymorfní) Y chromozóm. Pohlavní chromozómy bylo možné primárně detekovat pouze s pomocí metody BAC-FISH s klony specifickými pro pohlavní chromozómy XY. Tato metoda nebyla součástí mé diplomové práce, nicméně preparáty analyzované touto metodou (připravené a nafocené kolegy z týmu, konkrétně Mgr. Monikou Kreklovou a Mgr. Markem Jankáskem) jsem recyklovala v sekvenčních experimentech na další metody (celkem dvakrát – pro mapování satelitu Nfu-SatC a následně pro rDNA FISH; viz dále a viz Tab. 4). C-pruhování odhalilo robustní pericentromerické bloky na všech chromozómech u všech analyzovaných jedinců *N. furzeri* a *N. kadleci* bez ohledu na

populaci nebo pohlaví (obr. 4A – J). Detekce rDNA pomocí FISH u *N. furzeri* odhalila 1 pár chromozómů nesoucí na dlouhých raménkách 5S rDNA var. 1 (pár č. 4), shodně u všech tří studovaných populací (obr. 5A – F). Naopak sonda pro 18S rDNA odhalila značný polymorfismus ve výskytu těchto klastrů na pohlavních chromozómech, a to jak mezi populacemi, tak i v rámci jedné populace (pop. 3/p121) mezi jedinci. U samců *N. furzeri* se klaster objevoval vždy na krátkých raménkách X chromozómu poblíž centromery (obr. 5A, C, E), u některých jedinců (8 z 11 analyzovaných) se nacházel i na stejném místě Y chromozómu, ale to pouze u populace 3 (obr. 5 C). U samic jsem odhalila signály 18S rDNA ve většině případů na obou X chromozómech v pericentromerické oblasti na krátkých raménkách (obr. 5B, D, F), pouze u populace 3 byly objeveny i případy (6 z 9 analyzovaných samic), kdy se signál objevoval pouze na jednom X chromozómu (obr. 5D). U obou pohlaví *N. furzeri* se 18S rDNA vyskytovala také na jednom dalším chromozómovém páru v pericentromerické oblasti dlouhých ramének (subtelocentrický autozómový pár č. 16) a to u všech jedinců ve všech populacích. Dále byl u samců (6 z 15 analyzovaných jedinců) i samic (6 ze 13 jedinců) populace 1 odhalen jeden menší pericentromerický klaster 18S rDNA na jednom metacentrickém chromozómu z páru č. 3 (obr. 5A, B).

Stejně jako u *N. furzeri* byla u *N. kadlecii* pomocí FISH detekována 5S rDNA na dlouhých raménkách jednoho páru chromozómů (v tomto případě pár č. 3), shodně u všech jedinců obou populací (obr. 6A – D). V případě 18S rDNA naopak oproti *N. furzeri* nebyl zaznamenán žádný polymorfismus, tj. signály po FISH jsem detekovala na autozomálním páru č. 2 (malé metacentrické chromozomy) a na jednom (u samců) nebo obou (u samic) X chromozómech v pericentromerické oblasti krátkých ramének (obr. 6A – D). Výjimku tvořila jedna samice z populace 2, kde se 18S rDNA nevyskytovala ani na jednom X chromozómu.

N. rachovii

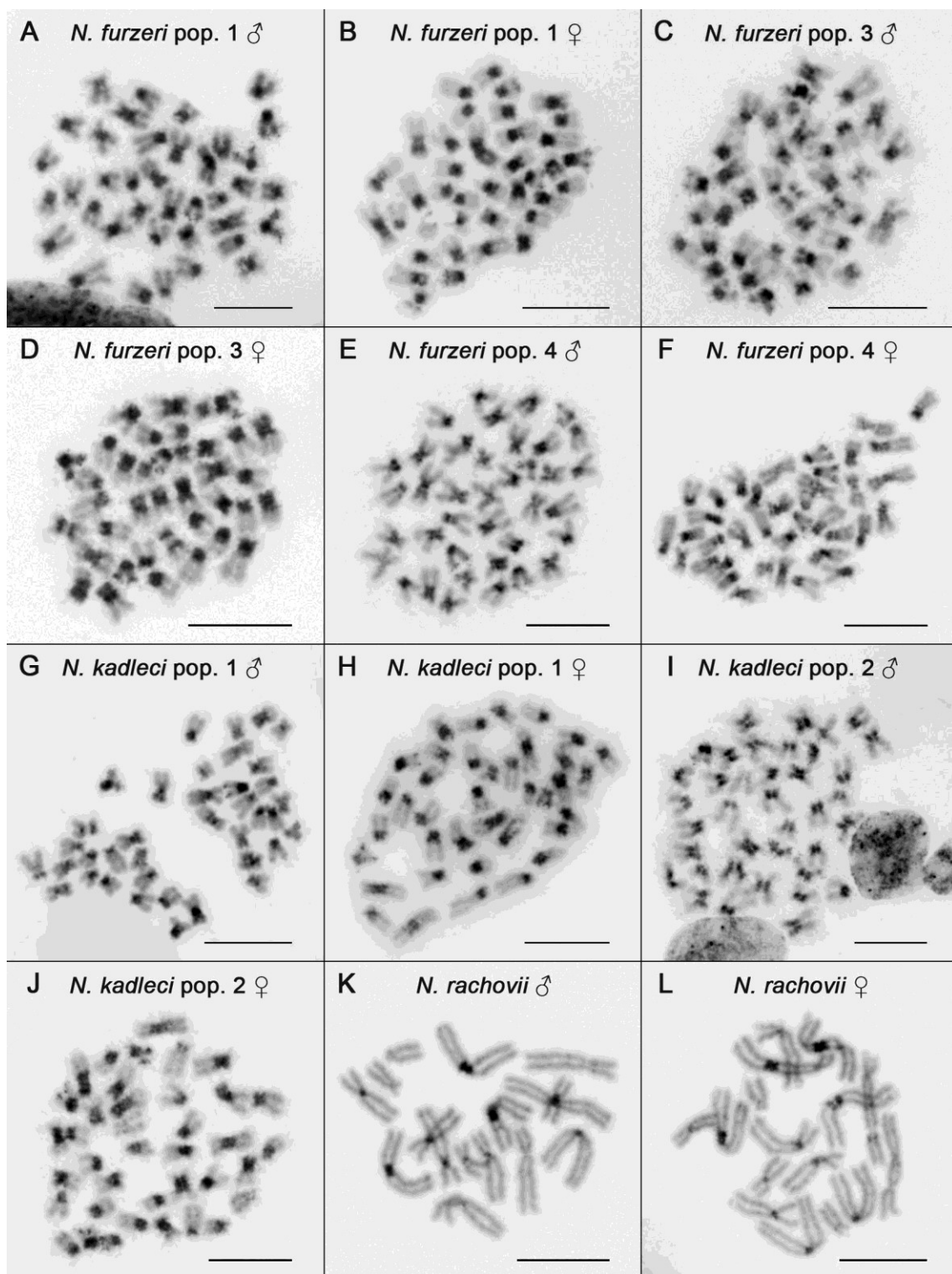
Karyotyp *N. rachovii* je složen u samců i samic pouze z osmi párů chromozómů ($2n = 16; 8m - 6sm - 2a$), což je zároveň nejmenší dosud pozorovaný počet chromozómů u rodu *Nothobranchius* (Krysanov a Demidova 2018). Na základě vlastních analýz (včetně molekulární cytogenetiky) jsem neodhalila polymorfismus vázaný na pohlaví, který by naznačoval přítomnost pohlavních chromozómů. Konstitutivní heterochromatin se vyskytoval u většiny chromozómů v pericentromerické oblasti (obr. 4K, L). Klastry 5S rDNA var. 1 jsem odhalila na jednom chromozómovém páru (pár č. 7) – nacházely se poblíž centromery na dlouhých raménkách. Mapování 5S rDNA var. 2 odhalilo signály na dvou metacentrických

chromozómových párech – v subcentromerické oblasti krátkých ramének páru č. 1 a v telomerické oblasti dlouhých ramének páru č. 3. 18S rDNA byla u tohoto druhu přítomna na nejmenším akrocentrickém chromozómovém páru (č. 8) poblíž centromery a to buď na obou homolozích nebo pouze na jednom z nich (♂1 z 5, ♀2 ze 3 analyzovaných jedinců, u jedné samice se tento polymorfismus vyskytoval i mezi buňkami) (obr. 7A – D).

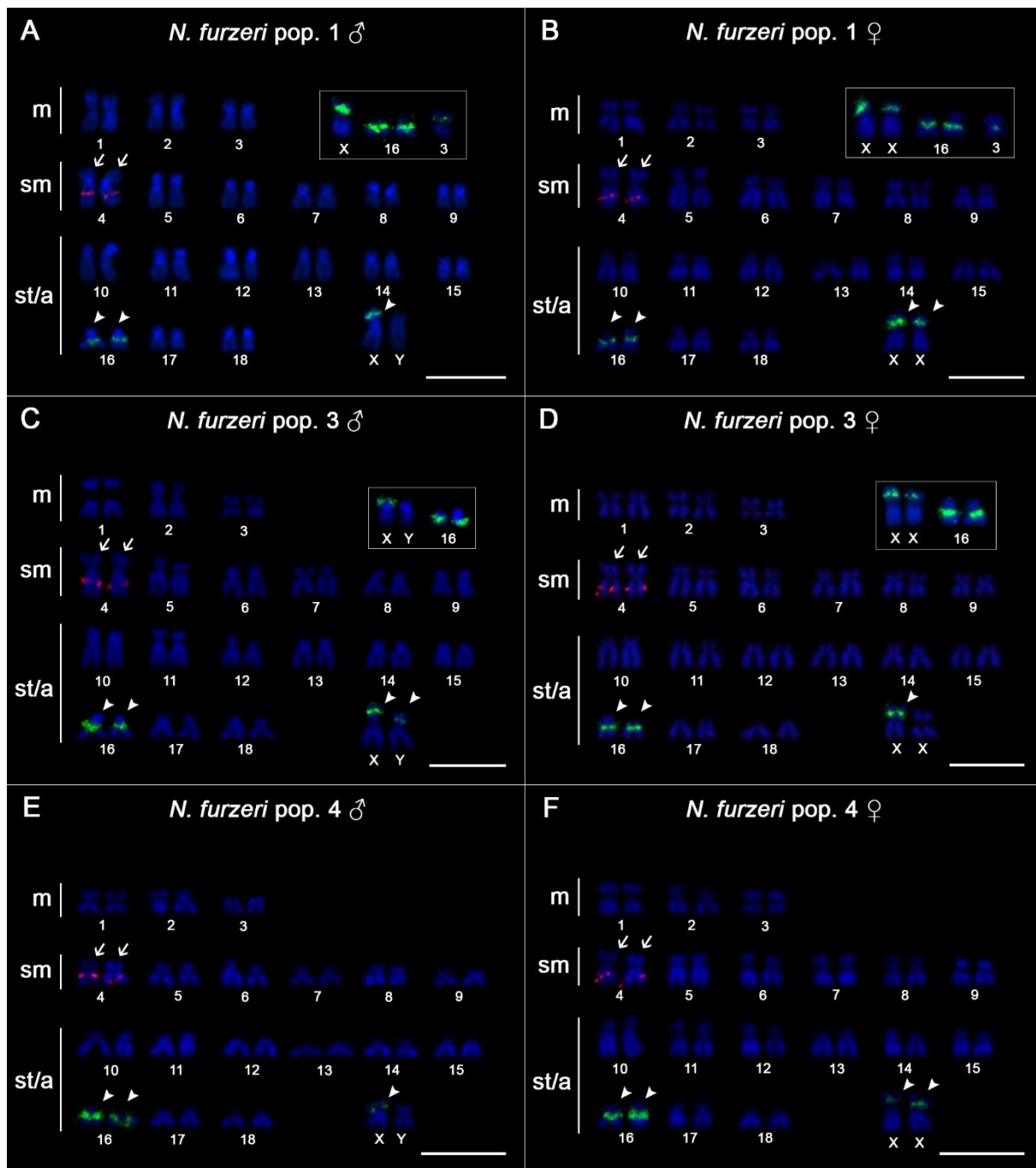
Tab. 4: Pohlavní chromozómy XY samců *N. furzeri* a *N. kadleci* po sekvenčním použití metody FISH s různými sondami.

	<i>N. furzeri</i> pop. 1	<i>N. furzeri</i> pop. 3	<i>N. furzeri</i> pop. 4	<i>N. kadleci</i> pop. 1	<i>N. kadleci</i> pop. 2
	X Y	X Y	X Y	X Y	X Y
BAC-FISH					
Nfu-SatC					
18S rDNA					

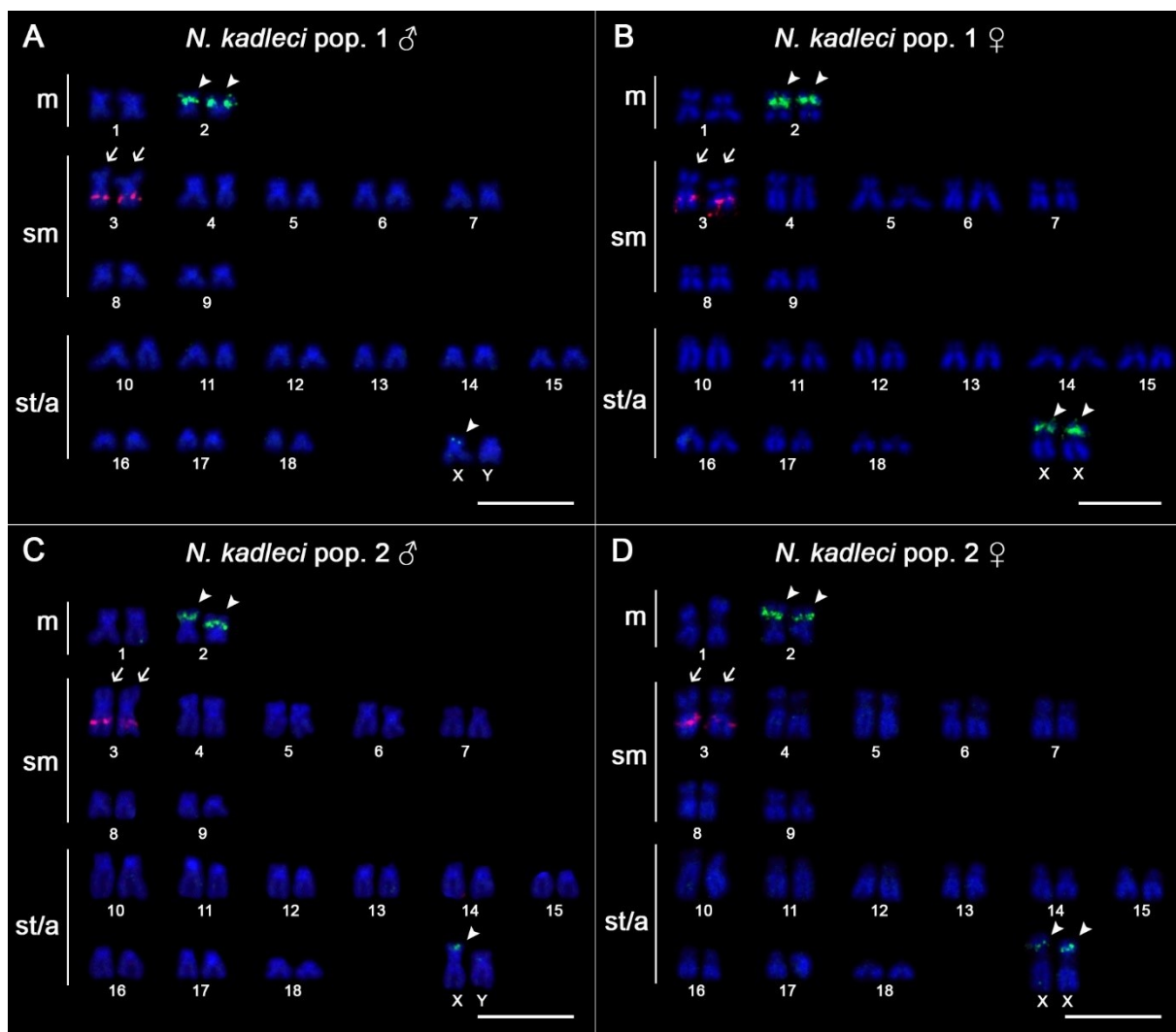
BAC-FISH (červený signál = BAC klon obsahující gen *gdf6Y*, který je předpokládaným ústředním genem determinujícím pohlaví u *N. furzeri* podle Reichwald et al. 2015; zelený signál = X-vázaný BAC klon č. 220Bc03); FISH se satelitní DNA Nfu-SatC (červené signály; výrazně silnější akumulace na chromozómu Y); FISH se sondou pro 18S rDNA (zelený signál; obvykle pouze na chromozómu X), u *N. furzeri* populace 3 byl pozitivní signál objeven i na Y chromozómu (viz níže, obr. 5). Metoda BAC-FISH nebyla součástí mé práce – výsledky kolegů jsou zde uvedeny, neboť bez této metody by nebylo možné jednoznačně identifikovat pohlavní chromozómy XY, a tudíž ani určit hybridizační vzory následně aplikovaných sond Nfu-SatC a 18S rDNA.



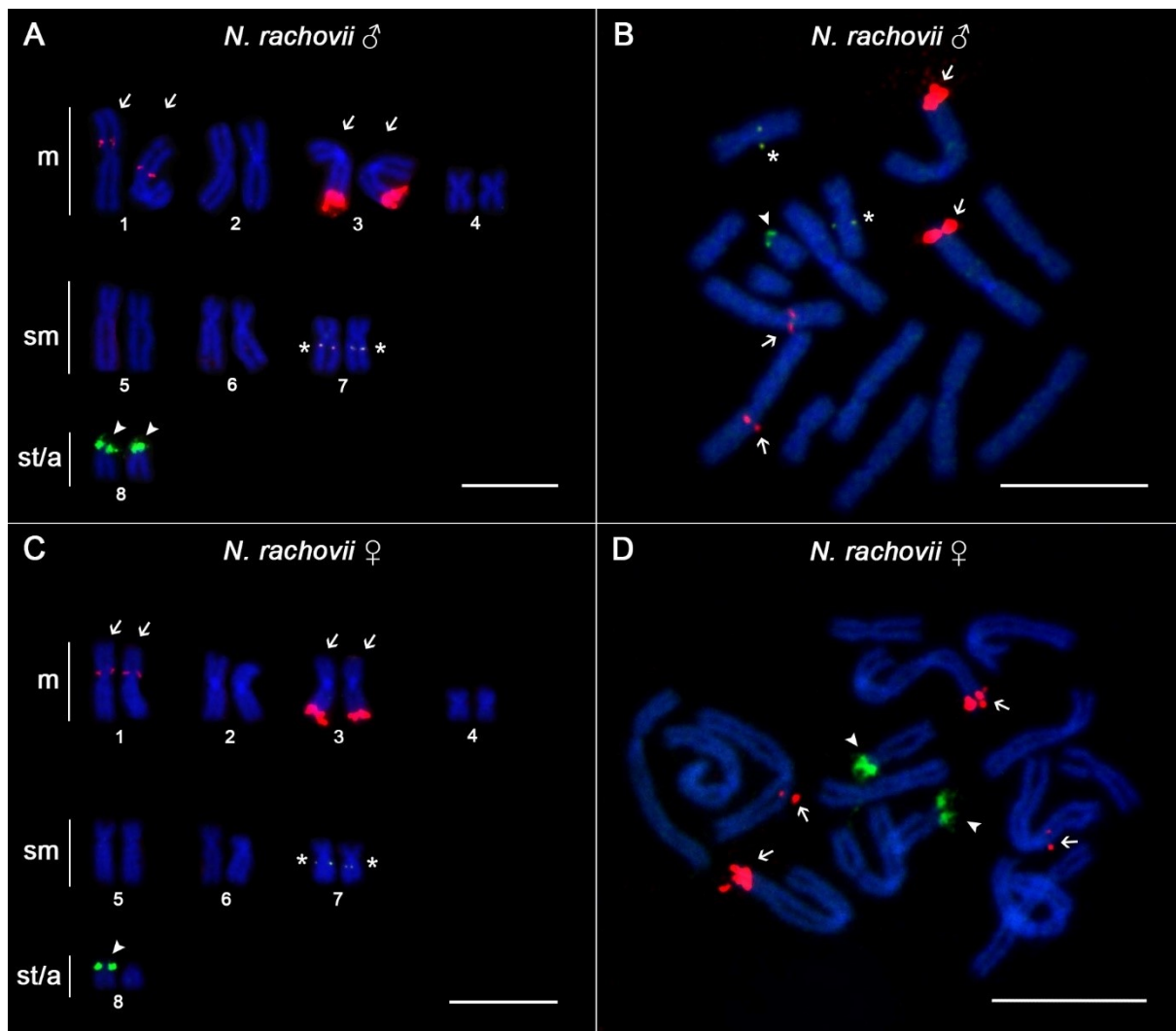
Obr. 4: Metoda C-pruhování provedena na mitotických metafázích u obou pohlaví druhů *N. furzeri*, *N. kadleci* a *N. rachovii*. *N. furzeri* populace 1 (A, B), populace 3 (C, D) a populace 4 (E, F); *N. kadleci* populace 1 (G, H) a populace 2 (I, J); *N. rachovii* (K, L). Chromozómy jsou podbarveny DAPI a výsledný obraz je invertován. Měřítko = 10 μ m.



Obr. 5: Karyotypy samců a samic tří populací *N. furzeri*, sestavené z mitotických metafází po aplikaci dvoubarevné (5S var. 1/18S rDNA) FISH. *N. furzeri* populace 1 (A, B), populace 3 (C, D) a populace 4 (E, F). FISH se sondou pro 5S rDNA var.1 (červeně, označeny šipkami) a 18S rDNA (zeleně, označeny hroty šipek); rámečky zobrazují polymorfní chromozómové páry ve smyslu přítomnosti/absence signálu 18S rDNA. Je zřejmé, že polymorfizmy zahrnovaly autozomy a/nebo pohlavní chromozómy. Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítko = 10 μ m.



Obr. 6: Karyotypy samců a samic dvou populací *N. kadleci*, sestavené z mitotických metafází po aplikaci dvoubarevné (5S var. 1/18S rDNA) FISH. *N. kadleci* populace 1 (A, B) a populace 2 (C, D). FISH se sondou pro 5S rDNA var.1 (červeně, označeny šipkami) a 18S rDNA (zeleně, označeny hroty šipek); u populací těchto druhů jsem nepozorovala variabilitu ve smyslu přítomnosti/absence signálu 18S rDNA. Klastř 18S rDNA se v rámci pohlavních chromozómů vyskytoval vždy pouze na chromozómu X. Za zmínku stojí, že chrom. pár č. 2, se signálem 18S rDNA, je pravděpodobně homeologní k polymorfnímu chromozomu s tímto signálem (pár č. 3) u *N. furzeri* populace 1 (viz Obr. 5A, B). Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítka = 10 μ m.



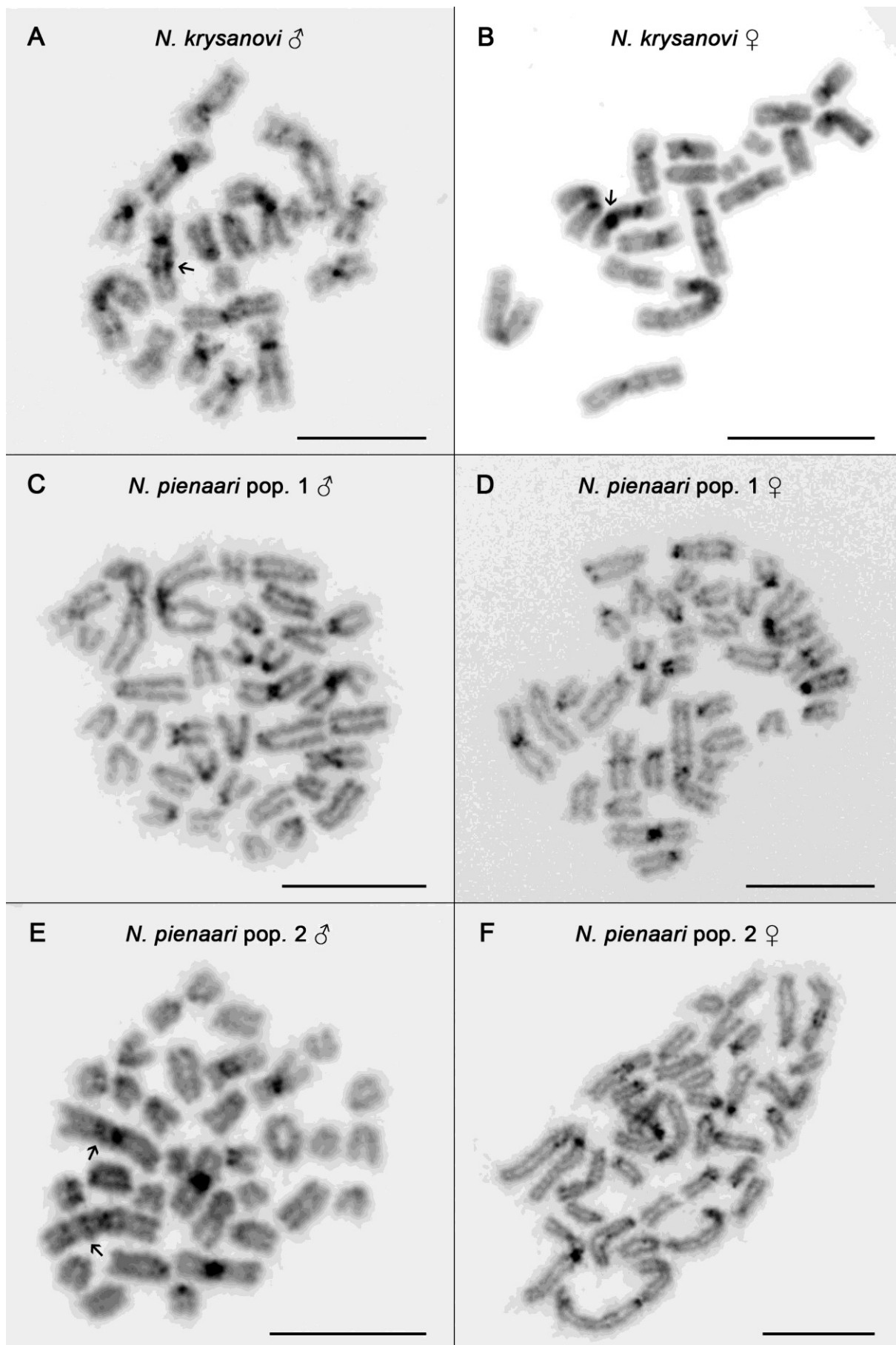
Obr. 7: Metafáze a karyotypy samců a samic jedné populace *N. rachovii*, sestavené z mitotických metafází po aplikaci trojbarevné (5S var.1/5S var.2/18S rDNA) a dvojbarevné (5S var. 2/18S rDNA) FISH. Samčí karyotyp (A) a metafáze jiného jedince (B). Samičí karyotyp (C) a metafáze jiného jedince (D, zde se jedná o dvojbarevnou FISH 5S var. 2/18S rDNA). Důvodem zobrazení metafází dalších jedinců je polymorfismus v přítomnosti/absenci signálu 18S rDNA na jednom z homologů nejmenšího chromozómu v karyotypu (st pár 8). Schéma experimentu: trojbarevnou FISH (A, B, C) jsem provedla se sondou pro 5S rDNA var. 1 značenou biotin-dUTP a digoxigenin-dUTP (žlutě, označeno hvězdičkami), 5S rDNA var. 2 značenou biotin-dUTP (červeně, označeny šipkami) a 18S rDNA značenou digoxigenin-dUTP (zeleně, označeny hroty šipek). Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítka = 10 μ m.

N. krysanovi a *N. pienaari*

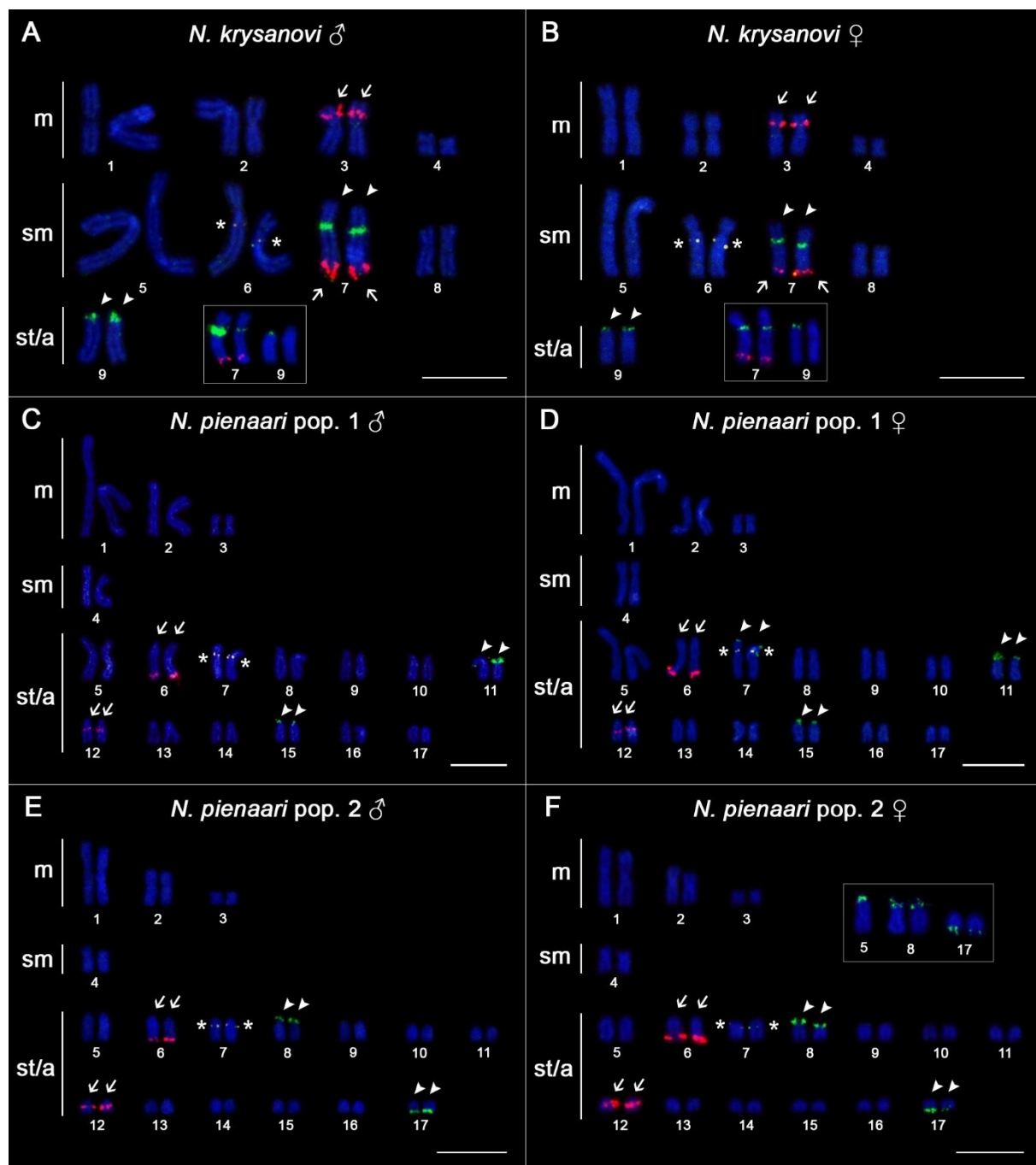
Karyotyp *N. krysanovi* obsahuje 9 párů chromozómů ($2n = 18$; $8m - 8sm - 2a$). Na základě vlastních analýz (včetně molekulární cytogenetiky) jsem neodhalila polymorfismus vázaný na pohlaví, který by naznačoval přítomnost pohlavních chromozómů. Konstitutivní heterochromatin se vyskytoval u většiny chromozómů v pericentromerické oblasti, u jednoho submetacentrického páru blok interkalárního heterochromatinu na dlouhých raménkách chromozómů (obr. 8A, B). FISH odhalila signály 5S rDNA var. 1 v blízkosti centromery na dlouhých raménkách chromozómového páru č. 6. Klastry 5S rDNA var. 2 se stejně jako

u *N. rachovii* vyskytují na dvou chromozómových párech, a to u jednoho páru (metacentrického) v pericentromerické oblasti krátkých ramen (pár č. 3), u druhého páru (submetacentrického) v terminální oblasti dlouhých ramen (pár č. 7). Jeden klastř 18S rDNA se nacházel v pericentromerické oblasti akrocentrickém páru č. 9, a to buď na jednom (u 3 z 6 studovaných samců a u 2 ze 4 studovaných samic), nebo obou homologů tohoto páru. Druhý pár signálů 18S rDNA se vyskytoval v pericentromerické oblasti dlouhých ramének na stejném chromozomovém páru (pár č. 7) jako 5S rDNA var. 2, jedná se tedy o syntenní uspořádání klastřů těchto dvou rDNA (obr. 9A, B).

Karyotyp *N. pienaari* sestává ze 17 párů chromozómů ($2n = 34$; $6m - 2sm - 26st/a$) u obou populací. Na základě vlastních analýz (včetně molekulární cytogenetiky) jsem neodhalila polymorfismus vázaný na pohlaví, který by naznačoval přítomnost pohlavních chromozómů. Konstitutivní heterochromatin tvořil robustní (zejména u velkých metacentrických chromozómů) nebo méně výrazné pericentromerické bloky, a to přibližně u poloviny chromozómů (obr. 8C – F). Kromě toho se na jednom z velkých párů metacentrických chromozómů vyskytoval ještě další blok interkalárního heterochromatinu na jednom raménku, u pop. 2 byl daleko více patrný (obr. 8E). Podobně jako u předchozích dvou druhů jsem metodou FISH mapovala obě varianty 5S rDNA. Var. 1 se nacházela poblíž centromery na dlouhých raménkách jednoho chromozómového páru shodně u obou studovaných populací (pár č. 7). Stejně tak 5S rDNA var. 2 se vyskytovala na dvou chromozómových párech, v tomto případě řazených do skupiny subtelocentriků a akrocentriků. U jednoho páru v pericentromerické oblasti dlouhých ramen (pár č. 12), u druhého páru v telomerické oblasti dlouhých ramen (pár č. 6). 18S rDNA byla odhalena u dvou párů chromozómů, přičemž mezi populacemi se tyto páry lišily (obr. 9C – F). U populace 1 se jednalo o pericentromerickou oblast chromozómových párů 11 a 15 (obr. 9C, D), v případě populace 2 šlo o páry 8 a 17, přičemž u páru 8 byl signál detekován v pericentromerické oblasti, naopak u páru 17 v telomerické oblasti dlouhých ramének (obr. 9E, F). Navíc u jedné samice populace 1 jsem odhalila ještě třetí klastř 18S rDNA, který se vyskytoval v telomerické oblasti krátkých ramének stejného chromozómového páru (č. 7) jako klastř 5S rDNA var. 1 (obr. 9D). Dále jsem u jedné ze tří analyzovaných samic z populace 2 pozorovala polymorfismus, kdy se, podobně jako u samice populace 1, vyskytoval další signál 18S rDNA, v tomto případě jen na jednom z homologů páru č. 5 v pericentromerické oblasti (obr. 9F).



Obr. 8: Metoda C-pruhování provedena na mitotických metafázích u obou pohlaví druhů *N. krysanovi* a *N. pianaari*, *N. krysanovi* (A, B), *N. pianaari* populace 1 (C, D) a *N. pianaari* populace 2 (E, F). Šípky ukazují na bloky interkalárního heterochromatinu (A, B, E). Chromozómy jsou podbarveny DAPI a výsledný obraz je invertován. Měřítka = 10 μ m.

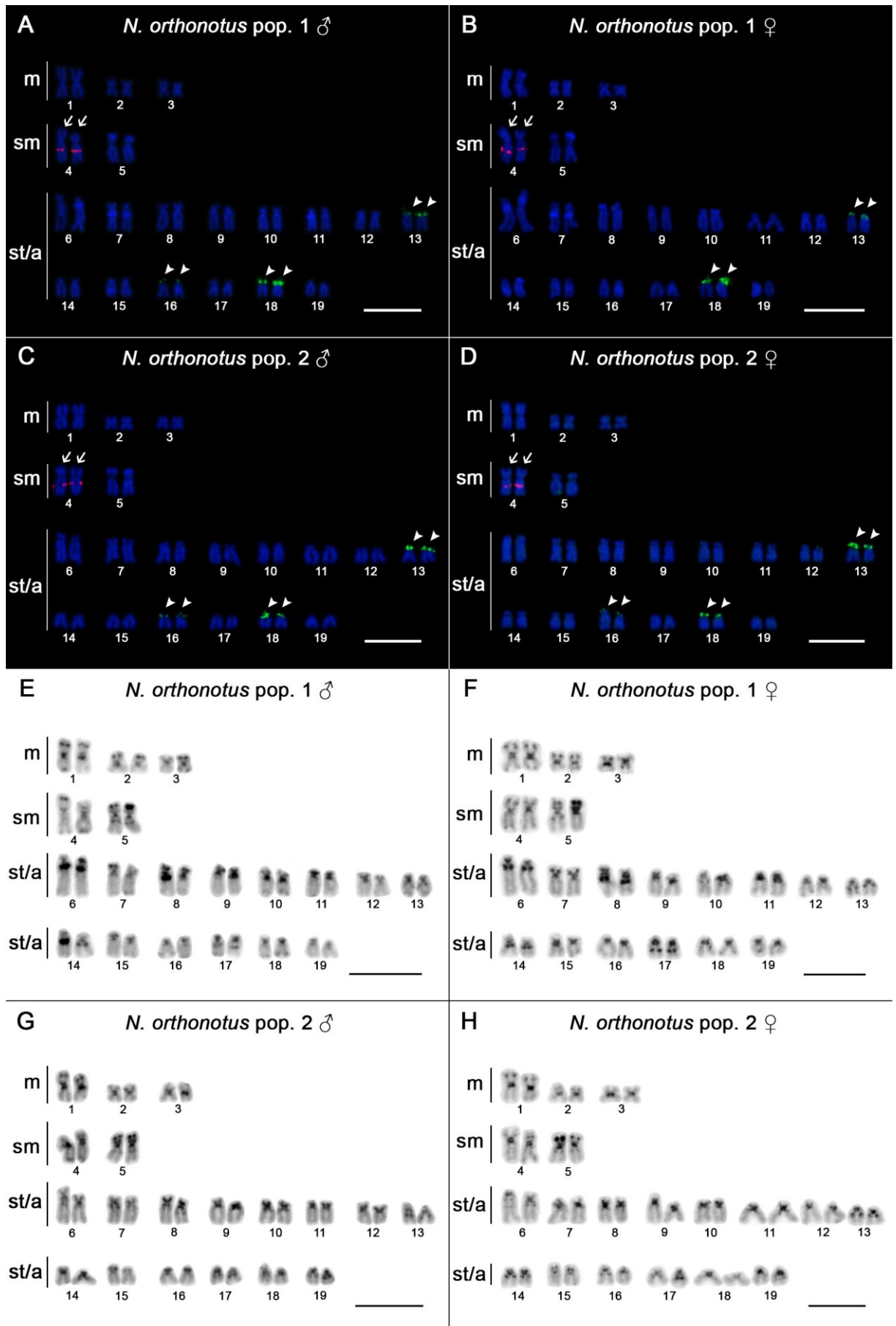


Obr. 9: Karyotypy samic a samců jedné populace *N. krysanovi* a dvou populací *N. pianaari*, sestavené z mitotických metafází po sekvenční aplikaci dvoubarevné (5S var.2/18S rDNA) a následně jednobarevné (5S rDNA var. 1) FISH. *N. krysanovi* (A, B), *N. pianaari* populace 1 (C, D) a populace 2 (E, F). FISH se sondou pro 5S rDNA var.1 (žlutě, označeny hvězdičkami), 5S rDNA var. 2 (červeně, označeny šipkami) a 18S rDNA (zeleně, označeny hroty šipek); rámečky zobrazují polymorfní chromozómové páry ve smyslu přítomnosti/absence signálu 18S rDNA. Schéma experimentu: nejdříve jsem provedla dvoubarevnou FISH s „přímo“ značenými oligonukleotidy (tj. dUTP konjugované s fluorochromem), konkrétně se sondami 5S rDNA var. 2 a 18S rDNA.

Důvodem je, že odmytí signálů po „přímé“ FISH je obecně snazší než odmyváání sond značených biotin-dUTP nebo digoxigenin-dUTP. Ve druhém kole jsem mapovala 5S rDNA var. 1, zde za použití značení digoxigenin-dUTP a detekce Anti-DIG-FITC, což pomohlo zvýraznit jinak slabý signál 5S var. 1. Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítka = 10 μ m

N. orthonotus

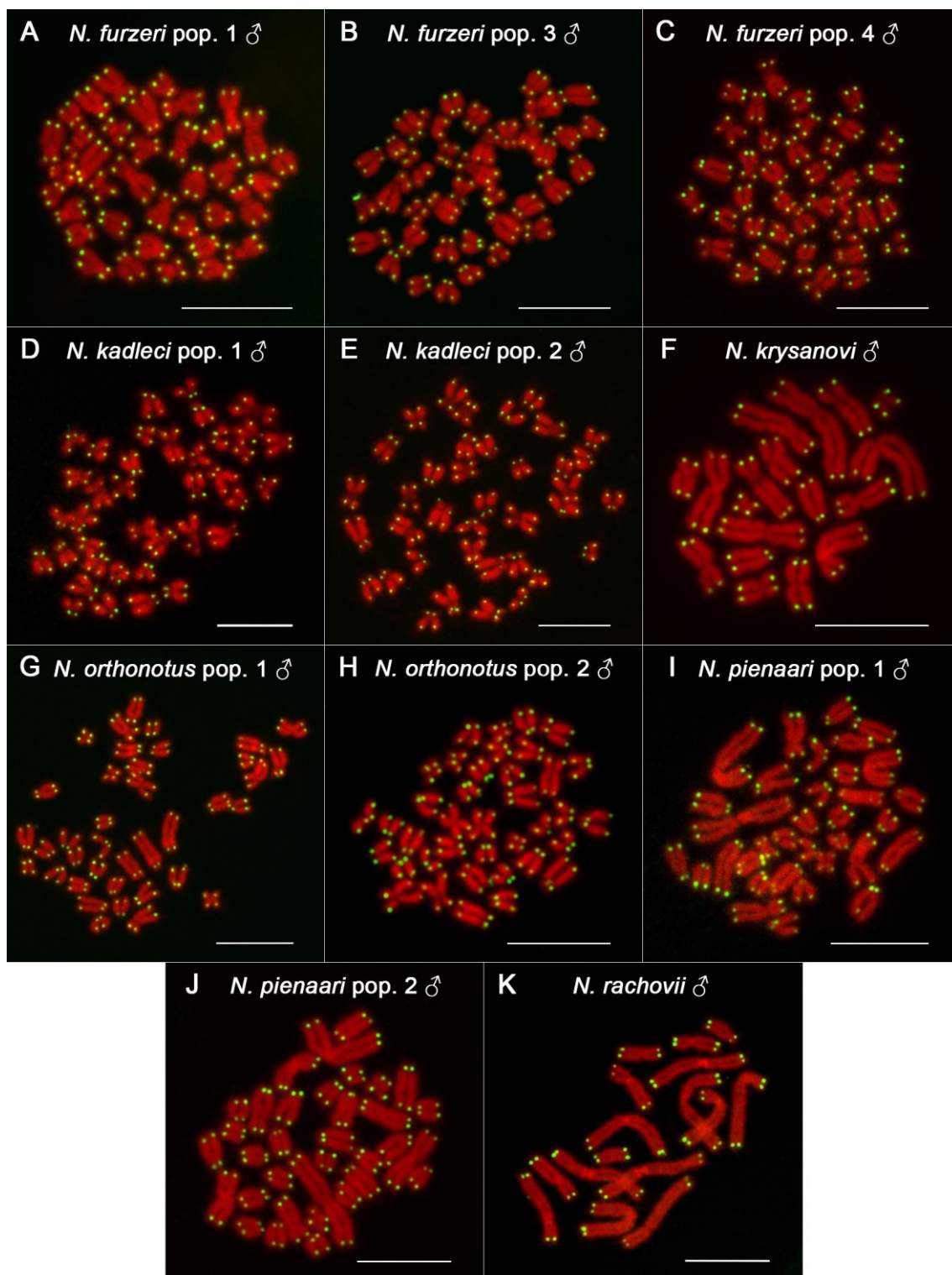
Karyotyp *N. orthonotus* je složen z 19 párů chromozómů ($2n = 38$; 6m – 4sm – 28st/a). Na základě vlastních analýz (včetně molekulární cytogenetiky) jsem neodhalila polymorfismus vázaný na pohlaví, který by naznačoval přítomnost pohlavních chromozómů. C-pruhování odhalilo u tohoto druhu relativně vyšší obsah heterochromatinu v porovnání s většinou ostatních druhů (s výjimkou *N. furzeri* a *N. kadleci*). Bloky heterochromatinu tvořily charakteristické pericentromerické, terminální i intersticiální bloky, které umožnily lépe identifikovat homology pro sestavení karyotypu (obr. 10E – H). Stejně jako u předchozích druhů byla 5S rDNA var. 1 zjištěna metodou FISH na jednom chromozómovém páru, konkrétně na submetacentrickém páru č. 4 v submetacentrické oblasti dlouhých ramének. U tohoto druhu jsem zároveň zkusila mapovat také 5S rDNA var. 2, přestože PCR její přítomnost nenaznačovala (A. Sember, osobní sdělení). S jistým překvapením jsem skutečně signály 5S rDNA var. 2 u jednoho samce populace 2 detekovala, ale jelikož se nejednalo o přímé srovnání sond variant 1 a 2, nejsem schopna výsledek specifitěji komentovat a v důsledku obsahových možností mé diplomové práce a množství dat ke zpracování jsem se již touto problematikou dále nezabývala. Sonda pro 18S rDNA odhalila signály na třech chromozómových párech ze skupiny subtelocentriků a akrocentriků (páry č. 13, 16, 18) v pericentromerické oblasti. Výjimku tvořila samice z populace 1, kde byla 18S rDNA mapována pouze na dvou z těchto párů (páry č. 13 a 18). Nicméně i u ostatních jedinců je signál na daném páru (pár č. 16) slabý a obtížněji detekovatelný, je tedy možné, že u samice pop. 1 je jen pod detekčním limitem FISH (obr. 10A – D).



Obr. 10: Karyotypy samců a samic dvou populací *N. orthonotus*, sestavené z mitotických metafází po aplikaci dvoubarevné (5S var. 1/18S rDNA) FISH a po metodě C-pruhování. *N. orthonotus* populace 1 (A, B, E F) a *N. orthonotus* populace 2 (C, D, G, H). FISH se sondou pro 5S rDNA var.1 (červeně, označeny šipkami) a 18S rDNA (zeleně, označeny hroty šipek); metoda C-pruhování (E, F, G, H; invertováno). Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítko = 10 μ m.

Distribuce telomerických repetitiv u druhů Jižního kladu

Telomerická sonda hybridizovala u všech druhů pouze ke koncům chromozómů a neodhalila tak žádné přídavné intersticiální signály (obr. 11).

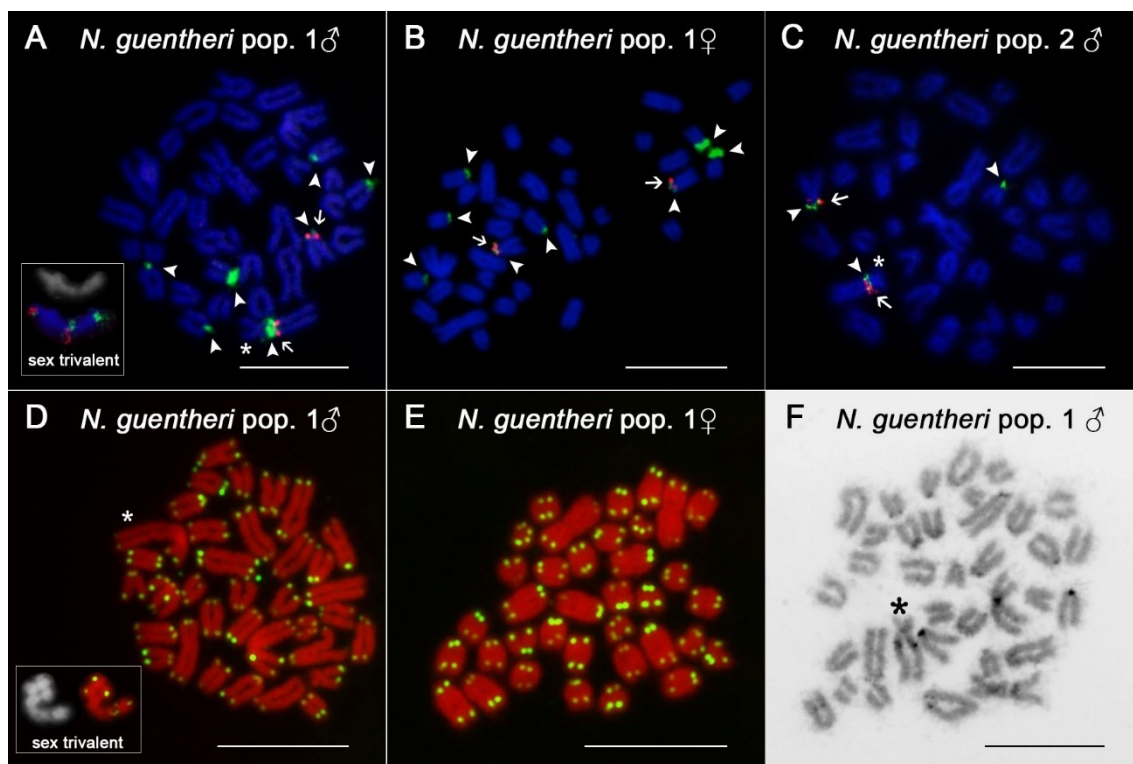


Obr. 11: Metoda FISH s telomerickou sondou provedena na mitotických metafázích samců u druhů Jižního kladu. Pro lepší kontrast byly obrázky pseudokolorovány (telomerická sonda – zeleně; DAPI – červeně). Měřítka = 10 μm.

4.2.2 Druhy s mnohočetnými pohlavními chromozómy

U druhů *Nothobranchius guentheri* a *N. lourensi* byl potvrzen mnohočetný systém pohlavních chromozómů typu X_1X_2Y . Podobně jako u druhů z Jižního kladu byly i u těchto dvou druhů aplikovány rDNA FISH (Obr. 12A–C; 13A), telomerická FISH (Obr. 12D, E; 13C) a C-pruhování (Obr. 12F; 13B).

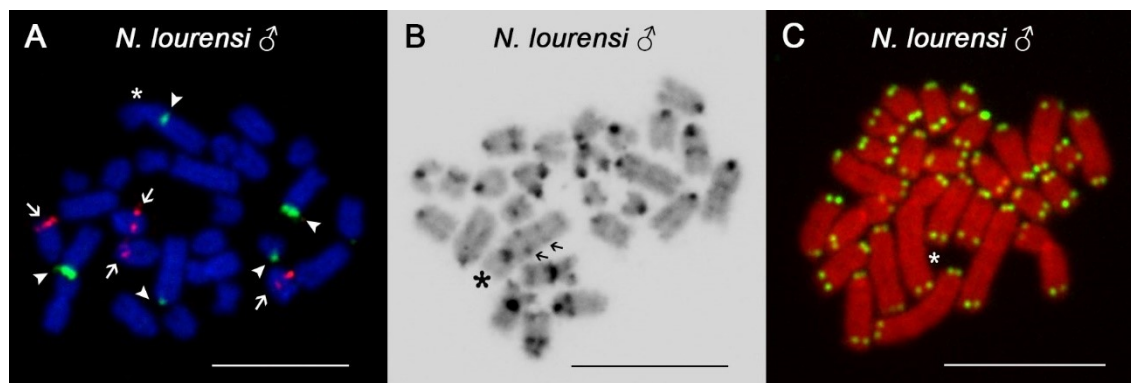
U *N. guentheri* jsem analyzovala převážně akvarijní populaci (pop. 1), ale měla jsem k dispozici i jednoho samce z populace 2. *N. guentheri* má karyotyp sestávající u samice z 18 párů chromozómů ($2n = 36$) a u samce z 16 páru a 3 pohlavních chromozómů ($2n = 35$). Samec z populace 2 měl shodné $2n$ jako samec z akvarijní populace 1. U obou pohlaví se nachází jeden pár největších metacentrických chromozómů a dále st-a chromozómy s nízkým obsahem konstitutivního heterochromatinu, limitovaného na pericentromerické oblasti některých chromozómů. U samců populace 1 (samec populace 2 nebyl analyzován) se navíc vyskytoval specifický interkalární blok na subtelocentrickém neo-Y chromozómu (obr. 12F). 5S rDNA var. 1 se nacházela u samce i samice populace 1 pouze na pohlavních chromozómech, kde těsně přiléhala k syntennímu klastru 18S rDNA. V případě samce se jednalo o interkalární signál na chromozómu neo-Y a o jeden z dalších pohlavních chromozómů, tj. buď X_1 nebo X_2 (má data neumožňují přesnou identifikaci), kde se v terminální oblasti krátkého raménka vyskytoval klastr 5S rDNA var. 1 rovněž přidruženě s klastrem 18S rDNA (obr. 12A). U samice se tyto signály vyskytovaly na páru akrocentrických chromozómů, tj. oba homology chromozómu X_1 nebo X_2 v pericentromerické oblasti (obr. 12B). 18S rDNA se u *N. guentheri* populace 1 vyskytovala na 7 chromozómech, u samice na 8 chromozómech, taktéž s kolokalizací. U *N. guentheri* populace 2 se vyskytovala 5S rDNA na dvou chromozómech, stejně jako u populace 1, tedy na neo-Y chromozómu a jednom z dalších pohlavních chromozómů. Dále jsem u samce z populace 2 odhalila výrazně odlišný počet signálů 18S rDNA – vyskytovaly se pouze na třech chromozómech, tedy zřejmě na X_1 , X_2 a neo-Y (obr. 12C). Telomerická sonda aplikovaná na populaci 1 hybridizovala u všech chromozómů obou pohlaví pouze na jejich koncích; neodhalila jsem žádné nadbytečné signály uvnitř chromozómů (obr. 12D, E).



Obr. 12: Mitotické metafáze u *N. guentheri* po aplikaci různých cytogenetických protokolů. FISH se specifickou sondou pro 5S rDNA var. 1 (červeně, označeny šipkami) a 18S rDNA (zeleně, označeny hroty šipek) (A, B, C); telomerická FISH – pro lepší kontrast byly obrázky pseudokolorovány (telomerická sonda – zeleně; DAPI – červeně) (D, E); C-pruhování (F). Rámečky (A, D) zobrazují trivalent tvořený pohlavními chromozomy X_1 , X_2 a neo-Y během profáze prvního meiotického dělení (fáze diplotene). Hvězdičky označují chromozóm neo-Y. Chromozómy jsou ve všech případech podbarveny DAPI, v případě C-pruhování (F) se jedná o invertovaný obraz. Chromozóm neo-Y nese specifický interkalární blok konstitutivního heterochromatinu (F). Měřítka = 10 μ m.

Karyotyp jediného samce *N. lourensi* sestává z 12 párů autozómů a 3 pohlavních chromozómů tvořících opět systém X_1X_2Y ($2n = 27$), kde submetacentrický neo-Y chromozóm je zdaleka nejdelším chromozómem v karyotypu. Stejně jako u předchozího druhu převažují v karyotypu akrocentrické a subtelocentrické chromozómy. C-pruhování odhalilo relativně vyšší obsah konstitutivního heterochromatinu v porovnání s *N. guentheri*. Konstitutivní heterochromatin tvořil nápadné pericentromerické bloky u většiny chromozómových párů, u neo-Y chromozómu jsou navíc viditelné další, interkalární bloky (obr. 13B). Zatímco sonda pro 5S rDNA var. 1 na chromozómy samce *N. lourensi* nehybridizovala (data nejsou prezentována), specifická sonda pro 5S rDNA var. 3, izolovaná přímo ze mnou studovaného samce *N. lourensi*, odhalila signály na 2 chromozómových párech; na jednom páru v pericentromerické oblasti krátkých ramének a na druhém páru v submetacentrické oblasti dlouhých ramének. Klastry 18S rDNA jsem odhalila na pěti chromozómech; jedním z nich byl neo-Y chromozóm, kde se signál nacházel interkalárně na dlouhých raménkách tohoto

pohlavního chromozómu (obr. 13A). U ostatních čtyř chromozómů se 18S rDNA signál nacházel v pericentromerické oblasti (obr. 13A). Telomerická FISH odhalila pouze standardní hybridizační vzor, tj. signály na koncích všech chromozómů (obr. 13C).



Obr. 13: Mitotické metafáze u *N. lourensi* po aplikaci různých cytogenetických protokolů. FISH se specifickou sondou pro 5S rDNA var. 1 (červeně, označeny šipkami) a 18S rDNA (zeleně, označeny hroty šipek) (A); C-pruhování (B); telomerická FISH – pro lepší kontrast byly obrázky pseudokolorovány (telomerická sonda – zeleně; DAPI – červeně) (C). Hvězdičky označují chromozóm neo-Y. Chromozómy jsou ve všech případech podbarveny DAPI, v případě C-pruhování (C) se jedná o invertovaný obraz. Chromozóm neo-Y nese dva specifické interkalární bloky konstitutivního heterochromatinu, označeno šipkami (C). Měřítko = 10 μ m.

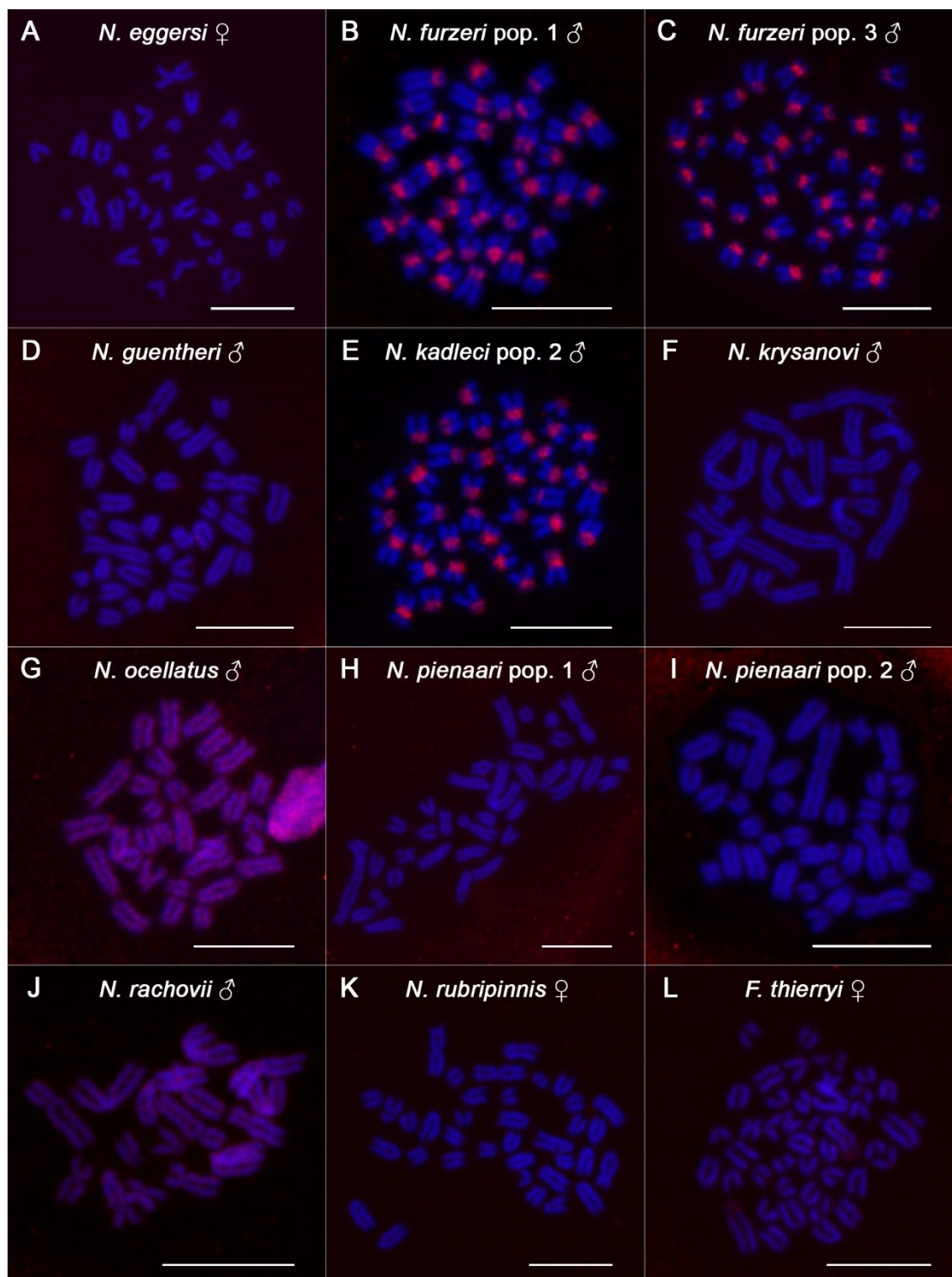
4.2.3 Mapování satelitní DNA napříč rodem *Nothobranchius*

Čtyři repetitivní DNA identifikované analýzou RepeatExplorer, tj. Nfu-SatA, Nfu-SatB, Nfu-SatC (*N. furzeri*) a Nru-Sat1 (*N. rubripinnis*), jsem mapovala u vybraných druhů halančíků tak, aby byly reprezentovány hlavní linie napříč fylogenetickým stromem a zahrnula jsem i „outgroup“ *F. thierryi*. Jednalo se o analýzu na malém počtu jedinců/druh/populaci. Cílem bylo zejména odhalit do jaké míry sdílejí populace a příbuzné druhy halančíků konkrétní motivy satelitní a minisatelitní DNA. V případě Nfu-SatA a Nfu-SatB se jedná o stejné motivy, které byly již identifikovány v předchozích pracích (Reichwald et al. 2009, 2015).

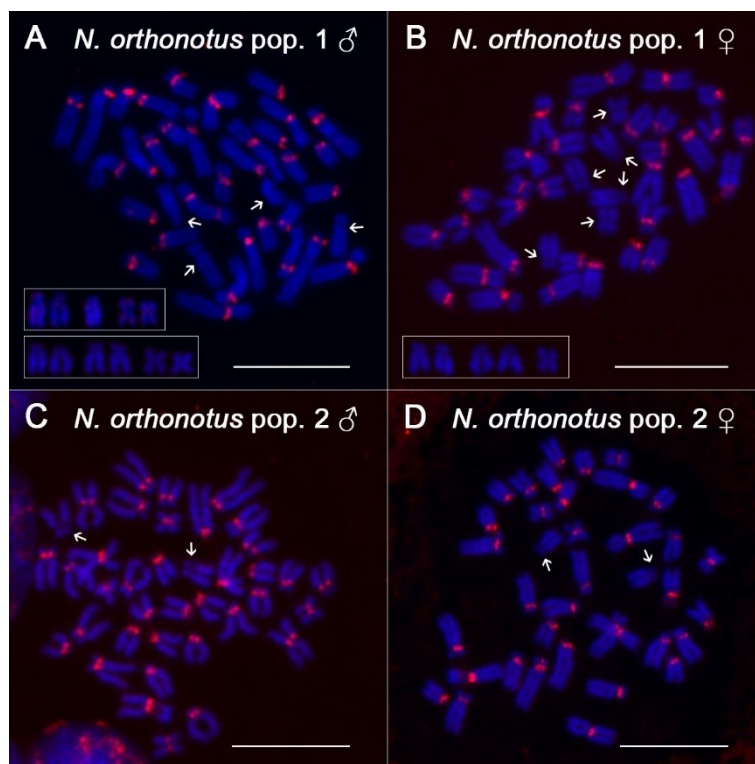
Nfu-SatA

Minisatelit s monomerním 77 bp tvořil neobvykle robustní centromerické/pericentromerické klastry na všech chromozómech u *N. furzeri* a *N. kadleci* (bez ohledu na pohlaví nebo populaci) (Obr. 14). Nacházel se dále již jen u obou populací *N. orthonotus*, tj. druhu nejbližší příbuzného k výše uvedeným; u dalších deseti analyzovaných druhů (Tab. 5) jsem neodhalila žádné hybridizační signály (Obr. 14). U obou populací *N. orthonotus* Nfu-SatA opět tvořil pericentromerické (již o něco méně robustní) bloky

pericentromerického heterochromatinu, ale tentokrát ne na úplně všech chromozómech v karyotypu a počet chromozomů bez signálu se lišil mezi populacemi a v rámci populace 1 i mezi jedinci. U populace 1 chyběl signál Nfu-SatA na čtyřech až šesti chromozómech (u třech analyzovaných samců jsem pozorovala 1x4, 1x5 a 1x6 chromozomů bez signálu, zatímco u třech analyzovaných samic to bylo 1x5 a 2x6 chromozomů) (obr. 15A, B). V populaci 2 se Nfu-SatA nevyskytoval pouze u jednoho chromozómového páru (obr. 15C, D).



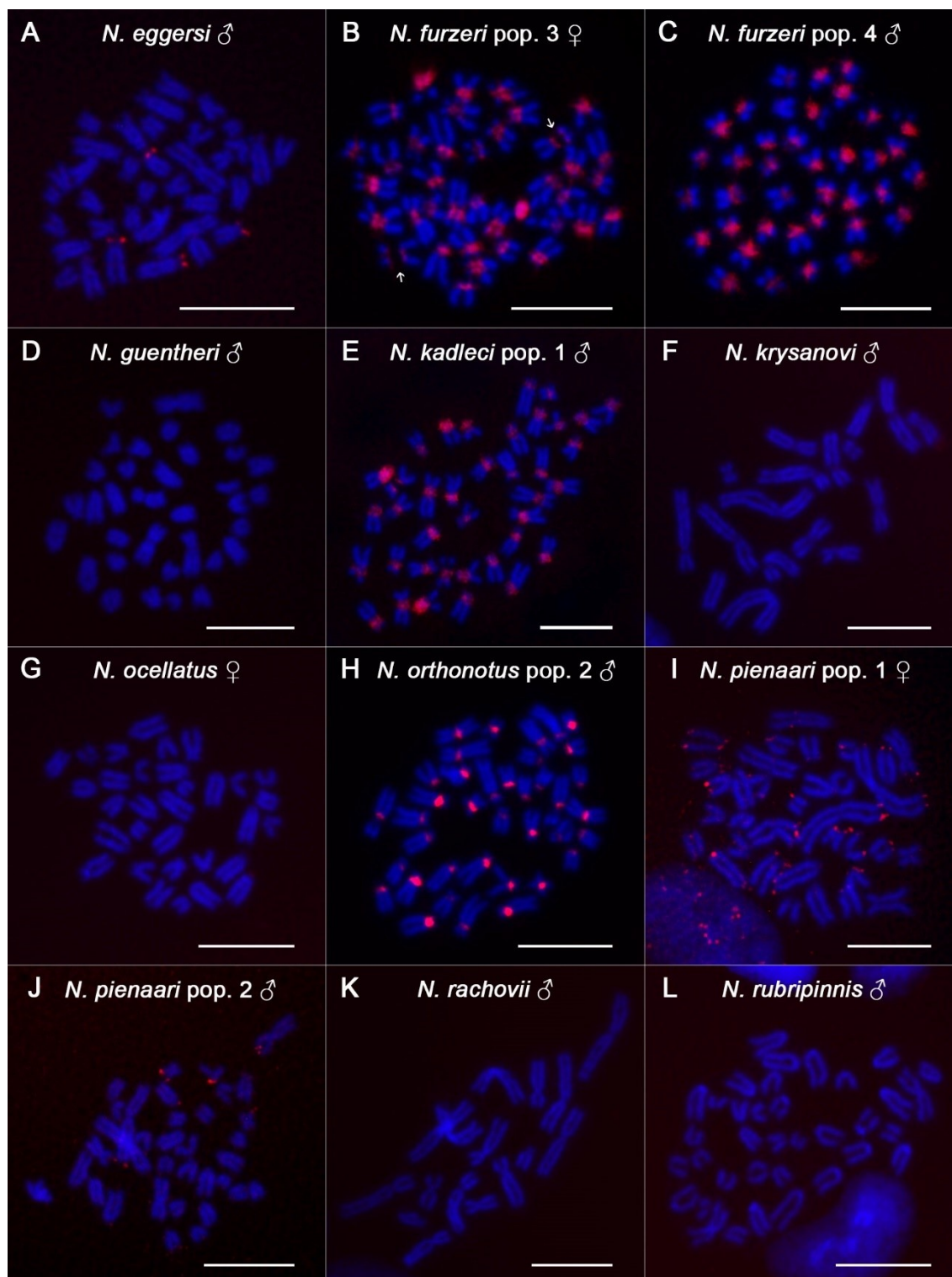
Obr. 14: Mitotické metafáze vybraných druhů halančíků po aplikaci metody FISH se sondou pro minisatelit Nfu-SatA. Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítko 10 μ m.



Obr. 15: Mitotické metafáze *N. orthonotus* po aplikaci metody FISH se sondou pro minisatelit Nfu-SatA. *N. orthonotus* populace 1 (A, B) a populace 2 (C, D); šipky ukazují na chromozómy bez signálu, rámečky zobrazují polymorfni chromozómové páry ve smyslu absence signálu (A, B). Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítka = 10 μ m.

Nfu-SatB

Tato satelitní DNA vykazovala prakticky stejný hybridizační vzor v pericentromerických oblastech všech chromozómů *N. furzeri* a *N. kadleci*, pouze v případě *N. furzeri* populace 3 je na jednom submetacentrickém chromozómovém páru u obou pohlaví signál přerušen nebarvenou oblastí (obr. 16B). Nfu-SatB se vyskytoval na rozdíl od Nfu-SatA v pericentromerické oblasti všech chromozómů *N. orthonotus*. Navíc jsem tuto repetici odhalila i u obou populací *N. pienaari* (u populace 2 je počet detekovaných klastrů ve srovnání s populací 1 výrazně nižší) a překvapivě i u dvou chromozómových párů *N. eggersi* (aniž bych ji detekovala u *N. krysanovi*, *N. rachovii* a *N. ocellatus*, kteří jsou příbuznější k *N. furzeri*, *N. kadleci* a *N. orthonotus*; van der Werwe et al. 2021). Je pozoruhodné, že u *N. pienaari* tvořil Nfu-SatB klastry na více chromozómech (přibližně polovina; obr. 16I) než u populace 2 (pouze 3 páry; obr. 16J), zároveň se u jedinců populace 1 vyskytoval kromě centromerických i v telomerických oblastech (obr. 16).



Obr. 16: Mitotické metafáze vybraných druhů halančků po aplikaci metody FISH se sondou pro satelit Nfu-SatB. Šipky u *N. furzeri* populace 3 (B) ukazují na chromozómový pár s centromerickou mezerou. Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítko = 10 μm.

Nfu-SatC

Distribuce této satelitní DNA se výrazně lišila ve srovnání s *Nfu-SatA* a *Nfu-SatB*. Jednak jsem ji detekovala u všech zkoumaných druhů napříč rodem *Nothobranchius*, včetně „outgroup“ druhu *F. thierrii*, a jednak se počet a distribuce klastrů mezidruhově značně lišila. Satelit byl buď rozptýlen po všech/většině chromozómů v karyotypu, kde vytvářel menší klastry, nebo vytvářel menší počet větších klastrů, případně jsem se u některých druhů setkala s oběma situacemi.

U *N. brienii* byl *Nfu-SatC* detekován téměř u poloviny chromozómů a odhalila jsem specifickou akumulaci na neo-Y chromozómu (u tohoto druhu je znám opět mnohočetný systém pohlavních chromozómů typu X_1X_2Y ; Krysanov a Demidova 2018) (obr. 17A).

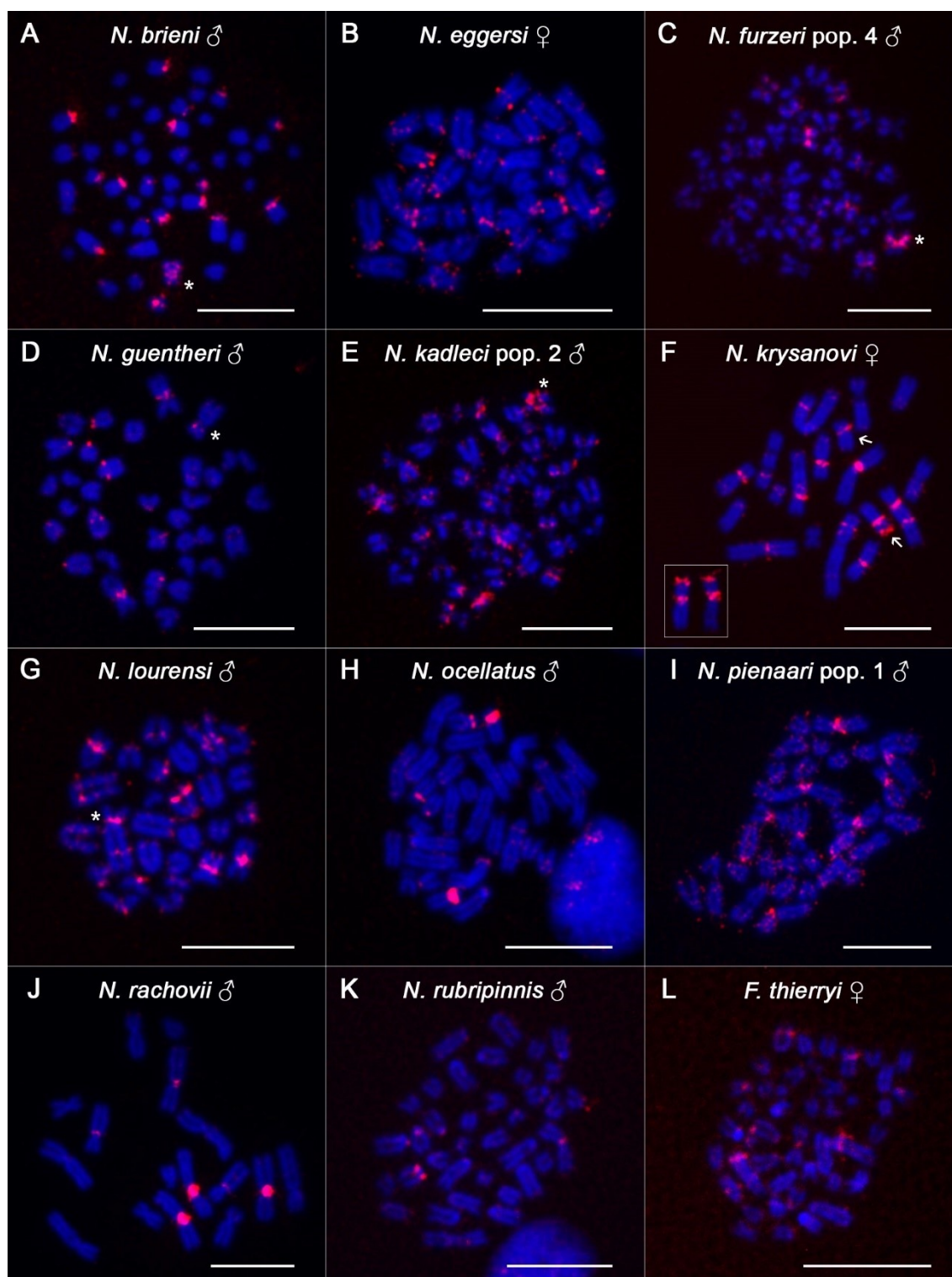
N. eggersi vykazoval klastry *Nfu-SatC* rozptýleně téměř na všech chromozómech, stejně tak *N. guentheri*, *lourensi*, a *rubripinnis* (obr. 17B, D, G, K).

U druhů *N. furzeri* a *kadleci* se *Nfu-SatC* vyskytoval rozptýleně u nadpoloviční většiny chromozómů a v populacích obou druhů vytvářel i specifickou, různě rozsáhlou akumulaci na chromozómu Y (obr. 17C, E a také Tab. 5).

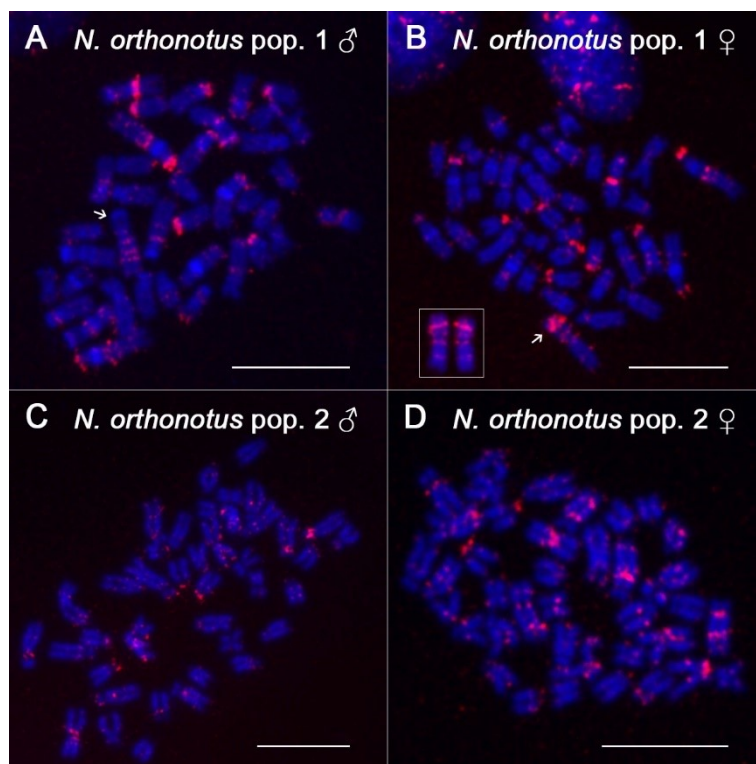
U *N. pienaari* byl *Nfu-SatC* detekován u méně než poloviny chromozómů v pericentromerických oblastech (obr. 17I). Naopak tomu bylo u *N. krysanovi*, kde jsem tuto repetici odhalila u více než poloviny chromozómů v pericentromerických oblastech, a navíc jsem pozorovala i polymorfismus u jednoho páru submetacentrických chromozómů, kde se vyskytovala specifická akumulace na jednom raménku, buď u jednoho nebo obou homologů (obr. 17F). *Nfu-SatC* byl detekován také u *N. rachovii*, kde tvořil různě rozsáhlé klastry v centromerách tří chromozómových párů (obr. 17J).

U *N. ocellatus* byl satelit mapován u čtyř párů chromozómů (obr. 17H) a u *F. thierrii* tvořil různě velké klastry rozptýlené napříč karyotypem (obr. 17L).

U obou populací *N. orthonotus* *Nfu-SatC* vytvářel různě velké klastry přibližně u poloviny chromozómů. Obě populace se ale od sebe lišily hybridizačním vzorem na největším páru metacentrických chromozómů. U populace 1 se vyskytoval polymorfismus v tom smyslu, že jeden, oba nebo žádný homolog nesl specifickou akumulaci *Nfu-SatC* na jednom rameni. Konkrétně u jednoho samce jsem tuto akumulaci nepozorovala na žádném homologu, u dvou samců a dvou samic na jednom z homologů a u jedné samice vykazovaly akumulaci oba homology (obr. 18A, B). U populace 2 zmíněný metacentrický pár nevykazoval žádnou specifickou akumulaci ani polymorfismus (obr. 18C, D).



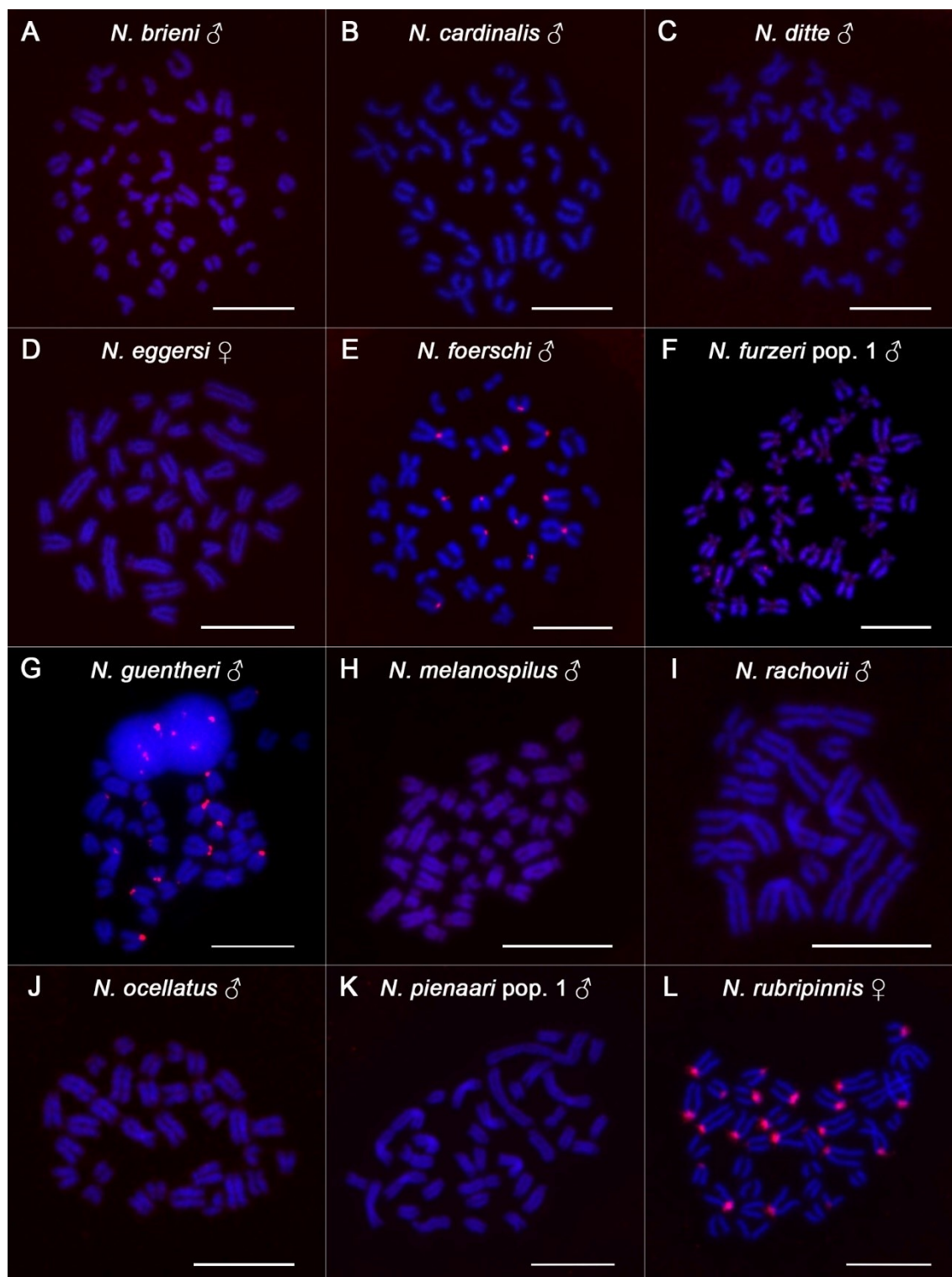
Obr. 17: Mitotické metafáze vybraných druhů halančků po aplikaci metody FISH se sondou pro satelit Nfu-SatC. Hvězdičky poukazují na pohlavní chromozómy Y (A, C, D, E, G); u *N. krysanovi* (F) ukazují šipky spolu s rámečkem polymorfní chromozómové páry ve smyslu přítomnosti/absence signálu. Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítko = 10 μ m.



Obr. 18: Mitotické metafáze *N. orthonotus* po aplikaci metody FISH se sondou pro satelit Nfu-SatC. *N. orthonotus* populace 1 (A, B) a populace 2 (C, D); šipky ukazují chromozómy se specifickým vzorem (A, B); rámeček zobrazuje polymorfní chromozómy se specifickým vzorem (B). Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítka = 10 μ m

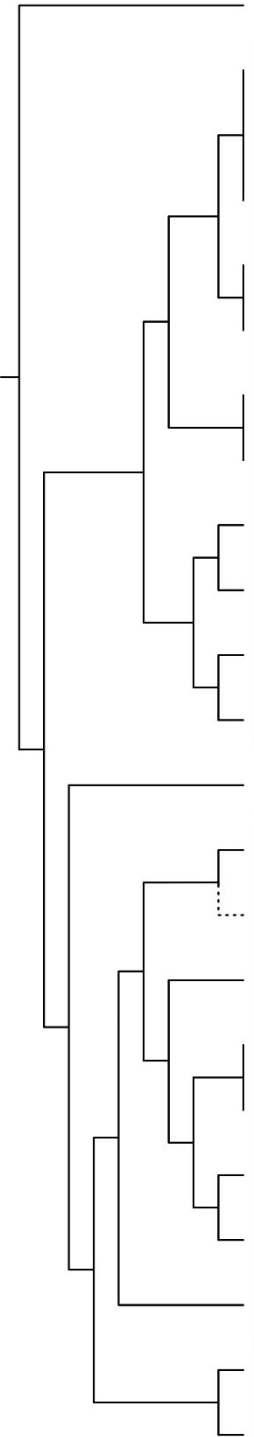
Nru-Sat1

Poslední repetitivní DNA specifická pro genomy halančíků, kterou jsem mapovala metodou FISH ve své práci, byl minisatelit Nru-Sat1 identifikovaný v genomu *N. rubripinnis*. Mapování na chromozomy *N. rubripinnis* odhalilo pericentromerické klastry téměř na všech chromozómech s výjimkou šesti párů (obr. 19L). Dále tento satelit tvořil akumulace v centromerách šesti chromozómových páru u *N. foerschi* (obr. 19E) a u téměř poloviny chromozómů *N. guentheri* (obr. 19G). U zbylých deseti druhů, u nichž jsem Nru-Sat1 mapovala (Tab. 5), jsem neodhalila žádné specifické hybridizační signály (obr. 19).



Obr. 19: Mitotické metafáze vybraných druhů halančíků po aplikaci metody FISH se sondou pro minisatelit Nru-Sat1. Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Měřítko = 10 μ m.

Tab. 5: fylogenetický strom studovaných afrických anuálních halančíků spolu s tabulkou shrnující získané výsledky.



	<i>2n</i>	Karyotyp (m-sm-st/a)	5S	18S	Nfu- SatA	Nfu- SatB	Nfu- SatC	Nru- Sat1
<i>F. thierryi</i>	♂43 ♀44	♂1-1-41 ♀0-2-42	x	x	0	0	2	x
<i>N. furzeri</i> 1	38	♂6-13-19 ♀6-14-18	2	♂3/4 ♀4/5	3	3	2 (Y)	0
<i>N. furzeri</i> 3	38	♂6-13-19 ♀6-14-18	2	3/4	3	3	2 (Y)	0
<i>N. furzeri</i> 4	38	♂6-13-19 ♀6-14-18	2	♂3 ♀4	3	3	2 (Y)	0
<i>N. kadleci</i> 1	38	♂4-15-19 ♀4-16-18	2	♂3 ♀4	3	3	2 (Y)	0
<i>N. kadleci</i> 2	38	♂4-15-19 ♀4-16-18	2	♂3 ♀4	3	3	2 (Y)	0
<i>N. orthonotus</i> 1	38	6-4-28	2	♂6 ♀4	2	3	2	0
<i>N. orthonotus</i> 2	38	6-4-28	2	6	2	3	2	0
<i>N. pienaari</i> 1	34	6-2-26	2 var1 4 var2	♂4 ♀6	0	2	2	0
<i>N. pienaari</i> 2	34	6-2-26	2 var1 4 var2	♂4 ♀4/5	0	1	2	0
<i>N. krysanovi</i>	18	8-8-2	4	3/4	0	0	2	0
<i>N. rachovii</i>	16	8-6-2	2 var1 4 var2	1/2	0	0	2	0
<i>N. ocellatus</i>	30	0-2-28	x	x	0	0	1	0
<i>N. eggersi</i>	36	2-2-32	x	x	0	1	2	0
<i>N. lourensi</i>	♂27	♂7-0-20	4 var3	5	x	x	2	x
<i>N. foerschi</i>	34	10-2-22	x	x	0	x	x	2
<i>N. guentheri</i> 1	♂35 ♀36	2-1-32 2-0-34	2	♀8 ♂7	0	0	1	2
<i>N. guentheri</i> 2	♂35	♂2-2-31	2	3	x	x	x	x
<i>N. cardinalis</i>	36	2-0-34	x	x	x	x	x	0
<i>N. rubripinnis</i>	36	2-0-34	x	x	0	0	1	2
<i>N. melanospilus</i>	38	4-8-26	x	x	0	x	x	0
<i>N. brieri</i>	♂49	♂1-0-48	x	x	x	x	2 (Y)	0
<i>N. ditte</i>	♂39	♂13-12-14	x	x	x	x	x	0

■ Jižní klad
■ klad *Ocellatus*
■ Pobřežní klad
■ klad Kalahari

x = metodu jsem u daného druhu nepoužila

značení u satelitní FISH: 0 = žádný signál, 1 = méně než polovina chromozómů, 2 = více než polovina chromozómů, 3 = všechny chromozómy, Y = signál se vyskytuje specificky na chromozómu Y

5 Diskuze

5.1 Konvenční analýza karyotypu

Z více než 90 dosud popsaných druhů halančíků rodu *Nothobranchius* (Fricke et al. 2021) byly karyotypy popsány u celkem 65 druhů (Krysanov & Demidova 2018) a jednoho dalšího taxonu, který zatím není popsán jako oficiální druh (*N. sp.* Kasenga; Krysanov et al. 2016). Moje práce zahrnovala pouze druhy s již popsanými karyotypy a až na jediný druh (*N. ocellatus*), kde jsem napočítala 32 chromozómů (vs. $2n = 30$ u dvou jedinců popsaných v práci Krysanov & Demidova 2018) se mnou zjištěné $2n$ od dřívějších popisů nelišilo, a to ani v případě jedinců z různých populací. Oproti práci Krysanov & Demidova (2018) se ale mírně lišila má interpretace počtu chromozómů v jednotlivých morfologických kategoriích, která u druhů *N. furzeri* a *N. kadleci* byla spojena rovněž s identifikovanou přítomností pohlavních chromozómů (viz dále). U tří populací *N. furzeri* a dvou populací *N. kadleci* mnou prezentované karyotypy zahrnují obecně více submetacentrických chromozómů na úkor metacentrických. Struktura karyotypů u dalších studovaných druhů z Jižního kladu se shodovala s popisy v práci Krysanov & Demidova (2018), pouze u *N. orthonotus* byl jeden chromozómový pár přesunut ze skupiny metacentrických do skupiny submetacentrických chromozómů. Podobně drobné rozdíly v popisu karyotypu (obvykle na úrovni odlišné morfologie jednoho páru chromozómů oproti původnímu popisu) jsem zaznamenala i u dalších druhů jako u *N. eggersi*, *N. guentheri* a *F. thierryi*. U těchto dalších druhů jsem ale analyzovala jen omezený počet jedinců, neboť zde bylo cílem primárně zjistit hybridizační vzory vybraných repetitivních sekvencí (viz dále).

Možným důvodem pozorovaných rozdílů v popisech karyotypů by mohly být mezipopulační karyotypové rozdíly, nicméně konkrétně v případě *N. furzeri* a *N. kadleci* se, vzhledem ke shodným karyotypům napříč mnou analyzovanými populacemi, zdá pravděpodobnější, že rozdíl je způsoben jiným subjektivním hodnocením morfologie chromozómů a také jinou kvalitou rozprostření chromozómů. Když jsem srovnala metafáze na preparátech vyhotovených z regenerátů ploutví s metafázemi z přímé preparace ledvin (ze kterých připravovali v základu podobným protokolem chromozómy i Krysanov & Demidova 2018), chromozómy z regenerátů ploutví často dosahovaly lepšího rozprostření po preparátu a podobný rozdíl byl pozorován i u různých dalších druhů ryb (A. Sember, osobní sdělení). Proto si dovoluji tvrdit, že metafáze získané z regenerátů ploutví umožnily přesnější identifikaci morfologických kategorií chromozómů. Přítomnost různých karyotypových forem u různých

populací je naopak pravděpodobná v případě *N. ocellatus*, kde jsem zaznamenala odlišný počet chromozómů oproti práci Krysanov & Demidova (2018).

Metodou C-pruhování jsem odhalila masivní centromerické bloky konstitutivního heterochromatinu u všech chromozómů v karyotypech blízce příbuzných druhů *N. furzeri*, *N. kadleci* a *N. orthonotus*, shodně napříč populacemi. V případě *N. furzeri* se jedná o potvrzení předchozího pozorování, které bylo provedeno u inbrední linie GRZ (Reichwald et al. 2009), která je rovněž zahrnuta v mé práci (populace 4). Je pozoruhodné, že směrem k evolučně mladším druhům v Jižním kladu se postupně obsah (nejen) centromerického heterochromatinu snižuje a jsou zde rovněž druhy (zejména *N. krysanovi* a *N. rachovii*), u kterých došlo k výrazné redukci $2n$, evidentně formou chromozómových fúzí (Krysanov & Demidova 2018, tato práce). Jelikož přítomnost vysokého množství heterochromatinu může podporovat zvýšenou četnost přestaveb (King 1993, Peng & Karpen 2008), přichází v úvahu, že přestavby skutečně probíhaly alespoň z části za přispění bloků heterochromatinu a během těchto procesů mohl být heterochromatin do jisté míry eliminován. U dvou mnou analyzovaných druhů s mnohočetnými pohlavními chromozómy – *N. lourensi* a *N. guentheri* – některé bloky heterochromatinu, které se nacházejí mimo centromerickou oblast na neo-Y chromozómu, pravděpodobně ukazují na místa předchozích chromozómových přestaveb. Konkrétně zde velmi pravděpodobně došlo k fúzím chromozómů či chromozómových fragmentů. V případě neo-Y chromozómu *N. lourensi* se mohlo jednat o fúze více než dvou chromozómů, což by vysvětlovalo i neobvyklou délku tohoto pohlavního chromozómu, neboť ani rozsah bloků konstitutivního heterochromatinu, ani hybridizační vzory repetitivních sekvencí analyzovaných u tohoto druhu v mé práci nenaznačují, že by se velikost chromozómu zvětšila amplifikací repetitivní DNA, jako tomu je u některých jiných rybích taxonů (např. Nanda et al. 2014, Scharl et al. 2016, Yano et al. 2017). Případy neo-Y chromozómů vzniklých fúzí tří nebo i více chromozómů jsou známy u jiných živočichů (da Silva et al. 2019c, Sigeman et al. 2019). Interkalární bloky konstitutivního heterochromatinu podobné těm nalezeným na chromozómech neo-Y jsem pozorovala i na jiných nápadně velkých dvouramenných chromozómech jako např. u druhů *N. krysanovi* a *N. pienaari*.

5.2 Distribuce telomerických repetit

Sonda s motivem pro obratlovčí telomerickou repetici byla mapována u zástupců Jižního kladu a dále u dvou druhů s mnohočetnými pohlavními chromozómy, konkrétně

u *N. guentheri* a *N. lourensi*. Všechny druhy Jižního kladu vykazovaly standardní hybridizační vzor, tj. telomerické signály byly lokalizovány na koncích všech chromozómů. Absence nadbytečných akumulací telomerických repetitiv v rámci chromozómů byla zejména pozoruhodná u druhů s výrazně sníženým $2n$ a nápadně velkými metacentrickými chromozómy v karyotypu (*N. krysanovi* a *N. rachovii*) a také u druhů *N. guentheri* a *N. lourensi*, kde by se daly očekávat signály ITS v předpokládaných fúzních místech na chromozómech neo-Y. Nepřítomnost ITS může být vysvětlena buď tím, že byly telomerické sekvence odstraněny během mechanismu fúze, nebo se ve fúzních místech zachovaly, ale postupnými mutacemi se identita těchto sekvencí vytratila. Další možností je, že se části telomerické sekvence ve fúzních místech stále nacházejí, nicméně počet opakování hexamerního motivu je natolik nízký, že je hybridizační signál pod detekčním limitem klasické metody FISH (Slijepcevic 1998, Ocalewicz 2013). Vzhledem k evolučnímu mládí linie halančíků (Dorn et al. 2014, van der Merwe et al. 2021) je více pravděpodobné, že k erozi telomerických sekvencí došlo již během procesu fúze. Z dosavadních dat se tedy zdá, že případné fúze chromozómů probíhaly napříč druhy halančíků podobným mechanismem, který zahrnoval (či dokonce přímo vyplynul ze) ztráty telomerických sekvencí. U mnohočetných pohlavních chromozómů byla dosud absence ITSs dokumentována u poloviny případů mnohočetných pohlavních chromozómů analyzovaných touto metodou (Sember et al. 2021). U samců *N. guentheri* telomerická FISH pomohla potvrdit systém X_1X_2Y v profázi I meiotického dělení díky tomu, že telomerické signály vymezily tři pohlavní chromozómy párující v trivalentu.

5.3 Distribuce a evoluční dynamika klastrů rDNA

Metoda FISH s využitím sond pro 5S a 18S rDNA byla aplikována u druhů Jižního kladu a dvou druhů s mnohočetnými pohlavními chromozómy (*N. guentheri*, *N. lourensi*).

Základní varianta, 5S rDNA var.1, vykazovala napříč těmito vybranými druhy značnou stabilitu v počtu signálů. Jedná se vždy o jeden pár submetacentrických (*N. furzeri*, *N. kadleci*, *N. orthonotus*, *N. rachovii*) nebo subtelocentrických/akrocentrických (*N. guentheri*, *N. krysanovi*, *N. pienaari*) chromozómů. U 5S rDNA byly objeveny další varianty, které se od té základní liší délkou i sekvencí nepřekládaného mezerníku. Evoluce 5S rDNA tak u halančíků odpovídá modelu „birth-and-death evolution“, kdy docházelo k duplikacím původní sekvence a duplikát se následně sekvenčně odlišil od původní varianty (Pinhal et al. 2011). Sekvenční varianty 5S rDNA by mohly mít tkáňově-specifickou funkci, jak bylo popsáno u jiných ryb

(Martins a Wasko 2004, Merlo et al. 2013, Rebordinos et al. 2013, Barros et al. 2017, Locati et al. 2017), ale to bude muset u halančíků potvrdit nebo vyvrátit další výzkum. 5S var. 2 byla detekována u *N. krysanovi*, *pienaari* a *rachovii* a to vždy na dvou chromozómových párech; na jednom páru v terminální části chromozómů a na druhém páru intersticiálně. Lokace této varianty se tedy nepřekrývala se standardní variantou (var. 1). Je pozoruhodné, že u *N. orthonotus*, ač dřívější PCR analýza neukázala přítomnost jiného než standardního amplifikačního produktu odpovídajícímu 5S rDNA var.1 (A. Sember, osobní sdělení), kontrolní experiment FISH u tohoto druhu ukázal, že i 5S rDNA var.2 tvoří nějaké specifické signály, nicméně z časových důvodů jsem se již této problematice ve své práci dále nevěnovala. Poslední variantou studovanou v této práci byla 5S rDNA var. 3, kterou jsem identifikovala u *N. lourensi* a vyskytovala se na dvou akrocentrických chromozómových párech u tohoto druhu. Soudě podle výsledků PCR se jednalo o jedinou variantu 5S rDNA u *N. lourensi*. Tato skutečnost spolu s parametry nalezené sekvence (zachovalá kódující oblast pro gen 5S rRNA) by naznačovaly, že by se mohlo jednat o funkční variantu 5S rDNA. V případě 5S rDNA varianty 2 je rovněž velmi pravděpodobné, že se jedná o funkční variantu (s ohledem na parametry sekvence). Ovšem v případě obou variant to bude muset potvrdit navazující výzkum založený např. na analýze struktury RNA, která by vznikla přepisem kódující oblasti těchto variant (viz např. Symonová et al. 2017).

Zatímco různé sekvenční varianty 5S rDNA u studovaných halančíků měly spíše stabilní počty klastrů napříč populacemi i druhy, sonda pro 18S rDNA, která by měla identifikovat polohu hlavního klastru 45S rDNA, vykazovala různé a někdy značně polymorfní počty signálů, jak na autozómech, tak na pohlavních chromozómech.

Hlavní klastr rDNA se obecně vyskytoval na jednom, dvou, ale i třech chromozómových párech napříč zkoumanými druhy. Výjimku pak tvořil druh *N. guentheri* populace 1, u kterého byl lokus 18S rDNA detekován u samce na sedmi a u samice na osmi chromozómech. Oproti tomu u samce *N. guentheri* z druhé populace se klastry 18S rDNA vyskytovaly pouze na pohlavních chromozómech X_1X_2Y . Jedná se tudíž o případ mezipopulační variability v distribuci rDNA.

Vnitropopulační polymorfismus 45S rDNA se u halančíků vyznačoval jak v intenzitě daného signálu (z důvodu nerovnoměrného crossing overu, běžně pozorovaného napříč organizmy; viz literární přehled, podkapitola 2.2.1.1), tak v jeho přítomnosti či absenci na homolozích daných párů. Např. u druhů *N. rachovii* a *N. krysanovi* (nezávisle na pohlaví) byl detekován signál 18S rDNA buď na jednom nebo obou homologních chromozómech v rámci

jedné populace, a to jak mezi jedinci (vnitropopulační polymorfismus), tak v jednom případě (samička *N. rachovii*) i mezi buňkami (regenerovaných ploutví) v rámci jednoho jedince. Podobný případ jako u samičky *N. rachovii* byl již u ryb pozorován, konkrétně např. u piskoře *Misgurnus fossilis* (Spóz et al. 2017). Možným vysvětlením by mohlo být, že samička je genetickou mozaikou buněk, kdy se dvě linie liší mj. právě polymorfizmem v přítomnosti/absenci rDNA na jednom z homologů nejmenšího chromozómového páru. Další pozoruhodný polymorfismus 18S rDNA byl detekován u samice *N. furzeri* z populace 1, u které se krom již zmíněných signálů objevoval signál i na jednom metacentrickém chromozómu, morfologicky podobnému metacentrickému páru chromozómů, na kterém jsem stabilně detekovala signál 18S rDNA napříč jedinci *N. kadleci*. Je možné, že jsem tímto pozorováním zachytila dynamiku rDNA na mezidruhově úrovni, vedoucí k postupnému zániku klastrů rDNA na konkrétním chromozómovém páru, a naopak k jejich amplifikaci na jiném chromozómovém páru, což by naznačovalo, že hlavní klasty rDNA není úplně vhodným markerem pro studium dynamiky karyotypů u halančíků, neboť nemusí vždy ukazovat homeologní chromozómy (Milhomem et al. 2013).

U *N. furzeri* a *N. kadleci* byl vedle polymorfismu rDNA asociovaného s autozomy pozorován v rámci daných jedinců prokazatelně i polymorfismus vázaný na pohlavní chromozómy (viz kapitola 5.5).

Akumulace 18S rDNA byla většinou detekována na koncích chromozómů, zatímco 5S rDNA se ve většině případů vyskytovala v intersticiálních pozicích na chromozómech. Přítomnost 18S rDNA na koncích chromozómů může podporovat ektopickou rekombinaci, což může mít za následek různé chromozómové přestavby a také disperzi rDNA na jiné chromozómy (Cazaux et al. 2011, Li et al. 2017).

U některých druhů ryb mohou být klastry 45S a 5S rDNA pozorovány na stejném páru chromozómů, jsou tedy syntenní (např. Bueno et al. 2014, Sember et al. 2015, Traldi et al. 2016). Toto uspořádání jsem pozorovala také u některých jedinců halančíků v rámci druhů *N. kryanovi* a *N. pienaar* (jedna samice z populace 1). Dále jsem těsně přiléhající až částečně se překrývající klastry 5S (var. 1) a 18S rDNA odhalila u všech jedinců druhu *N. guentheri*. V tomto případě se zároveň jednalo o klastry vázané na pohlavní chromozómy. U samců *N. guentheri* byla tato kolokalizace pozorována v předpokládaném fúzním místě (nebo v jeho bezprostřední blízkosti) na neo-Y chromozómu, když vezmeme v potaz přítomnost stejné kolokalizace v terminální části jednoho z X chromozómů. Moje data neumožňují přesnější určení, zda se jedná o chromozóm X₁ nebo X₂, ale mapování sond rDNA na meiotické

chromozómy v profázi I potvrdilo, že daný chromozóm patří do systému X_1X_2Y . U samic byl klastr přítomen na obou homolozích tohoto chromozómu X. U *N. lourensi* byl pozorován lokus 18S rDNA rovněž v jednom z předpokládaných fúzních míst na neo-Y chromozómu. S velkou opatrností bychom shodnou přítomnost 18S rDNA v podobných pozicích na neo-Y mohli interpretovat jako nepřímý důkaz pro možnou homeologii mezi X_1X_2Y systémy obou těchto druhů, ale vzhledem k často výrazné dynamice rDNA napříč organizmy, včetně ryb (Milhomem et al. 2013) i mnou studovaných halančíků, toto tvrzení bude vyžadovat ověření, např. formou malovacích celochromozómových sond. Podobným způsobem bude možné ověřit potenciální homologii mnohočetných pohlavních chromozómů se systémem XY u druhů *N. furzeri* a *N. kadleci*, kde jsem také odhalila přítomnost hlavního klastru rDNA. Na druhou stranu, další hybridizační vzory (viz níže) naznačují jistou variabilitu v rámci evoluce dosud známých pohlavních chromozómů halančíků.

Moje pozorování přináší další dokumentaci případů, kdy se klastry rDNA zúčastnily (s velkou pravděpodobností) procesu fúze chromozómů. Vedle případů systému X_1X_2Y u *N. guentheri* a *N. lourensi* je možné, že takové fúze proběhly i na některých autozómech jiných druhů, např. na chromozómovém páru č. 7 u *N. krysanovi*. Podobných případů asociace fúzí s výskytem klastru rDNA u ryb přibývá (Sember et al. 2015, 2020a, Barros et al. 2017, Supiwong et al. 2019), včetně případů s mnohočetnými pohlavními chromozómy (Cioffi & Bertollo 2010, Sassi et al. 2020). Častější zapojení klastrů rDNA v procesu fúze (nebo eventuelně jiných chromozómových přestaveb) by mohlo být vysvětleno vysokou intenzitou transkripce těchto tandemových repetitiv (Schöfer & Weipoltshammer 2018), kdy dlouhé úseky rozvolněného euchromatinu mohou být velmi náchylné ke zlomům a následným přestavbám (Berthelot et al. 2015, Warmerdam & Wolthuis 2019).

5.4 Evoluce vybraných repetitivních sekvencí specifických pro genomy halančíků

Ve své práci jsem studovala distribuci čtyř vybraných repetitivních sekvencí (satelitní nebo minisatelitní DNA), které byly mými kolegy identifikovány v genomech *N. furzeri* a *N. rubripinnis* pomocí programu RepeatExplorer. Jednalo se o tři repete identifikované v genomu *N. furzeri* (Nfu-SatA, Nfu-SatB, Nfu-SatC) a jednu z genomu *N. rubripinnis* (Nru-Sat1). Tři ze čtyř vybraných repetitiv byly detekovány specificky v centromerických oblastech chromozómů některých druhů (Nfu-SatA, Nfu-SatB, Nru-Sat1). Tyto satelity byly omezeny

vždy na úzký soubor blízce příbuzných druhů, ale nemohu zcela vyloučit, že se v jiných genomech vyskytují v množství nebo uspořádání, které nemůže metoda FISH detekovat (Ruiz-Ruano et al. 2016, Crepaldi & Parise-Maltempo 2020). Pouze Nfu-SatC jsem na úrovni chromozómového mapování identifikovala u všech druhů a množství klastrů i distribuce se mezidruhově a někdy i mezi populacemi (především v rámci *N. orthonotus* a *N. pienaari*) mírně nebo výrazně lišily. Polymorfismus ve výskytu Nfu-SatC byl patrný i mezi jedinci, např. u *N. krysanovi* byl detekován vzor dvou separátních bloků na submetacentrickém chromozómovém páru, a to buď na jednom nebo na obou homologních chromozómech. Dále byla u této satelitní DNA pozorována specifická nápadná akumulace na neo-Y chromozómu *N. brienii*, podobně jako jsem ji pozorovala na chromozómu Y u druhů *N. furzeri* a *N. kadleci*. Vzhledem k tomu, že *N. brienii* patří do jiného kladu (klad Kalahari) než *N. furzeri* a *N. kadleci* a také, že některé z dalších studovaných druhů s mnohočetnými pohlavními chromozómy, u kterých podobná akumulace chybí (*N. guentheri* a *N. lourensi*), spadají do Pobřežního kladu (který je ve fylogenetickém stromu vmezen mezi Jižní klad a klad Kalahari (van der Merwe et al. 2021)), je velmi pravděpodobné, že specifická akumulace Nfu-SatC na pohlavním chromozómu neo-Y u *N. brienii* byla nezávislá evoluční událost. Je možné, že díky svým specifickým vlastnostem (přítomnost v genomech napříč rodem a variabilní distribuce nevázaná na konkrétní oblasti chromozomu) má Nfu-SatC zvýšenou pravděpodobnost opakovaně kolonizovat oblasti suprese rekombinace na pohlavních chromozómech halančíků.

Polymorfismus mezi populacemi vykazoval také Nfu-SatA, a to u *N. orthonotus*. Lišil se počet chromozómů, v jehož centromerách tento satelit netvoří detekovatelné akumulace. V populaci 1 chyběl NfuSatA až u šesti chromozómů, kdežto u populace 2 nebyl detekován jen u jednoho páru. Zároveň byl u populace 1 odhalen vnitropopulační polymorfismus nezávislý na pohlaví, kdy se počet chromozómů bez signálu pohyboval mezi čtyřmi až šesti. Další polymorfizmy byly pozorovány i u Nfu-SatB, kdy u *N. furzeri* populace 3 byly u jednoho chromozómového páru pozorovány v centromerické oblasti mezery bez akumulace. V tomto případě by se mohlo jednat o oblast, kde se nachází nějaká jiná specifická repetitivní DNA, která se specificky naamplifikovala pouze v centromerách jednoho chromozómového páru. Mezipopulační rozdíl v distribuci satelitu Nfu-SatB byl dále pozorován také u *N. pienaari*, kdy u populace 1 byl tento satelit viditelný přibližně u poloviny chromozómů, ale u populace 2 pouze u třech chromozómových párů.

Centromerické satelity (Nfu-SatA, Nfu-SatB, Nru-Sat1) se vyskytovaly většinou jen u některých příbuzných druhů. To může pravděpodobně poukazovat na rychlý obrat repetitivní

DNA v centromerách halančků, tzn. centromerický „turnover“. U druhu *N. foerschi* a *N. guentheri* je vidět, že některé chromozómy již ztratily dominantní satelitní DNA Nru-Sat1 v centromerách. Je zřejmé, že obrat neboli „turnover“ centromerických satelitních DNA u halančků je poměrně rychlý a může mít vliv na reprodukční izolaci. Důvodem by mohla být mezidruhovná nekompatibilita proteinů, které se vážou na centromerické satDNA, což by mohlo vést k nekompatibilitě dělicího aparátu u případných mezidruhových hybridů (Bracewell et al. 2019, Robledillo et al. 2020). To, na druhou stranu, zároveň naznačuje, že jsou v tomto ohledu značně kompatibilní genomy *N. furzeri* a *N. kadleci*, nicméně hybridní zóna mezi těmito druhy zatím nebyla v přírodě objevena (M. Reichard, osobní sdělení). Zajímavý je ojedinělý výskyt několika detekovatelných akumulací Nfu-SatB u *N. eggersi*, přestože další druhy, které jsou evolučně blíže Jižnímu kladu, detekovatelné akumulace tohoto satelitu neukázaly. Tato situace by mohla být v souladu s tzv. „library hypothesis“, která – jak jsem již zmínila v kapitole 2.1.1.2 – poukazuje na možnost sdílené „knihovny“ sekvencí satDNA mezi příbuznými druhy, kdy v průběhu evoluce různé motivy expandují nebo redukují počet kopií (Fry & Salser 1977, Thakur et al. 2021) a je tedy možné, že u některých druhů nízký počet kopií nebo způsob jejich uspořádání neumožní daný motiv detekovat metodou FISH (Ruiz-Ruano et al. 2016, Crepaldi & Parise-Maltempi 2020).

Nfu-SatC byl jako jediný satelit detekován u všech studovaných druhů a zdá se, že je specifický pro celý rod *Notobranchius*. Případ podobně rozšířené repetice v rámci ryb je znám např. u trnobříkých ryb (dos Santos et al. 2021). U druhů *N. orthonotus* a *N. krysanovi* vykazoval Nfu-SatC zajímavé vzory a zároveň polymorfizmy. Vyskytuje se zde specifická akumulace na jednom rameni metacentrického (*N. orthonotus*) a submetacentrického (*N. krysanovi*) chromozómu. U *N. orthonotus* byl nezávisle na pohlaví pozorován buď jeden homolog s akumulací a druhý ji neměl nebo tuto akumulaci neměl ani jeden z homologických chromozómů. U *N. krysanovi* je situace opačná, tj. buď tuto akumulaci vykazoval jeden homologický chromozóm nebo ji sdílely oba. Jelikož segregace tohoto polymorfizmu nekoreluje s pohlavím jedince, nejedná se s největší pravděpodobností o pohlavní chromozómy. Nicméně je pozoruhodné, že akumulovaný blok satelitu Nfu-SatC nápadně připomíná akumulaci, kterou jsem pozorovala na chromozómu Y u druhů *N. furzeri* a *N. kadleci*, kteří jsou blízké příbuzní *N. orthonotus* a *N. krysanovi*. Jako jedno z možných vysvětlení se nabízí, že by se mohlo jednat o pozůstatky původního Y chromozómu, který ale u evolučně mladších druhů *N. orthonotus* a *N. krysanovi* již ztratil funkci pro determinaci pohlaví, fúzoval s jiným chromozómem a jeho segregace se nyní řídí standardní autozomální

dědičností. Kopie bez specifické akumulace satelitu Nfu-SatC by mohla analogicky představovat původní chromozóm X fúzovaný na autozóm. Pokud by tato teorie byla pravdivá, znamenalo by to, že u druhu *N. orthonotus* došlo k přechodu na jiný systém pohlavních chromozómů. Samozřejmě nelze ani vyloučit přechod na environmentální determinaci pohlaví (ESD), nicméně je to méně pravděpodobné, jelikož genetická determinace (GSD) umožňuje lépe udržet vhodný poměr pohlaví, a tak jsou v evoluci daleko častější přechody od ESD na GSD (Johnson Pokorná & Kratochvíl 2016). Přechody diferencovaných pohlavních chromozómů zpět na autozomy byly u živočichů již zaznamenány, např. u octomilky nebo gekonů (Vicoso & Bachtrog 2013, Rovatsos et al. 2019). V případě halančíků je ale ještě nutné zmínit, že zmíněný polymorfismus jsem nepozorovala u dvou zbývajících druhů Jižního kladu (*N. pienaari* a *N. rachovii*).

Satelity Nfu-SatA a Nfu-SatB vykazovaly u *N. furzeri* a *N. kadleci* masivní centromerické akumulace, organizace centromer tak nápadně připomíná tzv. metapolycentrickou strukturu, která byla dosud pozorována u několika málo druhů napříč rostlinnou i živočišnou říší, konkrétně u hrachu setého *Pisum sativum* (Neumann et al. 2012), hrachoru setého *Lathyrus sativus* (Vondrak et al. 2019), mravence *Solenopsis invicta* (Huang et al. 2016), a potměníka *Tribolium castaneum* (Gržan et al. 2020). I přes svou dominantní distribuci není možné s jistotou říct, že Nfu-SatA a Nfu-SatB jsou jediné centromerické repetice vyskytující se v centromerách daných druhů halančíků, nicméně je velmi pravděpodobné, že vzhledem ke své abundanci a poloze budou mít tyto dvě repetice důležitou funkci v organizaci a/nebo přímo funkci centromer (např. Melters et al. 2013). Nemusí to ale nutně platit pro obě satelitní DNA (Cerutti et al. 2016). Je každopádně pozoruhodné, že u dvou příbuzných druhů došlo k tak rapidní amplifikaci centromerických repetic (přičemž nezapomínám na blíže příbuzný druh *N. orthonotus*, kde jsou centromerické bloky těchto repetic rovněž výrazné). Naznačovalo by to možný důsledek jevu zvaného centromerický tah neboli „centromeric drive“, při kterém centromerické repetice (obvykle satDNA), pakliže jsou amplifikovány, mohou např. zvyšovat sílu centromery a tím i pravděpodobnost přesunu chromozómu do vajíčka místo do pólové buňky v průběhu meiotického dělení (přehled viz Kursel & Malik 2018).

5.5 Diferenciace pohlavních chromozómů u *N. furzeri* a *N. kadleci*

U druhu *N. furzeri* jsem potvrdila přítomnost pohlavních chromozómů XX/XY, které byly dříve odhaleny u jiných populací tohoto druhu a také u inbrední linie GRZ, kterou jsem rovněž studovala, pod označením populace 4 (Reichwald et al. 2015, Willemsen et al. 2020). Moje práce zároveň odhalila stejný systém pohlavních chromozómů u sesterského druhu *N. kadleci*. Je nutno zmínit, že pohlavní chromozómy by nebylo možné jednoznačně identifikovat, pakliže by nebyla použita BAC-FISH se specifickými klony (práce kolegů v týmu, viz výše). Na úrovni základní cytogenetiky je neidentifikovali ani Krysanov & Demidova (2018). Sekvenční analýza preparátů odmytých po BAC-FISH pomohla odhalit různé fáze diferenciace X a Y chromozómů, včetně mezidruhových, mezipopulačních i vnitropopulačních rozdílů. Tab. 4 zobrazuje tuto sekvenční analýzu napříč populacemi a je z ní patrné, že pohlavní chromozómy XY jsou v rámci blízce příbuzných druhů *N. furzeri* a *N. kadleci* s největší pravděpodobností homeologní a u obou druhů ve výsledku, oproti původnímu očekávání, mají heteromorfní charakter (Y je znatelně menší chromozóm než X – je zkrácen o část krátkého raménka). Výjimku tvoří populace 3 u *N. furzeri*, kde chromozóm Y vykazuje různou míru degenerace včetně situace, kdy mají oba pohlavní chromozómy prakticky stejnou morfologii (jsou homomorfní). U *N. furzeri* zároveň mezipopulační rozdíly v diferenciaci pohlavních chromozómů korelují s geografickou distribucí. Zatímco populace 1 a 4, které sdílejí charakteristiky diferenciace XY, pocházejí z oblasti Chefu (Mosambik), *N. furzeri* z populace 3 je z oblasti nacházející se u řeky Limpopo (Mosambik), přičemž tyto dvě lokality jsou od sebe vzdálené okolo 150 km. Mezipopulační polymorfizmy v rozsahu diferenciace na Y chromozómu *N. furzeri* byly objeveny již dříve u dalších populací (např. Reichwald et al. 2015, Willemsen et al. 2020). Moje práce naznačuje možnou vyšší dynamiku diferenciace pohlavních chromozómů XY u populací z oblasti řeky Limpopo.

Akumulace Nfu-SatC na dlouhých raménkách chromozómu Y by mohla teoreticky vymezovat oblast suprese rekombinace, zároveň ale v nižší míře akumuluje tentýž satelit i na chromozómu X. Podobný jev, kdy se specifické repetice akumuluji/amplifikují nejen na Y, ale i na X chromozómu, byl v rámci ryb již pozorován, konkrétně v případě analýzy akumulace transponovatelných elementů u platy skvrnitě *Xiphophorus maculatus* (Chalopin et al. 2015). V případě platy autoři této práce nabízejí pro pozorovaný jev několik vysvětlení, z nichž pro *N. furzeri* a *N. kadleci* by mohly být aplikovatelné tyto dvě: i) pokud nedošlo k úplné supresi rekombinace mezi chromozómy X a Y, části bloků Nfu-SatC by se mohly příležitostně přenést na chromozóm X; ii) k určité akumulaci Nfu-SatC došlo na XY ještě před vytvořením samčí

specifické oblasti na chromozómu Y. V každém případě se zdá, že akumulace Nfu-SatC na chromozómu Y pomáhá rozšiřovat oblast suprese rekombinace (Schemberger et al. 2011, Chalopin et al. 2015, Schartl et al. 2016, Schemberger et al. 2019).

Polymorfismus na pohlavních chromozómech byl sledován také ve smyslu přítomnosti/absence a různé délky klastru 18S rDNA, především na chromozómu Y u samců *N. furzeri* populace 3 a na chromozómech X u téže populace a také u *N. kadleci* populace 2. U jedné samice *N. kadleci* z populace 2 jsem dokonce neodhalila žádný klastr 18S rDNA na chromozómech XX. Podobný případ variability spjatý tentokrát s 5S rDNA na Y chromozómech byl mezipopulačně a ve farmářských chovech popsán u pstruha duhového *Onkorhynchus mykiss* (Phillips et al. 2004, Ocalewicz et al. 2007). Nicméně prokazatelně vnitropopulační polymorfizmy v diferenciaci pohlavního chromozómu Y nebo W jsou, na rozdíl od těch mezipopulačních, relativně vzácné a u ryb byly popsány zatím pouze u jedné populace tilápie *Oreochromis niloticus* (Feron et al. 2021). V práci Feron et al. (2021) jde skutečně o vnitropopulační rozdíl v diferenciaci oblasti zahrnující pravděpodobný ústřední gen pro determinaci pohlaví, zatímco v případě dynamiky rDNA na pohlavních chromozómech XY u *N. furzeri* a *N. kadleci* se jedná o polymorfizmy na krátkých raménkách, přičemž data z BAC-FISH spolu se specifickým vzorem akumulace Nfu-SatC na chromozómu Y ukazují, že oblast suprese rekombinace spolu s ústřední determinantou pohlaví se nachází na dlouhém raménku chromozómu Y. Pro úplnost, další data z naší laboratoře ukazují, že delece na krátkém raménku zahrnovaly i jiné repetitivní DNA než hlavní klastr rDNA (A. Sember, osobní sdělení). Delece části chromozómu Y je jedním z mechanismů, které v pokročilejších fázích diferenciaci pohlavních chromozómů vedou k odlišnostem v morfologii mezi pohlavními chromozómy. Jednou z možností, jak by k takové deleci mohlo dojít, je vnitrochromozómová ektopická rekombinace mezi naakumulovanými repeticemi (Delprat et al. 2009, Li et al. 2017). Delece na Y chromozómech byly pozorovány u karyotypové formy B trahira *Hoplias malabaricus* (Cioffi et al. 2010), koljušky *Gasterosteus aculeatus* (Ross & Peichel 2008) nebo např. u hadaře hadovitého *Ophisurus serpens* (Salvadori et al. 2018)

6 Souhrn

V rámci této práce jsem studovala dynamiku karyotypové diferenciaci a pohlavních chromozomů na úrovni distribuce různých repetitivních sekvencí u afrických anuálních halančíků rodu *Nothobranchius*. Detailně jsem se zaměřila na druhy Jižního kladu, který zahrnuje modelový druh *N. furzeri* a dále jsem zkoumala dva druhy s mnohočetnými pohlavními chromozómy (*N. guentheri*, *N. lourensi*), kde lze na cytogenetické úrovni dobře studovat aspekty evoluce těchto specifických oblastí genomu. Nakonec jsem svoji analýzu rozšířila i na reprezentativní druhy napříč fylogenetickým stromem rodu *Nothobranchius*, kde jsem na omezeném vzorku jedinců zkoumala, jak se liší (mezidruhově a mezipopulačně) distribuce vybraných satelitních a minisatelitních DNA identifikovaných analýzou genomů *N. furzeri* a *N. rubripinis* pomocí programu RepeatExplorer.

U druhů *N. guentheri* a *N. lourensi* jsem objevila bloky heterochromatinu mimo centromerickou oblast na chromozómu neo-Y, tyto bloky by mohly ukazovat na místa, kde došlo k chromozómovým fúzím. V těchto místech, kde pravděpodobně došlo na neo-Y k chromozómovým fúzím, jsem očekávala přítomnost ITS, fluorescenční hybridizace *in situ* s telomerickou sondou ovšem takové akumulace nepotvrdila. Je možné, že během mechanismu fúze došlo k eliminaci telomerické sekvence nebo že se telomerické sekvence v místech fúzí zachovaly, ale postupně se mutacemi vytratila jejich identita. Nicméně halančíci jsou evolučně mladá linie a přikláním se proto k první možnosti, tj. eliminaci telomerických sekvencí během fúze. Další repetitivní DNA, kterou jsem ve své práci analyzovala byly 5S a 18S rDNA. 5S rDNA var. 1 vykazovala u všech studovaných druhů značnou stabilitu co do počtu signálů (jednalo se vždy o klastry vyskytující se na jednom páru chromozomů), nicméně jsem u některých druhů odhalila další sekvenční varianty 5S rDNA. Případnou možnost tkáňové specifity a význam sekvenčních variant bude však nutné objasnit dalším výzkumem. Oproti tomu 18S rDNA byla co do počtu klastrů i jejich umístění na chromozómech, ať už na autozómech či na pohlavních chromozómech, vysoce variabilní. Tato variabilita byla pozorována na různých úrovních (mezidruhová, mezipopulační a dokonce i vnitropopulační). Klastry 18S rDNA jsem detekovala ve většině případů na koncích chromozomů. Tato pozice by mohla podporovat jejich disperzi na další chromozómy pomocí ektopické rekombinace a také různé chromozómové přestavby. U druhů s pohlavními chromozómy jsem detekovala klastr na koncích pohlavních chromozomů (*N. furzeri*, *N. kadlecii*), ale i intersticiálně

(*N. guentheri*, *N. lourensi*). Ve druhém případě je pravděpodobné, že se rDNA podílela na mechanismu fúze, která dala vzniknout mnohočetnému systému X_1X_2Y .

Repetice satDNA byly mapovány na chromozómy vybraných druhů halančíků napříč fylogenetickým stromem pro pokrytí co největší diverzity. Tři ze čtyř vybraných repetit (Nfu-SatA, Nfu-SatB, Nru-Sat1) byly detekovány specificky v centromerických oblastech chromozómů některých druhů a jednalo se vždy o úzký soubor blízce příbuzných druhů, což může poukazovat na centromerický „turnover“, který by mohl potenciálně hrát roli v reprodukční izolaci. Pouze satelit Nfu-SatC jsem detekovala v různé míře u všech studovaných druhů a mohlo by se tak jednat o satelitní repetici společnou pro celý rod *Nothobranchius*. U sesterských druhů *N. furzeri* a *N. kadleci* a dále u vzdáleně příbuzného *N. brienii* jsem odhalila specifickou akumulaci Nfu-SatC na pohlavních chromozómech Y. Tato akumulace by mohla odpovídat oblasti suprese rekombinace. Nfu-SatC tak zřejmě hraje významnou úlohu v diferenciaci pohlavních chromozómů některých halančíků.

Ve své práci jsem využila možnosti integrovat cytogenetické metody s výstupy genomických dat, což se ukázalo jako velice hodnotné a přínosné. Zároveň mě tato práce naučila efektivně pracovat v týmu a umožnila mi vyzkoušet si zahraniční spolupráci. Tato rozsáhlá cytogenetická analýza halančíků opět rozšířila naše obzory ohledně evoluce genomu (na úrovni dynamiky repetitivní DNA) tohoto pozoruhodného rybího rodu a odkryla řadu dalších zajímavých fenoménů, které si určitě zaslouží další výzkum. Zároveň mé analýzy mj. ukázaly, že *N. kadleci* by mohl být vhodným srovnávacím druhem pro výzkum modelového druhu *N. furzeri*, vzhledem k výrazně podobným karyotypovým vlastnostem i podobnou délkou svého životního cyklu.

7 Seznam literatury

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
- Ananiev EV, Chamberlin MA, Klaiber J, Svtashev S. (2005): Microsatellite megatracts in the maize (*Zea mays* L.) genome. *Genome* 48: 1061–1069.
- Arai R. (2011): *Fish Karyotypes: a Check List*. 1st edition. Springer, Tokyo, Japan. 340 pp.
- Auvinet J, Graça P, Dettai A, Amores A, Postlethwait JH, Detrich HW, Ozouf-Costaz C, Coriton O, Higuier D. (2020): Multiple independent chromosomal fusions accompanied the radiation of the Antarctic teleost genus *Trematomus* (Notothenioidei: Nototheniidae). *BMC Evol. Biol.* 20: 39.
- Barby F, Ráb P, Lavoue S, Ezaz T, Bertollo LAC, Kilian A, Maruyama SR, de Oliveira EA, Artoni RF, Santos MH, Jegede OI, Hatanaka T, Tanomtong A, Liehr T. (2018): From chromosomes to genome: insights into the evolutionary relationships and biogeography of Old World knifefishes (Notopteridae; Osteoglossiformes). *Genes* 9: 306.
- Bartáková V, Reichard M, Blažek R, Polačik M, Bryja J. (2015): Terrestrial fishes: rivers are barriers to gene flow in annual fishes from the African savanna. *J. Biogeogr.* 42: 1832–1844.
- Bartáková V, Reichard M, Janko K, Polačik M, Blažek R, Reichwald K, et al. (2013): Strong population genetic structuring in an annual fish, *Nothobranchius furzeri*, suggests multiple savannah refugia in southern Mozambique. *BMC Evol. Biol.* 13: 196.
- Barros AV, Wolski MAV, Nogaroto V, Almeida MC, Moreira-Filho O, Vicari MR. (2017): Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? *Gene* 608: 20–27.
- Bellafronte E, Margarido VP, Moreira-Filho O. (2005): Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces, Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetic analyses. *Genet. Mol. Biol.* 28: 710–716.
- Berthelot C, Muffato M, Abecassis J, Roest Crollius H. (2015): The 3D organization of chromatin explains evolutionary fragile genomic regions. *Cell Rep.* 10: 1913–1924.
- Bertollo LAC, Cioffi MB, Moreira-Filho O. (2015): Direct chromosome preparation from freshwater teleost fishes. In: *Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyan and Teleosts)*. Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF (eds), pp. 21–26, CRC Press, Enfield, Boca Raton, FL.
- Biémont C, Vieira C. (2006): Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443: 521–524.
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RL, Artoni RF, de Almeida MC, Traldi JB, Margarido VP, Moreira-Filho O. (2014): Origin of the X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetica* 142: 119–126.
- Blažek R, Polačik M, Kačer P, Cellierino A, Řežucha R, Methling C, Tomášek O, Syslová K, Terzibasi Tozzini E, Albrecht T, Vrtilek M, Reichard M. (2017): Repeated intra-specific

divergence in lifespan and ageing of African annual fishes along an aridity gradient. *Evolution* 71: 386–402.

Blažek R, Polačik M, Reichard M. (2013): Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo* 4: 24.

Bracewell R, Chatla K, Nalley MJ, Bachtrog D. (2019): Dynamic turnover of centromeres drives karyotype evolution in *Drosophila*. *Elife* 8: 1–47.

Bueno V, Venere PC, Konerat JT, Zawadzki CH, Vicari MR, Margarido VP. (2014): Physica Mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus Lacépède* 1803 (Siluriformes: Loricariidae): evolutionary tendencies in the genus. *Sci. World J.* 2014: 1–8.

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.

Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJ, Britton-Davidian J. (2011): Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol. Biol.* 11: 124.

Cellerino A, Valenzano DR, Reichard M. (2016): From the bush to the bench: the annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. *Biol. Rev.* 91: 511–533.

Cerutti F, Gamba R, Mazzagatti A, Piras FM, Cappelletti E, Belloni E, Nergadze SG, Raimondi E, Giulotto E. (2016): The major horse satellite DNA family is associated with centromere competence. *Mol. Cytogenet.* 9: 1–8.

Cioffi MB, Bertollo LAC. (2010): Initial steps in XY chromosome differentiation in *Hoplias malabaricus* and the origin of an X1X2Y sex chromosome system in this fish group. *Heredity* 105: 554–561.

Cioffi MB, Martins C, Centofante L, Jacobina U, Bertollo LAC. (2009): 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, Molina WF, Artoni RF, Bertollo LAC. (2012): Chromosomes as tools for discovering biodiversity—The case of Erythrinidae fish family. *Rec. Trends Cytogenet. Stud. Methodol. Appl.* 125–146.

Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC. (2010): 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.

Crepaldi C, Parise-Maltempi PP. (2020): Heteromorphic Sex Chromosomes and Their DNA Content in Fish: An Insight through Satellite DNA Accumulation in *Megaleporinus elongatus*. *Cytogenet. Genome Res.* 160: 38–46.

- Cuadrado A, Jouve N.** (2010): Chromosomal detection of simple sequence repeats (SSRs) using nondenaturing FISH (ND-FISH). *Chromosoma* 119: 495–503.
- Cui R, Medeiros T, Willemsen D, Iasi LNM, Collier GE, Graef M, Reichard M, Valenzano DR.** (2019): Relaxed Selection Limits Lifespan by Increasing Mutation Load. *Cell* 178: 385- 399.
- Da Silva FA, Feldberg E, Carvalho NDM, Rangel SMH, Schneider CH, Carvalho-Zilse GA, Hernandez Rangel SM, Schneider CH, Carvalho-Zilse GA, da Silva VF, Gross MC.** (2019b): Effects of environmental pollution on the rDNAomics of Amazonian fish. *Environ. Pollut.* 252: 180–187.
- Da Silva M, Matoso DA, Artoni RF, Feldberg E.** (2019a): Karyotypic Diversity and Evolutionary Trends in Neotropical Electric Fish of the Genus *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae). *Zebrafish* 16: 308–320.
- 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 paraguensis* (Gymnotiformes). *Cytogenet. Genome Res.* 134: 303–307.
- Da Silva WO, Rodrigues da Costa MJ, Pieczarka JC, Rissino J, Pereira JC, Ferguson-Smith MA, Nagamachi CY.** (2019c) Identification of two independent X-autosome translocations in closely related mammalian (*Proechimys*) species. *Sci. Rep.* 9: 1–11.
- Damas J, Corbo M, Lewin HA.** (2021): Vertebrate chromosome evolution. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 9: 1–27.
- De Barros LC, Galetti Junior PM, Feldberg E.** (2017): Mapping 45S and 5S ribosomal genes in chromosomes of Anostomidae fish species (Ostariophysi, Characiformes) from different Amazonian water types. *Hydrobiologia* 789: 77–89.
- Do Nascimento VD, Coelho KA, Nogaroto V, de Almeida RB, Ziemniczak K, Centofante L, Pavanelli CS, Torres RA, Moreira-Filho O, Vicar MR.** (2018): Do multiple karyomorphs and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate chromosomal speciation? *Zool. Anz.* 272: 93–103.
- Dorn A, Musilová Z, Platzer M, Reichwald K, Cellerino A.** (2014): The strange case of East African annual fishes: Aridification correlates with diversification for a savannah aquatic group? *BMC Evol. Biol.* 14: 1–13.
- Dos Santos RZ, Calegari RM, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Melo S, Oliveira C, Foresti F, Uliano-Silva M, Porto-Foresti F, Utsunomia R.** (2021): A long-term conserved satellite DNA that remains unexpanded in several genomes of Characiformes fish is actively transcribed. *Genome Biol. Evol.* 13: 1–16.
- Delprat A, Negre B, Puig M, Ruiz A.** (2009): The Transposon *Galileo* Generates Natural Chromosomal Inversions in *Drosophila* by Ectopic Recombination. *PLoS One* 4(11): e7883.

- Devlin RH, Nagahama Y.** (2002): Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191–364.
- Dinman JD.** (2005): 5S rRNA: Structure and Function from Head to Toe. *Int. J. Biomed. Sci.* 1: 2–7.
- Eickbush TH, Eickbush DG.** (2007): Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175: 477–485.
- ENCODE Project Consortium.** (2004): The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) project. *Science* 306: 636–640.
- Ene A-C.** (2003): Chromosomal polymorphism in the goby *Neogobius eurycephalus* (Perciformes: Gobiidae). *Mar. Biol.* 142: 583–588
- Ewulonu UK, Haas R, Turner BJ.** (1985): A multiple sex chromosome system in the annual killifish, *Nothobranchius guentheri*. *Copeia* 2: 503–508.
- Favarato RM, da Silva M, de Oliveira RR, Artoni RF, Feldberg E, Matoso DA.** (2016): Cytogenetic Diversity and the Evolutionary Dynamics of rDNA Genes and Telomeric Sequences in the *Ancistrus* Genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish* 13: 103–111.
- Feliciello I, Akrap I, Brajkovi J, Zlatar I, Ugarkovic D.** (2014): Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Biol. Evol.* 7: 228–239.
- Felip A, Fujiwara A, Young WP, Wheeler P a, Noakes M, Phillips RB, Thorgaard GH.** (2004): Polymorphism and differentiation of rainbow trout Y chromosomes. *Genome.* 47: 1105–1113.
- Feron R, Pan Q, Wen M, Imarazene B, Jouanno E, Anderson J, Herpin A, Journot L, Parrinello H, Klopp C, et al.** (2021): RADSex: A computational workflow to study sex determination using restriction site-associated DNA sequencing data. *Mol. Ecol. Resour.* 21: 1715–1731.
- 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, 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.
- Fotsing SF, Margoliash J, Wang C, Saini S, Yanicky R, Shleizer-Burko S, Goren A, Gymrek M.** (2019): The impact of short tandem repeat variation on gene expression. *Nat. Genet.* 51: 1652–1659.
- Fricke R, Eschmeyer WN, van der Laan R (eds).** (2021): Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species,

references. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.

Electronic version accessed 1 March 2021.

- Fry K, Salser W.** (1977): Nucleotide sequence of HS- β satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterisation of similar sequences in other rodents. *Cell* 12: 1069–1084.
- Furness AI.** (2016): The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. *Biol. Rev.* 91: 796–812.
- Gammerdinger WJ, Kocher TD.** (2018): Unusual diversity of sex chromosomes in African cichlid fishes. *Genes* 9: 480.
- Garrido-Ramos MA.** (2017): Satellite DNA: An evolving topic. *Genes* 8: 230.
- Ghigliotti L, Cheng CHC, Bonillo C, Coutanceau JP, Pisano E.** (2013): *In situ* gene mapping of two genes supports independent evolution of sex chromosomes in cold-adapted Antarctic fish. *BioMed Res. Int.* e243938.
- Ghigliotti L, Near TJ, Ferrando S, Vacchi M, Pisano E.** (2010): Cytogenetic diversity in the Antarctic plunderfishes (Notothenioidei: Artedidraconidae). *Antarct. Sci.* 22: 805–814.
- 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.
- Glugoski L, Deon G, Schott S, Vicari MR, Nogaroto V, Moreira-Filho O.** (2020): Comparative cytogenetic analyses in *Ancistrus* species (Siluriformes: Loricariidae). *Neotrop. Ichthyol.* 18: e200013.
- Goes CAG, Daniel SN, Piva LH, Yasui GS, Artoni RF, Hashimoto DT, Foresti F, Porto-Foresti F.** (2020): Cytogenetic markers as a tool for characterization of hybrids of *Astyanax* Baird & Girard, 1854 and *Hyphessobrycon* Eigenmann, 1907. *Comp. Cytogenet.* 14: 231–242.
- 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.
- Grützner F, Rens W, Tsend-Ayush E, El-Mogharbel N, O'Brien PCM, Jones RC, et al.** (2004): In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature* 432: 913–917.
- Gržan T, Despot-Slade E, Meštrović N, Plohl M, Mravinac B.** (2020): CenH3 distribution reveals extended centromeres in the model beetle *Tribolium castaneum*. *PLoS Genet.* 16, 1–28.
- Guerrero RF, Kirkpatrick M.** (2014): Local adaptation and the evolution of chromosome fusions. *Evolution* 68: 2747–2756.
- Guiguen Y, Fostier A, Herpin A, Round W.** (2019): Sex Determination and Differentiation in Fish: Genetic, Genomic, and Endocrine Aspects. *Sex Control in Aquaculture I.* pp. 35–63.

- Harel I, Benayoun BA, Machado B, Singh PP, Hu C-K, Pech MF, Brunet A.** (2015): A Platform for Rapid Exploration of Aging and Diseases in a Naturally Short-Lived Vertebrate. *Cell* 160: 1013–1026.
- Henning F, Moysés CB, Calcagnotto D, Meyer A, de Almeida-Toledo LF.** (2011): Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*). *Heredity* 106: 391–400.
- Hillis DM, Dixon MT.** (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411–453.
- Honeycutt JL, Deck CA, Miller SC, Severance ME, Atkins EB, Luckenbach JA, Buckel JA, Daniels HV, Rice JA, Borski RJ, Godwin J.** (2019): Warmer waters masculinize wild populations of a fish with temperature-dependent sex determination. *Sci. Rep.* 9: 1–13.
- Hu CK, Brunet A.** (2018): The african turquoise killifish: a research organism to study vertebrate aging and diapause. *Aging Cell* 17: e12757.
- Huang S, Aleksashin NA, Loveland AB, Klepacki D, Reier K, Kefi A, Szal T, Remme J, Jaeger L, Vázquez-Laslop N, Korostelev AA, Mankin AS.** (2020): Ribosome engineering reveals the importance of 5S rRNA autonomy for ribosome assembly. *Nat. Commun.* 11: 1–13.
- Huang Y-C, Lee C-C, Kao C-Y, Chang N-C, Lin C-C, Shoemaker D, Wang J.** (2016): Evolution of long centromeres in fire ants. *BMC Evol. Biol.* 16: 189.
- Chalopin D, Volff J-N, Galiana D, Anderson JL, Scharl M.** (2015): Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. *Chromosom. Res.* 23: 545–560.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W.** (1994): The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215–220.
- Chirino MG, Fourastie MF, Centeno ND, Bressa MJ.** (2020): Unusual chromosome polymorphism and heterochromatin variation in the Argentinean population of the necrophagous fly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), comparison with other populations and evolutionary aspects. *Eur. J. Entomol.* 117: 295–301.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** (1985): Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature* 314: 67–73.
- Johnson Pokorná M, Kratochvíl L.** (2016): What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates? *Biol. Rev.* 91: 1–12.
- King M.** (1993): *Species Evolution: The Role of Chromosome Change*. Cambridge University Press: Cambridge, UK 1993. ISBN: 0521353084.
- Kit S.** (1961): Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *J. Mol. Biol.* 3: 711–716.
- Kitano J, Ross JA, Mori S, Kume M, Jones FC, Chan YF, Peichel CL, et al.** (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.
- Kohn M, Högel J, Vogel W, Minich P, Kehrer-Sawatzki H, Graves JAM, Hameister H.** (2006): Reconstruction of a 450-My-old ancestral vertebrate protokaryotype. *Trends Genet.* 22: 203–210.
- Krysanov E, Demidova T, Nagy B.** (2016): Divergent karyotypes of the annual killifish genus *Nothobranchius* (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). *Comp. Cytogenet.* 10: 439–445.
- Krysanov E, Demidova T.** (2018): Extensive karyotype variability of African fish genus *Nothobranchius* (Cyprinodontiformes). *Comp. Cytogenet.* 12: 387–402.
- Kuhl H, Guiguen Y, Höhne C, Kreuz E, Du K, Klopp C, Lopez-Roques C, Santidrian Yebra Pimentel E, Ciorpac M, Gessner J, Holostenco D, Kleiner W, Kohlmann K, Lamatsch DK, Prokopov D, Bestin A, et al.** (2021): A 180 My-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 376: 20200089.
- Kursel LE, Malik HS.** (2018): The cellular mechanisms and consequences of centromere drive. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52: 58–65.
- Lee J, Wamina NE, Choi H-I, Peruma S, Lee S-C, Nguyen VB, Jang W, Kim N-H, Gao L, Yang T-J.** (2017): Rapid amplification of four retrotransposon families promoted speciation and genome size expansion in the genus *Panax*. *Sci. Rep.* 7: 1–9.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA.** (1964): Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.
- Li S-F, Su T, Cheng G-Q, Wang B-X, Li X, Deng C-L, Gao W-J.** (2017): Chromosome Evolution in Connection with Repetitive Sequences and Epigenetics in Plants. *Genes* 8: 290.
- Lima-Filho P A., Bertollo L A C, Cioffi MB, Costa GWWF, Molina WF.** (2014): 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.
- Lin KW, Yan J.** (2008): Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mut. Res. Rev. Mut. Res.* 658: 95–110.
- Locati MD, Pagano JFB, Girard G, Ensink WA, van Olst M, van Leeuwen S, et al.** (2017): Expression of distinct maternal and somatic 5.8S, 18S, and 28S rRNA types during zebrafish development. *RNA* 23: 1188–1199.
- Lohe AR, Roberts PA.** (1990): An unusual Y chromosome of *Drosophila simulans* carrying amplified rDNA spacer without rRNA genes. *Genetics* 125: 399–406.
- Long EO, Dawid IB.** (1980): Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 727–764.
- Lopes M, Louzada S, Gama-Carvalho M, Chaves R.** (2021): Genomic Tackling of Human Satellite DNA: Breaking Barriers through Time. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 4707.

- López-Flores I, Garrido-Ramos MA.** (2012): The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dyn.* 7: 1–28.
- Louzada S, Lopes M, Ferreira D, Adegá F, Escudeiro A, Gama-Carvalho M, Chaves R** (2020): Decoding the Role of Satellite DNA in Genome Architecture and Plasticity – An Evolutionary and Clinical Affair. *Genes* 11: 72.
- Maneechot N, Yano CF, Bertollo LAC, Getlekha N, Molina WF, Ditcharoen S, Tengjaroenkul B, Supiwong W, Tanomtong A, Cioffi MB.** (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.
- Mantovani M, Dos Santos Abel LD, Moreira-Filho O.** (2005): Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 123: 211–216.
- Marta A, Dedukh D, Bartos O, Majtanova Z, Janko K.** (2020): Cytogenetic Characterization of Seven Novel satDNA Markers in Two Species of Spined Loaches (*Cobitis*) and Their Clonal Hybrids. *Genes* 11: 617.
- Martins C, Galetti PM Jr.** (2001): Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: Two different genomic locations are characterized by distinct non transcribed spacers. *Genome.* 44: 903–910.
- Martins C, Galetti PM.** (1999): Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.* 7: 363–367.
- 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. pp. 335–363.
- Matoso DA, de Almeida Val VMF, da Silva M, Moraes-Neto A, Almeida MC, Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF.** (2011): Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion melanoderdatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodidae): a reappraisal the existence of sex chromosome system in the species. *Rev. Fish Biol.* 21: 497–508.
- Melters DP, Bradnam KR, Young HA, Telis N, May MR, Ruby J, Chan SW, et al.** (2013): Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. *Genome Biol.* 14: R10.

- Merlo MA, Cross I, Palazon JL, Ubeda-Manzanaro M, Sarasquete C, Rebordinos L.** (2012): 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, Cross I, Manchado 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.
- 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.
- 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)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3–10.
- Milhomem SSR, Scacchetti PC, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA, Pansonato-Alves JC, 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.
- 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.
- Motta-Neto CC, Cioffi MB, da Costa GWWF, Amorim KDJ, Bertollo LAC, Artoni RF, Molina WF.** (2019): Overview on Karyotype Stasis in Atlantic Grunts (Eupercaria, Haemulidae) and the Evolutionary Extensions for Other Marine Fish Groups. *Front. Mar. Sci.* 6: 1–12.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, et al.** (1988): A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6622–6626.
- Nanda I, Schories S, Tripathi N, Dreyer C, Haaf T, Schmid M, Schartl M.** (2014): Sex chromosome polymorphism in guppies. *Chromosoma* 123: 373–383.
- Nei M, Rooney APOD.** (2005): Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu. Rev. Genet.* 39: 121–152.
- Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH.** (2016): *Fishes of the World*, 5th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA.
- Neumann P, Navrátilová A, Schroeder-Reiter E, Koblížková A, Steinbauerová V, et al.** (2012): Stretching the Rules: Monocentric Chromosomes with Multiple Centromere Domains. *PLoS Genet.* 8: e1002777.
- Nonaka E, Sirén J, Somervuo P, Ruokolainen L, Ovaskainen O, Hanski I.** (2019): Scaling up the effects of inbreeding depression from individuals to metapopulations. *J. Anim. Eco.* 88: 1202–1214.

- Novák P, Neumann P, Macas J.** (2020) Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. *Nat. Protoc.* 15: 3745–3776.
- Ocalewicz K.** (2013): Telomeres in Fishes. *Cytogenet. Genome Res.* 141: 114–125.
- Ocalewicz K, Babiak I, Kasprzycka B, Dobosz S, Kuzminski H, Goryczko K.** (2007): Occurrence of two forms of Y chromosome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) males from Rutki strain. *Aquaculture* 270: 546–551.
- O’Sullivan RJ, Karlseder J.** (2010): Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11: 171–181.
- Ota K, Tateno Y, Gojobori T.** (2003): Highly differentiated and conserved sex chromosome in fish species (*Aulopus japonicus*: Teleostei, Aulopidae). *Gene* 317: 187–193.
- Paim FG, Nirchio M, Oliveira C, Rossi AR.** (2020): Sex Chromosomes and Internal Telomeric Sequences in *Dormitator latifrons* (Richardson 1844) (Eleotridae: Eleotrinae): An Insight into Their Origin in the Genus. *Genes* 11: 659.
- Palacios-Gimenez OM, Dias GB, de Lima LG, Kuhn GC e S, Ramos É, Martins C, Cabral-de-Mello DC.** (2017): High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. *Sci. Rep.* 7: 6422.
- Palazzo AF, Lee ES.** (2015): Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front. Genet.* 6: 2.
- Pan Q, Feron R, Jouanno E, Darras H, Herpin A, Koop B, Rondeau E, Goetz FW, Larson WA, et al.** (2021): The rise and fall of the ancient northern pike master sex determining gene. *eLife* 1–26.
- 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.
- Peng JC, Karpen GH.** (2008): Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18: 204–211.
- Pereira CSA, 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.
- Pérez J, Morán P, Garcia-Vázquez E.** (1999): Physical mapping of three minisatellite sequences in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome. *Anim. Genet.* 30: 371–374.
- Phillips RB, Noakes MA, 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 R, Ráb P.** (2001): Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): An update. *Biol. Rev.* 76: 1–25
- 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.
- Piscor D, Parise-Maltempi PP.** (2016): Microsatellite organization in the B Chromosome and A Chromosome complement in *Astyanax* (Characiformes, Characidae) species. *Cytogenet. Genome Res.* 148: 44–51.
- 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.
- Potapova TA, Gerton JL.** (2019): Ribosomal DNA and the nucleolus in the context of genome organization. *Chromosom. Res.* 27: 109–127.
- Provazníková I, Hejníčková M, Visser S, Dalíková M, Carabajal Paladino LZ, Zrzavá M, Voleníková A, Marec F, Nguyen P.** (2021) Large-scale comparative analysis of cytogenetic markers across Lepidoptera. *Sci. Rep.* 11: 12214.
- Ráb P.** (2004): Karyotypová evoluce ryb řádu Esociformes. Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Ráb P, Rábová M, Reed KM, Phillips RB.** (1999): Chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the primitive semionotiform fish, longnose gar *Lepisosteus osseus*. *Chromosome Res.* 7: 475–480.
- 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.
- Ravi V, Venkatesh B.** (2008): Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18: 544–550.
- 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.
- 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.
- Reichard M.** (2010): *Nothobranchius kadleci*. *Zootaxa* 60: 49–60.

- Reichard M, Giannetti K, Ferreira T, Vrtilek M, Polačik M, Blažek R, Ferreira MG.** (2020): Environment and sex control lifespan and telomere length in wild-derived African killifish. *BioRxiv* 2020.09.03.280792.
- Reichard M, Polačik M.** (2019): *Nothobranchius furzeri*, an ‘instant’ fish from an ephemeral habitat. *Elife* 8: 1–11.
- Reichard M, Polačik M, Sedláček O.** (2009): Distribution, colour polymorphism and habitat use of the African killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with the shortest life span. *J. Fish Biol.* 74: 198–212.
- Reichwald K, Lauber C, Nanda I, Kirschner J, Hartmann N, Schories S, Gausmann U, Taudien S, Schilhabel MB, Szafranski K, et al.** (2009): High tandem repeat content in the genome of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*: a new vertebrate model for aging research. *Genome Biol.* 10: R16.
- Reichwald K, Petzold A, Koch P, Downie BR, Hartmann N, Pietsch S, Baumgart M, Chalopin D, Felder M, Bens M, Sahm A. et al.** (2015): Insights into Sex Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish. *Cell* 163: 1527–1538.
- 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.
- Robledillo LA, Neumann P, Koblížková A, Novák P, Vrbová I, Macas J.** (2020): Extraordinary Sequence Diversity and Promiscuity of Centromeric Satellites in the Legume Tribe *Fabeae*. *Mol. Biol. Evol.* 37: 2341–2356.
- Rosa KO, Ziemniczak 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.
- Ross JA, Peichel CL.** (2008): Molecular Cytogenetic Evidence of Rearrangements on the Y Chromosome of the Threespine Stickleback Fish. *Genetics* 179: 2173–2182.
- Ross JA, Urton JR, Boland J, Shapiro MD, Peichel CL.** (2009): Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (Gasterosteidae). *PLoS Genet.* 5: e1000391.
- Rovatsos M, Farkačová K, Altmanová M, Johnson Pokorná M, Kratochvíl L.** (2019): The rise and fall of differentiated sex chromosomes in geckos. *Mol. Ecol.* 28: 3042–3052.
- Rovatsos M, Kratochvíl L, Altmanová M, Johnson Pokorná M.** (2015): Interstitial Telomeric Motifs in Squamate Reptiles: When the Exceptions Outnumber the Rule. *PLoS One*, 10: e0134985.
- 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.
- Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J, Camacho JPM.** (2016): High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci. Rep.* 6: 28333.

- Sakamoto Y, Zacaro AA.** (2009): LEVAN, an ImageJ plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes. Initial version. Available in <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- Salvadori S, Deiana AM, Deidda F, Lobina C, Mulas A, Coluccia E.** (2018): XX/XY sex chromosome system and Chromosome markers in the snake eel *Ophisurus serpens* (Anguilliformes: Ophichtidae). *Mar. Biol. Res.* 14: 158–164.
- Sassi F de MC, Deon GA, Moreira-Filho O, Vicari MR, Bertollo LAC, Liehr T, de Oliveira EA, Cioffi MB.** (2020): Multiple sex chromosomes and evolutionary relationships in amazonian catfishes: The outstanding model of the genus *Harttia* (siluriformes: Loricariidae). *Genes* 11: 1–16.
- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F.** (2015): Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei, Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 146: 136–143.
- 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: 1–22.
- Sember A, Bohlen J, Šlechtová V, Altmanová M, Pelikánová Š, Ráb P.** (2018): Dynamics of tandemly repeated DNA sequences during evolution of diploid and tetraploid botiid loaches (Teleostei: Cobitoidea: Botiidae). *PLoS One* 13: 1–27.
- Sember A, Pelikánová Š, Cioffi M de B, Šlechtová V, Hatanaka T, Do Doan H, Knytl M, Ráb P.** (2020b): Taxonomic diversity not associated with gross karyotype differentiation: The case of bighead carps, genus *Hypophthalmichthys* (teleostei, cypriniformes, xenocypridae). *Genes* 11: 1–20.
- Sember A, Nguyen P, Perez MF, Altmanová M, Ráb P, Cioffi MB.** (2021): Multiple sex chromosomes in teleost fishes from a cytogenetic perspective: state of the art and future challenges. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 376: 20200098.
- Sember A, Oliveira EA, Ráb P, Bertollo LAC, Freitas NL, Viana PF, Yano CF, Hatanaka T, Marinho MMF, de Moraes RLR, Feldberg E, Cioffi MB.** (2020a): Centric Fusions behind the Karyotype Evolution of Neotropical *Nannostomus* Pencilfishes (Characiforme, Lebiasinidae): First Insights from a Molecular Cytogenetic Perspective. *Genes* 11: 91.
- Serrano-Freitas ÉA, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Oliveira C, Camacho JPM, Foresti F.** (2020): Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. *Mol. Genet. Genomics* 295: 195–207.

- Shen G, Wang P.** (2019): Environmental sex determination and sex differentiation in teleosts – how sex is established. In *Sex Control in Aquaculture*, 1st ed. (eds. Wang HP, Piferrer F, Chen SL). Pp. 85–116; Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons.
- Schartl M, Schmid M, Nanda I.** (2016): Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma* 125: 553–571.
- Scheer U, Thiry M, Goessens G.** (1993): Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol.* 3: 236–241.
- Schemberger MO, Bellafronte E, Nogaroto V, Almeida MC, Schühli GS, Artoni RF, Moreira Filho O, Vicari MR.** (2011): Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Genetica* 139: 1499–1508.
- Schemberger MO, Nascimento VD, Coan R, Ramos É, Nogaroto V, Ziemniczak K, Valente GT, Moreira-Filho O, Martins C, Vicari MR.** (2019): DNA transposon invasion and microsatellite accumulation guide W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. *Chromosoma* 128: 547–560.
- Schöfer C, Weipoltshammer K.** (2018): Nucleolus and chromatin. *Histochem. Cell Biol.* 150: 209–225.
- Sigeman H, Ponnikas S, Chauhan P, Dierickx E, Brooke M de L, Hansson B.** (2019): Repeated sex chromosome evolution in vertebrates supported by expanded avian sex chromosomes. *Proc. R. Soc. B.* 286: 20192051.
- Silva DS, Milhomem SS, Pieczarka JC, Nagamachi CY.** (2009): Cytogenetic studies in *Eigenmannia virescens* (Sternopygidae, Gymnotiformes) and new inferences on the origin of sex chromosomes in the *Eigenmannia* genus. *BMC Genetics* 10: 74.
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto Foresti F, Foresti F.** (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, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Foresti F.** (2017): High-throughput analysis unveils a highlyshared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. *Sci. Rep.* 7: 1–2.
- 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.
- Slijepcevic P.** (1998): Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107, 136–140.
- Sochorová J, Garcia S, Gálvez F, Symonová R, Kovařík A.** (2018): Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma* 127: 141–150.

- Spóz A, Boroń A, Ocalewicz K, Kirtiklis L.** (2017): Polymorphism of the rDNA chromosomal regions in the Weatherfish *Misgurnus fossilis* (teleostei: Cobitidae). *Folia Biol.* 65: 63–70.
- Srinivas N, Rachakonda S, Kumar R.** (2020): Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers* 12: 558.
- Suárez-Santiago VN, Blanca G, Ruiz-Rejo'n M, Garrido-Ramos MA.** (2007): Satellite DNA evolutionary patterns under a complex evolutionary scenario: the case of *Acrolophus* subgroup (Centaurea L., Compositae) from the western Mediterranean. *Gene* 404: 80–92.
- Supiwong W, Pinthong K, Seetapan K, Saenjundaeng P, Bertollo LAC, de Oliveira E, Yano CF, Liehr T, Phimphan S, Tanomtong A, Cioff MB.** (2019): Karyotype diversity and evolutionary trends in the Asian swamp eel *Monopterus albus* (Synbranchiformes, Synbranchidae): a case of chromosomal speciation? *BMC Evol. Biol.* 19: 73.
- Symonová R, Majtánová Z, Sember A, Staaks GB, 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.
- Symonová R, Ocalewicz K, Kirtiklis L, Delmastro GB, Pelikánová Š, Garcia S, Kovařík A.** (2017): Higher-order organisation of extremely amplified, potentially functional and massively methylated 5S rDNA in European pikes (*Esox* sp.). *BMC Genomics*, 18: 1–16.
- Šíchová J, Ohno M, Dincă V, Watanabe M, Sahara K, Marec F.** (2016): Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution of the northeast Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. *Biol. J. Linn. Soc.* 118: 457–471.
- Terzibasi Tozzini E, Cellerino A.** (2020): *Nothobranchius* annual killifishes. *EvoDevo*, 11: 1–9.
- Thakur J, Packiaraj J, Henikoff S.** (2021): Sequence, Chromatin and Evolution of Satellite DNA. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 4309.
- Traldi JB, Vicari MR, Martinez J de F, Blanco DR, Lui RL, Moreira-Filho O.** (2016): Chromosome Analyses of *Apareiodon argenteus* and *Apareiodon davisi* (Characiformes, Parodontidae): An Extensive Chromosomal Polymorphism of 45S and 5S Ribosomal DNAs. *Zebrafish* 13: 19–25.
- Tsekrekou M, Stratigi K, Chatzinikolaou G.** (2017): The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 1411.
- Underwood CJ, Choi K.** (2019): Heterogeneous transposable elements as silencers, enhancers and targets of meiotic recombination. *Chromosoma* 128: 279–296.
- Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, Costa-Silva GJ, Mendonça FF, Scacchetti PC, Oliveira C, Foresti F.** (2014): Molecular and cytogenetic analyses of cryptic species within the *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (Synbranchiformes: Synbranchidae) grouping: Species delimitations, Karyotypic evolution and intraspecific diversification. *Neotrop. Ichthyol.* 12: 903–911.

- Utsunomia, R, Silva DMZ de A, Ruiz-Ruano FJ, Goes CAG, Melo S, Ramos LP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F, Hashimoto DT.** (2019): Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. *Sci. Rep.* 9: 1–10.
- Valdesalici S, Cellerino A.** (2003): Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270: 189–191.
- Valenzano DR, Benayoun BA, Singh PP, Zhang E, Etter PD, Hu CK, et al.** (2015): The African Turquoise Killifish Genome Provides Insights into Evolution and Genetic Architecture of Lifespan. *Cell* 163: 1539–1554.
- Van der Merwe PDW, Cotterill FPD, Kandziora M, Watters BR, Nagy B, Genade T, Flügel TJ, Svendsen DS, Bellstedt DU.** (2021): Genomic fingerprints of palaeogeographic history: The tempo and mode of rift tectonics across tropical Africa has shaped the diversification of the killifish genus *Nothobranchius* (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 158: 106988.
- Vara C, Paytuví-Gallart A, Cuartero Y et al.** (2021): The impact of chromosomal fusions on 3D genome folding and recombination in the germ line. *Nat Commun.* 12: 2981.
- Vicoso B, Bachtrog D.** (2013): Reversal of an ancient sex chromosome to an autosome in *Drosophila*. *Nature* 499: 332–335.
- Vierna J, Wehner S, Höner zu Siederdissen C, Martínez-Lage A, Marz M.** (2013): Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity* 111: 410–421.
- Völker M, Ráb P.** (2015): Direct chromosome preparation from regenerating fin tissue. Chapter 6, pp: 37–41. 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.
- Völker M, Ráb P, Kullmann, H.** (2008): Karyotype differentiation in *Chromaphysomion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae): Patterns, mechanisms, and evolutionary implications. *Biol. J. Linn. Soc.* 94: 143–153.
- Vondrak T, Robledillo LA, Novák P, Koblížková A, Neumann P, Macas J.** (2019): Genome-wide characterization of satellite DNA arrays in a complex plant genome using nanopore reads. *Plant J.* 101: 484–500.
- Vrtílek M, Reichard M.** (2016): Patterns of morphological variation among populations of the widespread annual killifish *Nothobranchius orthonotus* are independent of genetic divergence and biogeography. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 54: 289–298.
- Warmerdam DO, Wolthuis RMF.** (2019): Keeping ribosomal DNA intact: a repeating challenge. *Chromosome Res.* 27: 57–72.

- Watters BR.** (2009): The ecology and distribution of *Nothobranchius* fishes. *Journal of the American Killifish Association* 42: 58–61.
- Wellband K, Mérot C, Linnansaari T, Elliott JAK, Curry RA, Bernatchez L.** (2019): Chromosomal fusion and life history-associated genomic variation contribute to within-river local adaptation of Atlantic salmon. *Mol. Ecol.* 28: 1439–1459.
- Wildekamp RH.** (2004): A world of killies – Atlas of the oviparous cyprinodontiform fishes of the world (Vol. 4). *The American Killifish Association, Elyria, Ohio.*
- Willemsen D, Cui R, Reichard M, Valenzano DR.** (2020) Intra-Species Differences in Population Size shape Life History and Genome Evolution. *eLife* 9: e55794.
- Winter DJ, Ganley ARD, Young CA, Liachko I, Schardl CL, Dupont P-Y, Berry D, Ram A, Scott B, Cox MP.** (2018): Repeat elements organise 3D genome structure and mediate transcription in the filamentous fungus *Epichloë festucae*. *PLoS Genetics* 14: e1007467.
- Yano CF, Bertollo LAC, Ezaz T, Trifonov V, Sember A, Liehr T, et al.** (2017). Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triportheidae). *Heredity* 118: 276–283.
- Yano CF, Bertollo LA, Liehr T, Troy WP, Cioffi M de B.** (2016): W Chromosome Dynamics in *Triportheus* Species (Characiformes, Triportheidae): An Ongoing Process Narrated by Repetitive Sequences. *Heredity* 107: 342–348.
- Yoshida K, Kitano J.** (2021): Tempo and mode in karyotype evolution revealed by a probabilistic model incorporating both chromosome number and morphology. *PLoS Genet* 17: e1009502.
- Zhang C, Ye L, Chen Y, Xiao J, Wu, Y, Tao M, Xiao Y, Liu S.** (2015): The chromosomal constitution of fish hybrid lineage revealed by 5S rDNA FISH. *BMC Genet.* 16: 140.
- Zhang L, Bao Z, Wang S, Huang X, Hu J.** (2007): Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorpha) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops. *Genetica* 130: 193–198.
- 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.