

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Tomáš Pavlica

Evoluce pohlavních chromozómů u vybraných taxonů kostnatých ryb (Teleostei)

Sex chromosome evolution in selected taxa of teleost fishes (Teleostei)

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Alexandr Sember, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Zuzana Musilová, Ph.D.

Praha, 2022

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat školiteli, Mgr. Alexandru Semberovi PhD., který mě s velkou trpělivostí naučil převážnou většinu metod a dovedností spjatých s přípravou odborného textu a neustále mě udržoval v obraze o nových poznatcích v cytogenetice. Dále můj velký dík patří: Mgr. Marii Altmanové za četné rady především s organizací a grafickým zpracováním dat, Sergeji Simanovskemu (Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moskva), Dmitrovi Dedukhovi a Anatolu Martovi z naší laboratoře v Liběchově, kteří mě naučili metody přípravy meiotických preparátů a imunodetekce a pomohli mi při optimalizaci protokolu, prof. Petru Rábovi za laboratorní zázemí a podnět ke studiu širokohlavců rodu *Bunocephalus*, Mgr. Zuzaně Musilové, Ph.D. za pomoc při řešení formálních záležitostí, Mgr. Janě Štundlové, PhD. za rady a pomoc při analyzování dat a Mgr. Tomášovi Dvořákovi a RNDr. Jörgovi Bohlenovi, PhD. za pomoc při preparaci ryb a T. Dvořákovi dále za fylogenetické analýzy; dále také doc. RNDr. Martinu Reichardovi, PhD. (Ústav biologie obratlovců, AV ČR) za poskytnutí halančíků a Tomáši Kučerovi (Vivarium Mělník) za zprostředkování nákupu širokohlavců a PD Thomasovi Liehrovi, Ph.D. a Dr. Ahmedovi Al-Rikabimu (Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Německo) za přípravu malovacích sond pro širokohlavce. V neposlední řadě patří můj dík také Mgr. Karolíně Lukšíkové a Mgr. Marku Jankáskovi, kteří mi pomáhali udržet si pozitivní náladu po celou dobu studia, stejně jako dalším členům týmu zapojených do řešení projektu na halančících a laboratorním pracovnícím Bc. Šárce Pelikánové a Petře Šejnohové. Poslední poděkování bych rád věnoval mému okolí, hlavně mé přítelkyni a mámě, které mě podporovaly po celou dobu studia a mají se mnou trpělivost, když musím dávat přednost laboratorní práci.

Diplomová práce vznikla v letech 2020-2022 v rámci grantového projektu GAČR 19-22346Y a GAUK 243-252138.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracoval/a samostatně, že všechny použité zdroje byly řádně uvedeny a že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Bc. Tomáš Pavlica

V Praze dne

Abstrakt

Kostnaté ryby tvoří nadpoloviční většinu obratlovců na zemi. Disponují širokou škálou mechanismů pohlavní determinace a diferenciaci, včetně devíti dosud známých systémů pohlavních chromozómů. Rybí pohlavní chromozómy jsou obecně považovány za evolučně mladé a jsou proto vhodné pro studium časných fází vývoje těchto unikátních oblastí genomu. Úkolem mé diplomové práce bylo analyzovat výskyt a úroveň diferenciaci pohlavních chromozómů u dvou druhů halančíků rodu *Nothobranchius* a u jednoho zástupce širokohlavců rodu *Bunocephalus* metodami standardní a molekulární cytogenetiky. Analyzované populace halančíků *N. kadleci* a *N. furzeri* sdílely systém pohlavních chromozómů XY. I přes obvykle výraznou heteromorfii pohlavních chromozómů, komparativní genomová hybridizace (CGH) neodhalila oblast diferenciaci. Analýza synaptonemálních komplexů v kombinaci s mapováním 18S rDNA a telomerických sekvencí metodou fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) ukázala téměř výhradně standardní párování pohlavních chromozómů s přispěním synaptického přizpůsobení. U samic jedné populace *N. furzeri* jsem v pachytene pozoroval malý nadpočetný chromozóm, který se nevyskytoval v mitóze analyzovaných somatických tkání. Distribuce oblastí rekombinace se mírně lišila v rámci omezeného studovaného vzorku mezi samci a samicemi: u samců byla častěji lokalizována ke konci bivalentů. Jedinci rodu *Bunocephalus* byli všichni identifikováni jako *B. aloikae* a vykazovali mezi sebou dramatické karyotypové rozdíly, s rozsahem diploidního počtu chromozómů ($2n$) od 47 do 51. V samčí meióze jsem u některých jedinců pozoroval tetraivalent (tj. párování čtyř chromozómů), který – jak následně potvrdila FISH s malovací sondou – byl výsledkem reciproké translokace. Pomocí FISH s repetitivními sekvencemi a malovacími sondami jsem odhalil neobvykle vysokou četnost přestaveb (především translokací, centrických fúzí a rozpadů) a aneuploidii mezi analyzovanými jedinci. Přestože přítomnost tetraivalentu nebyla konzistentní mezi analyzovanými samci, CGH odhalila v rámci tohoto útvaru výraznou akumulaci samčí specifické sondy. Výsledky tak naznačují přítomnost neobvyklého systému pohlavních chromozómů $X_1Y_1X_2Y_2$ alespoň u některých samců *B. aloikae*. Tento systém byl v rámci ryb dosud navržen pouze u blízce příbuzného *B. coracoideus*. U dalších samců CGH naznačila systém XY, ale výsledky u samic jsou nejednoznačné. Moje práce přispěla k hlubšímu pochopení evoluce pohlavních chromozómů halančíků a širokohlavců.

Klíčová slova: CGH, chromozómové přestavby, halančíci, karyotypová variabilita, kryptické druhy, pohlavní chromozómy, repetitivní DNA, synaptonemální komplexy, širokohlavci, WCP

Abstract

Teleosts represent more than half of the extant vertebrate species. They show a wide range of mechanisms driving both sex determination and sex differentiation, including nine sex chromosome systems described to date. Teleost sex chromosomes are generally considered as evolutionarily young, therefore they are suitable for an analysis of the early stages of evolution of these unique genomic regions. The aim of the current thesis was to analyze the presence and degree of differentiation of sex chromosomes in two *Nothobranchius* killifish species and one *Bunocephalus* banjo catfish representative using conventional and molecular cytogenetic methods. Different populations of *N. kadleci* and *N. furzeri* analysed in this thesis shared an XY sex chromosome system. Despite the obvious heteromorphy of their sex chromosomes, comparative genome hybridization (CGH) did not show any region of differentiation. Analysis of synaptonemal complexes by immunostaining coupled with the mapping of 18S rDNA and telomeric repeats using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) showed mainly standard pairing with the contribution of synaptic adjustment. Pachytene spreads of females from one *N. furzeri* population contained a small supernumerary chromosome which was not present in metaphases of studied somatic cells. Distribution of recombination foci was slightly different between sexes in our limited sampling: male crossover sites were located more towards the terminal parts of chromosomes compared to females. All studied individuals of the genus *Bunocephalus* were identified as *B. aloikae* and they displayed extensive inter-individual karyotype differences with their diploid chromosome number (2n) varying from 47 to 51. I observed a tetravalent (i.e. pairing of four chromosomes) in meiosis of some male individuals which formed due to a reciprocal translocation as proven by chromosome painting. By using FISH with repetitive sequences and chromosome painting probes I uncovered an extraordinarily high rate of chromosomal rearrangements (especially translocations, centric fusions and fissions) and aneuploidies among studied individuals. Although the tetravalent was not consistently present among the analysed males, CGH method revealed a male-specific accumulation within this formation. The results imply the presence of a rare sex chromosome system $X_1Y_1X_2Y_2$ at least in some males of *B. aloikae*. This system was suggested among fishes so far only in closely related *B. coracoideus*. In other males, CGH method pointed on a possible XY sex chromosome system but the results obtained from females were unclear. My work contributed to better understanding of sex chromosome evolution in genera *Nothobranchius* and *Bunocephalus*.

Keywords: CGH, karyotype rearrangements, killifish, karyotype variability, cryptic species, sex chromosomes, repetitive DNA, synaptonemal complexes, banjo catfish, WCP

Seznam zkratek

a	akrocentrický chromozóm
BSA	Bovine serum albumin
<i>COI</i>	cytochrom oxidase I
CGH	Comparative genome hybridization
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DOP-PCR	Degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction
<i>dmrt1</i>	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESD	Environmental sex determination
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
<i>gdf6b</i>	Growth differentiation factor 6b
GNS	Goat normal serum
GSD	Genetic sex determination
<i>irf9</i>	Interferon regulatory factor 9
ITS	interstitial telomeric sequence
LG	Linkage group
m	metacentrický chromozóm
MANOVA	Multiple analysis of variance
<i>MLH1</i>	MutL homolog 1
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PNA	Peptide nucleic acid
PSD	Polygenic sex determination
<i>RAG1</i>	Recombination activating gene
rDNA	ribozomální DNA
RT	Room temperature
<i>SdY</i>	Sexual dimorphic on the Y-chromosome
sm	submetacentrický chromozóm
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSC	Saline-sodium citrate
st	subtelocentrický chromozóm
satDNA	satelitní DNA
<i>SYCP3</i>	Synaptonemal complex protein 3
TSD	Temperature sex determination
WCP	Whole chromosome painting

Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1	Determinace a diferenciacce pohlaví ryb.....	2
1.1.1	Enviromentální určení pohlaví.....	3
1.1.2	Genetické určení pohlaví.....	3
1.1.2.1	Polygenní determinace pohlaví.....	3
1.1.2.2	Monogenní determinace pohlaví.....	4
1.1.2.3	B chromozómy a určení pohlaví.....	4
1.2	Pohlavní chromozómy.....	5
1.3	Pohlavní chromozómy ryb.....	7
1.4	Evoluce karyotypu ryb.....	8
1.5	Význam cytogenetiky při studiu biodiverzity a evoluce genomu ryb v době postgenomové.....	10
1.5.1	Karyotypové charakteristiky neotropických ryb.....	12
1.6	Širokohlavci rodu <i>Bunocephalus</i>	14
1.7	Halančici rodu <i>Nothobranchius</i>	15
2.	Cíle práce.....	17
3.	Materiál a metody.....	18
3.1.	Materiál.....	18
3.2.	Metody.....	18
3.2.1.	Příprava chromozómových suspenzí.....	18
3.2.2	Příprava chromozómových preparátů pro metody FISH.....	19
3.2.3	Izolace genomové DNA.....	19
3.2.4	Příprava kompetitivní DNA.....	20
3.2.5	Příprava sond.....	21
3.2.5.1	Chromozómové malovací sondy (WCP).....	21
3.2.5.2	Celogenomové sondy pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH).....	22
3.2.5.3	Sonda pro 18S rDNA FISH.....	23
3.2.6.	Fluorescenční hybridizace in situ (FISH).....	24
3.2.6.1	Mapování 18S rDNA.....	24
3.2.6.2	Mapování telomerických repetic.....	25
3.2.6.3	Hybridizace celochromozómových sond (WCP).....	25
3.2.6.4	Průběh komparativní genomové hybridizace (CGH).....	26
3.2.7	Příprava preparátů pro imunodetekci.....	26
3.2.8	Imunodetekce synaptonemálních komplexů.....	27
3.2.9	Recyklace skel po imunodetekci.....	28
3.2.10	Recyklace skel po metodě FISH.....	28
3.2.11	Vyhodnocení preparátů.....	28
3.2.12.	Fylogenetická analýza.....	29
4.	Výsledky.....	31
4.1	Analýza pohlavních chromozómů u halančků <i>Nothobranchius furzeri</i> a <i>N. kadleci</i>	31

4.1.1	Komparativní genomová hybridizace (CGH).....	31
4.1.2	Imunodetekce proteinů SYCP3 a MLH1 na pachytenních jádrech.....	32
3.1.3	Detailní analýza bivalentu pohlavních chromozómů XY následnými protokoly FISH.....	33
4.2	Analýza karyotypu u širokohlavců druhu <i>B. aloikae</i>	36
4.2.1	Základní fylogenetická a karyotypová analýza.....	36
4.2.2	Komparativní genomová hybridizace (CGH).....	39
4.2.3	Detailní analýza karyotypu širokohlavců pomocí celochromozómových malovacích sond (WCP).....	40
5.	Diskuze.....	48
5.1	Pohlavní chromozómy halančíků <i>N. furzeri</i> a <i>N. kadleci</i>	48
5.1.1	Analýza pohlavních chromozómů metodou CGH.....	48
5.1.2	Analýza synaptonemálních komplexů pomocí imunodetekce a následnými metodami FISH.....	49
5.2	Širokohlavci rodu <i>Bunocephalus</i> – diferenciace karyotypu a pohlavních chromozómů.....	52
5.2.1	Fylogenetická analýza.....	52
5.2.2	Základní karyotypová analýza.....	52
5.2.3	Analýza chromozómů metodou CGH.....	55
6.	Závěr.....	62
7.	Seznam literatury.....	64

1. Úvod

Kostnaté ryby (Teleostei) zahrnují více než 35 000 druhů, což je přibližně polovina všech žijících obratlovců (Nelson et al. 2016, Fricke et al. 2022). Genomy ryb jsou charakteristické svou dynamikou a plasticitou, s velkou tolerancí pro polyploidizaci (Mank a Avise 2009, Glasauer a Neuhauss 2014) a hybridizaci (Scribner a Bartron 2000). To spolu s širokou škálou biotopů, na které se musely ryby adaptovat, mohlo mít výrazný vliv na vznik rozmanitých způsobů determinace a diferenciaci pohlaví u ryb, které mezi obratlovci nemají období (Devlin a Nagahama 2002, Godwin a Roberts 2018, Guiguen et al. 2019, Pan et al. 2021, Pla et al. 2022). Znalost těchto mechanismů je důležitá jednak z komerčního hlediska, tj. pro zvýšení efektivity akvakultur (Guiguen et al. 2019, Shen a Wang 2019, Kuhl et al. 2021), a dále také z hlediska konzervačního, protože pohlaví mnoha druhů ryb je určeno nebo ovlivněno teplotou či dalšími faktory okolního prostředí (environmentální určení pohlaví; z angl. *environmental sex determination*, ESD). Pokud se tyto podmínky výrazně změní (např. vlivem probíhajících změn klimatu na naší planetě), mohou vychýlit poměr pohlaví u daného druhu od standardního poměru 1:1, a to může mít kritický dopad na přežívání populací daného druhu (např. Valenzuela et al. 2019). Vedle ESD najdeme u ryb také pestrou škálu mechanismů genetického určení pohlaví (GSD; z angl. *genetic sex determination*), kdy je pohlaví určeno genotypem, tj. alelami jednoho či více genů, jejichž exprese v kritické fázi vývoje gonád rozhodne o vývoji samčího nebo samičího pohlaví. Mimo specifické případy polygenní determinace pohlaví (viz níže) spouští signální kaskádu vedoucí ke vzniku samčích nebo samičích gonád jeden ústřední gen (dále jen determinanta pohlaví). Chromozómový pár, na kterém se nachází tento regulátor pohlaví, nazýváme pohlavní chromozómy nebo také gonozómy a jejich studium fascinuje vědce již od raných dob genetiky (např. Correns 1903). Navzdory usilovnému výzkumu trvajícimu již více než sto let není celá řada otázek kolem evoluce pohlavních chromozómů uspokojivě vysvětlena (např. proč a jak dochází k potlačení rekombinace na pohlavních chromozómech) a klíčové odpovědi může přinést výzkum evolučně mladých systémů pohlavních chromozómů v časných fázích diferenciaci (Abbott et al. 2017, Charlesworth 2019, 2021, Furman et al. 2020a, Kratochvíl et al. 2021). Celá řada vhodných modelových skupin pro takový výzkum se nachází u ryb.

Cílem mé diplomové práce bylo přinést nové poznatky o evoluci pohlavních chromozómů u dvou rodů kostnatých ryb, konkrétně halančíků rodu *Nothobranchius* (Peters, 1868), a širokohlavců rodu *Bunocephalus* (Kner, 1855). Oba tyto rybí taxony spojuje život ve

fragmentovaných populacích (Bartáková et al. 2013, 2015, Ferreira et al. 2017), vysoká dynamika na karyotypové úrovni a dokumentovaná přítomnost pohlavních chromozómů (Reichwald et al. 2015, Ferreira et al. 2016, Krysanov a Demidova 2018). Zároveň se jedná o taxony, kde byly pohlavní chromozómy na cytogenetické úrovni studovány metodami s omezenou vypovídací hodnotou (Ferreira et al. 2016, 2017, Krysanov a Demidova 2018), a tak se moje práce soustředila na ověření či doplnění stávajících hypotéz o jejich přítomnosti, mechanismu vzniku a stupni diferenciaci, za použití vhodných komplementárních molekulárně cytogenetických přístupů.

1.1 Determinace a diferenciaci pohlaví ryb

Proces určení pohlaví sestává ze dvou fází: pohlavní determinace a pohlavní diferenciaci. Pohlavní determinace je proces, při kterém se v kritické fázi vývoje nějakým mechanismem rozhodne, zda se zárodek bude dále vyvíjet jako samec nebo samice. Jak již bylo řečeno výše, rozeznáváme dva základní typy pohlavní determinace: ESD a GSD. Dnes jsou tyto mechanismy chápány s velkým přispěním výzkumu na rybách spíše jako dva konečné body kontinua evoluce pohlavní determinace než jako dva vzájemně se vylučující mechanismy. K této hypotéze vedla zjištění, že u některých živočichů se na určení pohlaví podílejí ESD i GSD dohromady, případně extrémní podmínky prostředí dokážou zvrátit vývoj pohlavních orgánů, přestože byly již předtím geneticky determinovány (tzv. pohlavní zvrát z angl. sex reversal) (Shao et al. 2014, Shen a Wang 2019). U ryb je dále poměrně běžné, že blízké příbuzné druhy a někdy i populace stejného druhu se od sebe liší v tom, do jaké míry je jejich pohlaví určeno mechanismy ESD nebo GSD. Podobně jako u jiných studenokrevných obratlovců (Pokorná a Kratochvíl 2014) se i přes stále značně omezené znalosti dá předpokládat preferenční přechod z ESD na „stabilnější“ GSD (tj. GSD udržuje stabilní poměr pohlaví nezávisle na změnách podmínek prostředí). Pozoruhodné jsou příklady ryb, které mají již velmi dobře diferenciované pohlavní chromozómy, a přesto je vývoj jejich pohlaví ovlivněn teplotou, jako např. u medaky japonské *Oryzias latipes* nebo gavúnovce argentinského *Odontesthes bonariensis*, u kterých se za extrémních teplot rodí více samců (Hattori et al. 2007, Yamamoto et al. 2014). Naopak přechod od GSD k ESD je obecně velmi vzácný; dosud byl spolehlivě popsán pouze u agamy australské *Pogona vitticeps* (Holleley et al. 2015).

Diferenciaci pohlaví představuje již následný proces vývoje pohlavních orgánů. Jinými slovy: diferenciaci je fenotypovým projevem determinace pohlaví. Tato fáze je ovlivněna celou řadou hormonů. U samců se jedná o tzv. androgenní hormony (např. testosteron), zatímco u

samičího pohlaví dochází k přeměně androgenů na estrogenery. Signální kaskády, které se podílejí na syntéze a distribuci těchto hormonů jsou do značné míry konzervované napříč živočišnou říší (Capel 2017, Guiguen et al. 2019, Adolfi et al. 2021).

1.1.1 Enviromentální určení pohlaví

Nejčastějším faktorem ovlivňujícím určení pohlaví u ryb je teplota (tzv. TSD; z angl. *temperature sex determination*), což bylo popsáno u desítek druhů (Ospina-Álvarez a Piferrer, 2008). Ve většině případů TSD se u ryb za vyšších teplot rodí více samců a za nižších více samic, jako je tomu např. u gavúnovce argentinského *Odontesthes bonariensis* (Strüssman et al. 1996). Existují také výjimky, jako jsou např. platýzi *Paralichthys olivaceus* a *P. lethostigma*, u kterých se rodí více samců jak při vysokých, tak i při nízkých teplotách (Luckenbach et al. 2009). Dále byla u ryb popsána determinace pohlaví závislá na na pH vody a ojediněle i na další faktory, jako jsou hustota populace, sociální statut, hypoxie (nedostatek kyslíku ve vodě) nebo dokonce barva pozadí nádrže/akvária (přehled viz Baroiller et al. 2009, Godwin a Roberts 2018, Guiguen et al. 2019). Jako příklad může posloužit sociální determinace pohlaví u klauna očkatého *Amphiprion ocellaris*, u kterého je největší dominantní jedinec vždy samice, ale po jejím odstranění se v dominantní samici přemění jeden ze samců (Godwin 1994).

1.1.2 Genetické určení pohlaví

Základní dělení GSD je na polygenní (PSD z angl. *polygenic sex determination*) a monogenní určení pohlaví. O polygenním systému hovoříme v případě, kdy se na určení pohlaví podílí více lokusů, které jsou rozmístěné na různých místech genomu. Takové určení je u obratlovců relativně vzácné a bylo dosud popsáno kromě několika málo druhů hlodavců především u ryb (viz kapitola 1.1.2.1) (přehled viz Moore a Roberts 2013). Naopak v případě, kdy je pohlaví určené jednou ústřední determinantou lokalizovanou na pohlavním chromozómu, mluvíme o tzv. monogenním určení pohlaví.

1.1.2.1 Polygenní determinace pohlaví

Pod PSD se zahrnuje hned několik různých mechanismů určení pohlaví, které u ryb byly odhaleny. Prvním případem je situace, kdy se v genomu nachází současně dva různé systémy pohlavních chromozómů. V takovém případě nejspíše zrovna dochází k přechodu z jednoho systému pohlavních chromozómů na jiný a původní pohlavní chromozómy dosud neprodělaly návrat k autozómové dědičnosti. Několik takových případů bylo popsáno u evolučně mladých

a rychle se vyvíjejících genomů afrických cichlid, např. u tlamovce Burtonova *Astatotilapia burtoni*, kde jsou systémy pohlavních chromozómů vázány na chromozómové páry LG5 a LG13 (LG = z angl. *linkage group*; vazebné skupiny) nebo tlamovce *Metriaclima mbenjii*, u kterého se nacházejí čtyři pohlavní chromozómy, jejichž kombinace ovlivňuje nejen pohlaví ale také fenotyp jedince (Roberts et al. 2016, Moore et al. 2022). Druhým případem je situace, kdy je pohlaví určeno kumulací efektu více genů malého účinku, které jsou rozmístěny na autozómech. Taková situace byla objevena např. u laboratorních populací zebříčky neboli dania pruhovaného *Danio rerio*, u které jde zřejmě o výsledek opakovaného křížení vybraných párů ryb, jelikož u populací žijících ve volné přírodě byl nalezen standardní systém pohlavních chromozómů typu ZW (Anderson et al. 2012, Wilson et al. 2014).

1.1.2.2 Monogenní determinace pohlaví

Z hlediska determinant pohlaví najdeme u ryb nejpestřejší škálu mezi obratlovci (shrnutí např. v: Guiguen et al. 2019, Pan et al. 2021). Vznik těchto determinant představuje počátek evoluce nového páru pohlavních chromozómů. Determinanty pohlaví mohou vzniknout duplikací genu a následným přesunem duplikátu na jiný chromozóm (tj. ektopická duplikace), kde se gen vyvine v determinantu pohlaví procesem neofunkcionalizace. Přibližně se stejnou četností se u ryb determinanta pohlaví vyvinula druhým způsobem, tj. procesem alelické diverzifikace, kdy mutace v původním genu na původním místě v genomu vedla ke vzniku alely determinující pohlaví (Herpin a Schartl 2015, Guiguen et al. 2019, Kratochvíl et al. 2021). Geny, ze kterých se ústřední determinanty vyvíjejí, jsou obvykle již součástí signálních kaskád pro určení pohlaví. Jedinou dosud známou empiricky dobře podpořenou výjimku u ryb najdeme u některých lososovitých, u nichž je ústřední determinantou gen *SdY* (z angl. *sexual dimorphic on the Y-chromosome*), vzniklý duplikací a následným zkrácením genu *irf9* (z angl. *interferon regulatory factor 9*), který se běžně účastní imunitní odpovědi (Yano et al. 2012, 2013).

1.1.2.3 B chromozómy a určení pohlaví

U ryb byly pozorovány případy výskytu nadpočetných (B) chromozómů (tj. takových, které se vyskytují navíc oproti standardnímu setu chromozómů; přehled viz např. Jones et al. 2008), které segregují specificky pouze s jedním pohlavím (např. Favarato et al. 2019). V některých takových případech data naznačují přímý vliv B chromozómů na determinaci pohlaví. Například přítomnost B chromozómů u afrických cichlid z jezera Malawi má

epistaticky dominantní efekt vůči samčímu heterogametickému systému pohlavních chromozómů XY na LG7 (Clark a Kocher 2019), tj. jedinci s pohlavními chromozómy XY se v přítomnosti B chromozómu přesto vyvinou jako samičky. Další pozoruhodný případ možného vlivu B chromozómu na determinaci pohlaví, byl zaznamenán u tetér rodu *Astyanax*, kde jedinci druhu *A. scabripinnis* nesoucí B chromozómy mají zvýšenou expresi genu *dmrt1* (z angl. *doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) (Castro et al. 2018), který se podílí na pohlavní diferenciaci (Herpin a Schartl 2011) a je významnou pohlavní determinantou nejen u ryb (Guiguen et al. 2019), ale také ptáků (Smith et al. 2009). I u druhu *A. mexicanus* se nacházejí B chromozómy (v jedné až třech kopiích), a to téměř výhradně u samců. U tohoto druhu se zjistilo, že B chromozóm přímo obsahuje dva tandemově uspořádané duplikáty genu *gdf6b* (z angl. *growth differentiation factor 6b*) a výsledky integrovaných dat celé řady cytogenetických, genomických a dalších metodických přístupů silně podporují hypotézu, že *gdf6b* determinuje samčí pohlaví u studované populace této pozoruhodné slepé jeskynní ryby (Imarazene et al. 2021).

1.2 Pohlavní chromozómy

Pohlavní chromozómy vznikly opakovaně u různých organizmů v průběhu evoluce nezávisle na sobě, a to nejčastěji z páru autozómů (Bachtrog et al. 2014). Pohlavní chromozómy můžeme rozlišovat podle toho, u kterého pohlaví se nachází nepárový pohlavní chromozóm neboli alozóm. Takové pohlaví tvoří dva typy gamet, tudíž se označuje jako heterogametické. U systému pohlavních chromozómů typu ZW (tzv. typ *Abraxas*) jsou heterogametické samice, zatímco samci nesou dvě kopie chromozómu Z. U systému XY (tzv. typ *Drosophila*) mají heterogametičtí samci pohlavní chromozómy X a Y, zatímco homogametické samice nesou dva chromozómy X (Ohno 1967, Bull 1983, Ezaz et al. 2006). Aby došlo k fixaci ústřední determinanty pohlaví, je nutné, aby v daném úseku došlo k zamezení rekombinace. Dosud běžně uvažovaný model suprese rekombinace na pohlavních chromozómech se opírá o tzv. pohlavně antagonistickou selekci. Tento model předpokládá, že determinanta pohlaví se dostane do těsné vazby s alelou pohlavně antagonistického genu, která je výhodná pro fitness (tj. reprodukční zdatnost) jednoho pohlaví (toho, které je určeno determinantou pohlaví) a naopak snižuje fitness druhého pohlaví. Vazbou na determinantu pohlaví je tak vyřešen genetický konflikt (Charlesworth et al. 2005, Charlesworth 2021). Zatímco se stále nepodařilo empiricky podpořit tento koncept, přibývají alternativní teorie vysvětlující supresi rekombinace na pohlavních chromozómech (Charlesworth 2019, Jeffries et al. 2021, Perrin 2021, Rifkin et

al. 2021, Jay et al. 2022, Lenormand a Rozen 2022). Například u celé řady organismů byly pozorovány rozdíly v četnosti a distribuci rekombinace mezi samci a samicemi daného druhu – tzv. heterochiazmie. Zatímco rekombinace v takových případech probíhá obvykle po celé délce chromozómů samic, u samců je výrazně omezena do koncových částí chromozómů (přehled viz Sardell a Kirkpatrick 2020). U některých linií žab a ryb s výraznou heterochiazmií se tedy soudí, že právě tento jev je zásadní pro vznik suprese rekombinace na pohlavním chromozómu Y, a to bez nutnosti příspěvku pohlavně antagonistické selekce (Perrin 2021, u ryb např. Sutherland et al. 2017, Sardell et al. 2018, Bergero et al. 2019, Edvardsen et al. 2022). Jiným zajímavým případem je medaka *Oryzias latipes*, kde došlo k duplikaci segmentu obsahujícího budoucí determinantu pohlaví a celý segment se přesunul na jiný chromozóm. Jelikož homolog tohoto chromozómu tento segment neobsahuje, tak v této oblasti nově vzniklého systému pohlavních chromozómů XY nedochází k rekombinaci (Kondo et al. 2009). Analogickou situaci lze předpokládat u determinanty pohlaví lososovitých ryb, která navíc mezidruhově mění pozici přeskokem (pravděpodobně procesem transpozice) na jiné vazebné skupiny (Phillips, 2013).

V oblasti se zamezenou nebo výrazně omezenou rekombinací se postupně hromadí bodové mutace a repetitivní sekvence, což má za následek genetickou degeneraci a také obvykle heterochromatinizaci částí pohlavního chromozómu. Suprese rekombinace, a tak i oblast diferenciaci, se postupně rozšiřují na obě strany od determinanty pohlaví a v pozdějších fázích může docházet vlivem amplifikace repetice nebo naopak delecí některých segmentů k morfologickému odlišení alozómu od svého homologa. V extrémním případě může alozóm „zdegenerovat“ na takovou úroveň, že ztratí i zcela zásadní úseky svého genetického obsahu (např. přímo determinantu pohlaví) a postupně zcela vymizí z populace. Pokud paralelně nevznikne jiný systém pohlavních chromozómů, vznikne odvozený systém X0 nebo Z0 (Marshall 2006, Bachtrog 2013, Schartl et al. 2016).

Proces diferenciaci pohlavních chromozómů/ degenerace alozómu nemusí nutně probíhat pouze výše popsáním způsobem a zároveň nemusí nutně znamenat, že evolučně starší pohlavní chromozómy budou více diferenciované než evolučně mladší systémy (přehled viz Kratochvíl et al. 2021). Např. pohlavní chromozómy čtverzubce rudoploutvého *Takifugu rubripes*, které jsou staré přibližně 5 milionů let, nenesou takřka žádné známky diferenciaci a zdá se, že jediný rozdíl mezi pohlavními chromozómy je jednonukleotidový polymorfismus (SNP; z angl. *single nucleotide polymorphism*) na ústřední determinantě určující samčí pohlaví (Kamiya et al. 2012). Pozoruhodně nízký stupeň diferenciaci vykazuje i systém ZW u jeseterů (Kuhl et al. 2021) a XY u štik (Pan et al. 2021).

Dalším případem, kdy evoluce gonozómů probíhá jinak než dle klasického modelu, je i přechod mezi pohlavními systémy, kterým lze vrátit proces degenerace alozómu zase na začátek a který může proběhnout různými mechanizmy. Jedním z nich je vznik nové determinanty pohlaví, a to konkrétně buď v rámci jiného chromozómového páru, jako bylo popsáno např. u dvou druhů medaky *O. marmoratus* a *O. profundicol*, (Myosho et al. 2015), nebo dokonce v rámci původního systému pohlavních chromozómů, jako se stalo u čtverzubce *T. niphobles* (Ieda et al. 2018), živorodky duhové *P. reticulata* (Charlesworth et al. 2021) nebo u platy skvrnitě *Xiphophorus maculatus* (Volf a Schartl 2001). Pozoruhodné příklady jsou známy i u jiných organismů jako např. u žab *Glandirana rugosa* a *Xenopus tropicalis* a dále u mouchy domácí *Musca domestica* (např. Furman et al. 2020b, Meisel 2020, Miura et al. 2022). Nová determinanta a/nebo systém pohlavních chromozómů mohou vzniknout např. následkem hybridizace jedinců stejného druhu z různých populací (skokani *G. rugosa*; Ogata et al. 2021), mezidruhovou hybridizací (plata *X. maculatus* a mečovka *X. helleri* – výsledek experimentálního křížení; Franchini et al. 2018) nebo introgresí (chromozóm Y u koljušky *Pungitius pungitius* vznikl z oblasti genomu, která je pozůstatkem dřívější hybridizace s druhem *P. sinensis*; Dixon et al. 2019).

Dalšími mechanizmy, jak může dojít k přechodu mezi systémy pohlavních chromozómů může být transpozice či translokace stávající ústřední determinanty pohlaví na jiný chromozóm (např. lososovitě ryby – viz výše v rámci této kapitoly) a vznik mnohočetných pohlavních chromozómů, ať už fúzí alozómu s autozómem (tzv. neopohlavní chromozómy) nebo rozpadem původních pohlavních chromozómů (Pennell et al. 2015, Sember et al. 2021).

Mezi skupiny s vůbec nejčastějšími dokumentovanými přechody mezi pohlavními chromozómy patří cichlidy z afrických jezer (Gammerdinger a Kocher 2018, El Taher et al. 2021), medaky (Myosho et al. 2015) a dále gekoni (Gamble et al. 2015) a skokanovitě žáby (Jeffries et al. 2018).

1.3 Pohlavní chromozómy ryb

Pohlavní chromozómy ryb jsou obecně považovány za evolučně „mladé“ a vyznačují se často nízkým stupněm genetické diferenciace, takže není jednoduché (a mnohdy je to přímo nemožné) odlišit tyto elementy na úrovni karyotypu (Mank a Avise 2009, Schartl et al. 2016, Sember et al. 2021). Nicméně vedle vyloženě mladých systémů jako jsou několik set tisíc let staré pohlavní chromozómy cichlid žijících v africkém jezeře Victoria (Gammerdinger a Kocher, 2018) nebo dlouhoocasky zelenavé *Eigenmannia virescens* (Henning et al. 2011) se

nacházejí u ryb i případy několik desítek milionů let starých gonozómů u jazykovce rodu *Cynoglossus* (Chen et al. 2014). Navíc, jak již popisují v předchozí kapitole, stupeň diferenciacce nemusí nutně u ryb korelovat s jejich stářím (Schartl et al. 2016, Kuhl et al. 2021, Pan et al. 2021, Sember et al. 2021). Různé systémy pohlavních chromozómů se mohou u ryb vyskytovat v rámci druhu nebo druhového komplexu (např. Cioffi et al. 2012, Glugoski et al. 2020). Do dnešního dne bylo u ryb nalezeno přes 500 případů pohlavních chromozómů spadajících do celkem devíti různých systémů (El Taher et al. 2021, Sember et al. 2021, Yano et al. 2021). Vedle standardních systémů ♀XX/♂XY a ♂ZZ/♀ZW a od nich odvozených systémů ♀XX/♂X0 a ♂ZZ/♀Z0 bylo dosud popsáno u ryb 78 případů systémů mnohočetných pohlavních chromozómů (tj. systémů s více než dvěma pohlavními chromozómy), které v drtivé většině případů vznikly opakovaně a nezávisle na sobě (Deon et al. 2020, Sember et al. 2021, Ferchaud et al. 2022). Dosud byly popsány tři typy systémů se samčí a dva typy se samičí heterogametii. Nejčastěji se vyskytuje systém ♀X₁X₁X₂X₂/♂X₁X₂Y (64 případů; Sember et al. 2021, Ferchaud et al. 2022), objevený např. u šesti druhů halančíků rodu *Nothobranchius* (Krysanov et al. 2016, Krysanov a Demidova 2018). Je to i nejčastější systém u jiných skupin živočichů a v drtivé většině případů vzniká fúzí původního chromozómu Y s autozómem (Pennell et al. 2015, Sember et al. 2021). V rámci ryb se jen v případě dvou sumců rodu *Harttia* uvažuje, že tento systém vznikl centrickým rozpadem původního chromozómu X (Sassi et al. 2020). Druhým systémem se samčí heterogametii je ♀XX/♂XY₁Y₂, jehož vznik může být důsledkem centrického rozpadu chromozómu Y nebo fúze chromozómu X s autozómem. Posledním mnohočetným systémem se samčí heterogametii je ♀X₁X₁X₂X₂/♂X₁Y₁X₂Y₂, u ryb dosud navrženým pouze u širokohlavce nautského *B. coracoideus* (Ferreira et al. 2016). Zbývající dva systémy se samičí heterogametii jsou ♂Z₁Z₁Z₂Z₂/♀Z₁Z₂W₁W₂ (např. u krunýřovce modrého *Ancistrus dolichopterus*; de Oliveira et al. 2008) a ♂ZZ/♀ZW₁W₂ (např. u polozubky laplatské *Apareiodon affinis*; Moreira-Filho et al. 1993).

1.4 Evoluce karyotypu ryb

Chromozómové přestavby mohou mít negativní dopad na životaschopnost nebo plodnost jedince (pokud proběhly v zárodečné linii) anebo mohou mít spojitost s nádorovým bujením (v rámci somatické tkáně) (Harewood a Fraser 2014, Raudsepp a Chowdhary 2016). Z evolučního hlediska jsou ale důležitou hybnou silou, která mění prostorové uspořádání vazebných skupin v jádře a má výrazný vliv na evoluci genů a jejich exprese (Meaburn et al. 2007, Cremer a Cremer 2010, Oudelaar a Higgs 2020) a také na reprodukční izolaci a

diverzifikaci druhů (Kitano et al. 2009, Wellenreuther a Bernatchez 2018, Damas et al. 2021). Současné modely předpokládají, že v oblasti přestavby u heterozygotů (inverze) nebo i homozygotů (fúze) nedochází k rekombinaci a tato oblast následně akumuluje genetické změny a rovněž drží pohromadě v těsné vazbě konkrétní alely sousedících genů.

Nejčastějším typem přestaveb popisovaných v evoluci různých skupin živočichů jsou chromozómové fúze, a to především centrické fúze, které bývají běžně souhrnně označovány jako Robertsonovy (Rb) translokace (sensu Robertson 1916) i přes určitou diverzitu v mechanismech jejich vzniku. Při Rb translokaci fúzují dva jednoramenné (akrocentrické či subtelocentrické) chromozómy v oblasti centromery a vzniká tak jeden velký dvouramenný (metacentrický nebo submetacentrický) chromozóm (přehled viz Schubert a Lysak 2011). Takovéto přestavby mohou být v populaci fixovány pozitivní selekcí (Guerrero a Kirkpatrick 2014, Liu et al. 2022; u ryb např. Kitano et al. 2009, Wellband et al. 2019), meiotickým tahem (přehled viz Clark a Akera 2021) nebo vlivem genetického driftu (King 1993, Nonaka et al. 2019, u ryb např. de Oliveira et al. 2018). Poslední uvedený mechanismus je často uvažovanou hybnou silou u řady druhů sladkovodních ryb, které žijí v izolovaných fragmentovaných populacích (např. Cioffi et al. 2012, Bartáková et al. 2015, do Nascimento et al. 2018).

Náchylnost k polyploidizacím a u řady skupin také vysoká četnost a dynamika chromozómových přestaveb měly u kostnatých ryb za následek vysoký rozsah diploidních počtů chromozómů ($2n = 12-446$; Arai 2011). Výrazné rozdíly se mohou vyskytovat i na úrovni blízkce příbuzných druhů (viz dále), různých populací toho samého druhu nebo i mezi jedinci stejné populace (Martins-Santos et al. 2005, Pazza et al. 2006, Prazdnikov et al. 2013, Porto et al. 2014, do Nascimento et al. 2018). To může naznačovat přítomnost kryptických druhů (Milhomem et al. 2008, Ferreira-Netto et al. 2012, Oliveira et al. 2016), nebo nejasnosti ve fylogenetických vztazích v rámci dané skupiny (např. Glugoski et al. 2020). Známý jsou ale také skupiny ryb s pestrou biologickou rozmanitostí druhů, ale s vysoce konzervovanými karyotypy (Barby et al. 2018, Motta-Neto et al. 2019).

Mezi typické rybí taxony, které mají v důsledku přestaveb značný rozsah $2n$, patří např. lososovité ryby (u nich je to vedlejší efekt re-diploidizačních procesů; Philips a Ráb 2001), zástupci antarktické nadčeledi Notothenoidei (např. Auvinet et al. 2020), neotropické drobnouštky rodu *Nannostomus* (Sember et al. 2020), řada sumcovitých ryb (Glugoski et al. 2020, Deon et al. 2020, 2022b) nebo afričtí halančící rodu *Nothobranchius* (Krysanov a Demidova 2018). Popsány byly i případy populačních polymorfizmů z hlediska přítomnosti homozygotů/heterozygotů pro centrickou fúzi, např. u lososovitých (Phillips a Ráb 2001), u některých zástupců čeledi Gobiidae (Ene 2003, Prazdnikov et al. 2013), jednoho druhu

jihoamerické cichlidy (Martins-Santos et al. 2012), asijské mřenky (Sember et al. 2015) a některých jihoamerických zástupců sumcovitých (např. Porto et al. 2014) a trnobříchých (např. Pazzo et al. 2006) ryb. Polymorfizmy fúzí nebo inverzí mají dokonce u některých ryb zřejmě adaptivní efekt, tj. polymorfizmus je udržován pod pozitivní selekcí (např. Berg et al. 2017, Wellband et al. 2019, Cayuela et al. 2020). Zajímavým příkladem jsou také dva druhy amazonských cichlid rodu *Symphysodon*, u kterých došlo zřejmě k mnohočetným translokacím, jak naznačuje přítomnost meiotického multivalentu skládajícího se ze 20 chromozómů (Gross et al. 2009).

1.5 Význam cytogenetiky při studiu biodiverzity a evoluce genomu ryb v době postgenomové

Přestože se v současné době klade důraz na využití nejmodernějších genomických, bioinformatických, transkriptomických a jiných metod a postupů, cytogenetika má stále své opodstatnění. Například bez předchozí analýzy karyotypu může dojít k různým typům mylných interpretací během sekvenování a skládání genomu daného jedince (který by poté navíc mohl představovat referenční genom pro všechny následné resekvenace). Jedinec by mohl např. být polyploidní, nést strukturní či numerické chromozómové anomálie, nadpočetné B chromozómy nebo velký počet genomicky hůře interpretovatelných (z hlediska počtu vazebných skupin) mikrochromozómů, nebo by to mohl být např. jedinec, který prodělal pohlavní zvrát (Deakin et al. 2019). Karyotypová analýza může také pomoci zhodnotit obsah repetitivní DNA v genomu, jejíž akumulace působí značné problémy při poskládání genomu (např. Peona et al. 2020). Řada současných genomických a bioinformatických přístupů navíc (na rozdíl od cytogenetiky) nedokáže rozlišit mezi standardními a mnohočetnými systémy pohlavních chromozómů – identifikují často pouze typ heterogametrie (přehled viz Palmer et al. 2019). A přitom znalost mechanismu vzniku pohlavních chromozómů je pro pochopení aspektů jejich evoluce zásadní. Vhodným příkladem je i příspěvek cytogenetiky pro ověření, že pohlavní determinanta u jedné populace jeskynní tetry *Astyanax mexicanus* se skutečně nachází na B chromozómu (Imarazene et al. 2021). V některých případech navíc cytogenetika přinesla prvotní vhled do pozoruhodných evolučních jevů jako je polyploidie a asexuální reprodukce – např. u sekaveců rodu *Cobitis* (Ráb a Slavík 1996).

Většina dosavadních cytogenetických studií u ryb (stejně jako u dalších nemodelových organismů) využívá mapování různých typů repetitivních sekvencí. Lze je vizualizovat standardním protokolem FISH, protože často vytvářejí akumulace na chromozómech. Mezi tyto

repetice patří multigenové rodiny jako jsou klastry genů pro ribozomální RNA (rDNA), konkrétně 5S a 45S rDNA, dále geny pro histony a malé jaderné RNA (snDNA) (Martins et al. 2011, Cioffi a Bertollo 2012, Gornung 2013, Sember et al. 2018a, Sochorová et al. 2018). Sekvence rDNA jsou navíc vysoce konzervované napříč druhy (Hillis a Dixon 1991) a proto lze aplikovat sondy připravené z jednoho druhu na různé taxony (Ráb et al. 1999, Silva et al. 2009). Mapování rDNA může pomoci odhalit homologní chromozómy v karyotypu (Cioffi et al. 2012) a dynamiku chromozómových přestaveb mezi druhy. Klastry rDNA se např. velice často vyskytují přímo v místech, kde došlo k chromozómové fúzi (Sember et al. 2015, 2020, Barros et al. 2017). Uplatňují se také při objevování kryptických druhů (které jsou obvykle morfologicky nerozlišitelné) nebo mezidruhových hybridů (Cioffi et al. 2012, Zhang et al. 2015, Goes et al. 2020). Distribuce rDNA může také sloužit jako cytotaxonomický marker, a to hlavně v případech, kdy chybí rozlišovací morfologické znaky, jako např. u krynýřovců rodu *Ancistrus* (Glugoski et al. 2020), nebo v případech, kdy se standardní karyotypy druhů v rámci dané taxonomické skupiny příliš neliší (Barby et al. 2018, Motta-Neto et al. 2019, Glugoski et al. 2020). V neposlední řadě byly klastry rDNA objeveny na pohlavních chromozómech celé řady ryb, např. na chromozómu W tetér rodu *Triportheus* (Yano et al. 2017) a pomohly také objasnit mechanismus vzniku pohlavních chromozómů u některých druhů, např. v případě mnohočetného systému pohlavních chromozómů ♀X₁X₁X₂X₂/♂X₁X₂Y u karyomorfy D trahira malabarského *Hoplias malabaricus* (Cioffi a Bertollo 2010). Dalším hojně využívaným markerem jsou telomerické tandemové repetice, u obratlovců konkrétně tvořené opakováním motivu (TTAGGG)_n. Díky nimž lze v některých případech odhalit stopy po dřívějších chromozómových přestavbách, pakliže tyto zachovaly telomerické sekvence v oblastech zlomu na chromozómu (Slijepcevic 1998, Ocalewicz 2013, Lysak et al. 2022). Dalšími studovanými tandemovými repeticemi jsou mikrosatelity a satelitní DNA (satDNA). Díky jejich rychlejší evoluci byla u ryb satDNA použita jako taxonomický marker (Marta et al. 2020) nebo poskytla informace o evoluci specializovaných chromozómů (Utsunomia et al. 2019, Serrano-Freitas et al. 2020). Z metodického hlediska je ale rychlá evoluce sekvencí satDNA nevýhodou, protože má za následek často druhově specifický soubor motivů a sekvenčních variant a liší se i jejich zastoupení v genomu. Je proto nutné tyto sekvence obvykle charakterizovat pro každý druh de novo (Garrido-Ramos 2017). Metoda využívající celochromozómových malovacích sond (tzv. WCP z angl. whole chromosome painting) se používá pro vizualizaci vybraných chromozómů a nalezení homologních částí genomů v rámci druhu (např. de Brito Ferreira et al. 2019) nebo mezi druhy (tzv. Zoo-FISH) (např. Vítková et al. 2007, Henning et al. 2008, de Oliveira et al. 2012). U ryb použití této metody pomohlo odhalit míru konzervované syntenie a strukturních

prestaveb mezi druhy, jako např. u paúhořovců rodu *Gymnotus* (Nagamachi et al. 2013). Dále může WCP a Zoo-FISH posloužit při studiu pohlavních chromozómů, kde tyto metody mohou odhalit společný původ pohlavních chromozómů v rámci souboru příbuzných druhů (Cioffi et al. 2017, Yano et al. 2017, de Barros et al. 2018) nebo naopak jejich nezávislý vývoj z jiných párů autozómů (Henning et al. 2008,2011, Cioffi et al. 2013, de Oliveira et al. 2018). Použití WCP také objasnilo evoluci a vznik mnohočetného systému ♀XX/♂XY₁Y₂ u sumecků rodu *Harttia* (Deon et al. 2022a) nebo systému ♀XX/♂X₁X₂Y u karyotypové formy trahira malabarského (Cioffi et al. 2013, de Oliveira et al. 2018). V neposlední řadě celochromozómové malování objasnilo původ B chromozómu u *A. scabripinnis* (Vicari et al. 2011). Další hojně využívanou molekulárně cytogenetickou metodou je komparativní genomová hybridizace (CGH z angl. *comparative genome hybridization*). Ta spočívá ve společné hybridizaci dvou sond připravených z genomové DNA dvou jedinců na chromozómy jednoho z těchto jedinců, přičemž každá sonda je značená jiným fluorochromem. Díky tomu lze vizualizovat úseky specifické jen pro daného jedince, což se projevuje absencí signálu jedné sondy. Toho se využívá hlavně při detekci mezidruhových hybridů (mapují se sondy dvou různých druhů) (např. Doležálková et al. 2016; u ryb Knytl et al. 2013) nebo při detekci pohlavních chromozómů (sondy jsou připravené z DNA samce a samice) (např. Traut et al. 1999, Symonová et al. 2015). Nevýhodou této metody je, že nedokáže takto odhalit pohlavní chromozómy, které od sebe ještě nejsou dostatečně diferenciované, jako např. u sekernatky mramorové *Carnegiella strigata* (Yano et al. 2021), a také že v případě pozitivního výsledku se nedozvíme nic konkrétního o typu repetitivních sekvencí, které akumulují v oblasti diferenciací. U ryb byla metoda CGH úspěšně použita např. pro identifikaci pohlavních chromozómů živorodky *P. reticulata* (Traut a Winking 2001) nebo několika druhů tetar rodu *Triportheus* (Yano et al. 2017) a zástupců příbuzných rodů (Yano et al. 2021) a některých karyotypových forem trahira malabarského (de Oliveira et al. 2018, Sember et al. 2018b). Pro studium pohlavních chromozómů je také důležitá analýza synaptonemálních komplexů, jejichž vizualizace (dnes převážně za pomoci imunodetekce zúčastněných proteinů) dokáže odhalit odchylky od standardního párování chromozómů (např. Carrasco et al. 1999, Traut a Winking 2001, Nanda et al. 2022, Nath et al. 2022).

1.5.1 Karyotypové charakteristiky neotropických ryb

Neotropickou sladkovodní ichtyofaunu tvoří více než 6200 druhů, což je přibližně polovina všech sladkovodních ryb na naší planetě (Dagosta a de Pinna 2019, Albert et al. 2020).

Druhová rozmanitost této oblasti je dána geologickou historií Jižní Ameriky, která větvila a fragmentovala vodní plochy, a dále také bohatostí ekologických nik (Reis et al. 2016, de Oliveira et al. 2020). Navíc se soudí, že jihoamerická rybí biodiverzita je ještě bohatější. Postupně se totiž přichází na to, že dosud známé druhy se skládají z více morfologicky nerozlišitelných kryptických druhů nebo tvoří druhové komplexy (Pereira et al. 2013, Ramirez et al. 2017). Kombinací moderních metod jako je DNA barcoding spolu s cytogenetickými metodami je možné identifikovat tuto skrytou diverzitu. U ryb byly takto objeveny např. různé karyomorfy (tj. karyotypové formy) anténovky *Imparfinis mirini* (Ferreira et al. 2014) nebo tetry *Astyanax fasciatus* (Ferreira-Netto et al. 2012). Neotropické ryby také vykazují neobvyklou rozmanitost systémů pohlavních chromozómů, což do jisté míry může souviset i s vysokou koncentrací cytogenetických laboratoří na tomto kontinentu, které se výzkumu ryb věnují. Popsány byly homomorfní (tj. morfologicky nerozlišitelné) i heteromorfní (tj. s cytologicky rozpoznatelnými rozdíly v morfologii) systémy pohlavních chromozómů (Cioffi et al. 2012, Sember et al. 2021).

Jako příklad využití cytogenetiky pro výzkum neotropických ryb mohou posloužit tetry rodu *Triporthus*. Tento rod sdílí pohlavní systém ♂ZZ/♀ZW, ale druhy se mezi sebou liší velikostí chromozómu W. Metody rDNA FISH, WCP a CGH odhalily, že tento systém má společný původ, avšak chromozóm W se liší v obsahu a počtu repetitivních sekvencí (Yano et al. 2016, 2017). Navazující studie zjistila, že systém ZW je sdílený dokonce mezi zástupci čeledí Triporthidae a Gasteropelecidae (tudíž se jeho stáří odhaduje na minimálně 40 milionů let), což je u ryb neobvyklé (Yano et al. 2021). Druhým příkladem je trahir *Hoplias malabaricus*, u kterého bylo objeveno celkem sedm karyomorf, z nichž pět zahrnuje jeden z následujících systémů pohlavních chromozómů: XY, X₁X₂Y nebo XY₁Y₂. Pomocí mapování repetitivní DNA a malovacích sond bylo postupně zjištěno, že tyto systémy vznikly v evoluci ze tří různých vazebných skupin reprezentujících systémy XY a ze dvou z nich následně vznikly mnohočetné pohlavní chromozómy tandemovou fúzí chromozómu Y a autozómu (Bertollo et al. 1997, Cioffi a Bertollo 2010, Cioffi et al. 2017, de Oliveira et al. 2018). CGH ukázala, že se pohlavní chromozómy liší mírou diference na úrovni akumulace repetitivní DNA (Sember et al. 2018a). Rozdíly v karyotypu a složení repetitivních sekvencí byly nalezené také např. u druhového komplexu *A. affinis* (do Nascimento 2018) nebo *B. coracoideus* (Ferreira et al. 2017).

1.6 Širokohlavci rodu *Bunocephalus*

Širokohlavci rodu *Bunocephalus* (řád Siluriformes, čeleď Aspredinidae) jsou drobní sladkovodní sumci obývající oblast od Amazonie až po povodí řeky Paraná. Jak už jejich české jméno napovídá, mají širokou hlavu, na kterou navazuje zeštíhlující se tělo (Obr. 1). Karyotypové charakteristiky zástupců z této čeledi nejsou dosud příliš probádané (doposud bylo karyotypováno jen osm druhů), ale již tyto data ukazují na velké rozpětí diploidního počtu chromozómů ($2n=24-74$) (Fenocchio a Swarca 2012, Ferreira et al. 2016, 2017, 2020). Do dnešního dne bylo u rodu *Bunocephalus* popsáno celkem 14 druhů, což z něj dělá nejpočetnější rod z čeledi Aspredinidae (Fricke et al. 2022). Tento počet ale bude pravděpodobně mnohem větší, protože např. druh *B. coracoideus* pravděpodobně představuje druhový komplex, v rámci něhož se jedinci liší v počtu chromozómů i distribuci repetitivních sekvencí (Ferreira et al. 2017, Ferreira et al. 2020). Důvodem této diverzity může být fragmentace vodních toků a geografické bariéry mezi jednotlivými populacemi, díky čemuž v těchto izolovaných populacích dochází snáze k fixacím genetických změn pomocí driftu. Podobné případy byly nalezeny také u dalších jihoamerických sumců, jako jsou anténovci rodu *Zungaro* (Pires et al. 2017) a rody *Harttia* (Deon et al. 2020) a *Rineloricaria* (Primo et al. 2017) z čeledi Loricariidae. Velkou diverzitu u sumců podtrhuje také skutečnost, že u nich bylo nalezeno celkem sedm různých systémů pohlavních chromozómů (příklady viz Takagui et al. 2017). U druhu *B. coracoideus* byl na základě cytogenetických výsledků navržen u ryb unikátní systém pohlavních chromozómů $\text{♀}X_1X_1X_2X_2/\text{♂}X_1Y_1X_2Y_2$, který ale dosud nebyl experimentálně potvrzen (Ferreira et al. 2016, 2017). Tento systém byl v rámci eukaryot doposud objeven pouze u jedné rostliny z čeledi hvozdíkovitých – *Silene diclinis* (Howell et al. 2009), jedné populace skokana hnědého *Rana temporaria* (Toups et al. 2019) a u vřešťanů rodu *Alouatta* (Steinberg et al. 2014). Ve všech třech případech se usuzuje, že tento systém vznikl reciprokou translokací mezi jedním z původních pohlavních chromozómů a autozómem, což Howell et al. (2009) podpořili u *Silene diclinis* pozorováním tetravalentu pohlavních chromozómů při meiotickém dělení. Stejný mechanismus byl navržen i pro vznik mnohočetných pohlavních chromozómů typu $\text{♀}X_1X_1X_2X_2X_3X_3/\text{♂}X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ u žáby *Odorrana swinhoana* (Miura et al. 2021). U *B. coracoideus* ovšem nejprve Ferreira et al. (2016) navrhli hypotézu, že systém $X_1Y_1X_2Y_2$ vznikl fúzí dvou chromozómů z párů 18 a 19 a následnou inverzí na jednom z chromozómů z páru 19 a později ten samý kolektiv autorů (Ferreira et al. 2017) navrhli jako další možnost vzniku tohoto systému křížení jedinců s různými karyotypy. Doposud byly u širokohlavců použity jen některé cytogenetické metody – vedle standardního karyotypování,

C-pruhování a analýzy meiotického dělení šlo o FISH se sondami pro rDNA a telomerický motif (Ferreira et al. 2016, 2017) Data získaná z těchto metod ale bohužel nepřinesla odpovědi na to, zda systém $X_1Y_1X_2Y_2$ u širokohlavců skutečně existuje a nebo se jedná pouze o vnitropopulační polymorfismus, který je výsledkem přestaveb zahrnujících autozomy. Minimálně u některých populací *B. coracoideus* systém $X_1Y_1X_2Y_2$ nebyl zaznamenán (Ferreira et al. 2017).

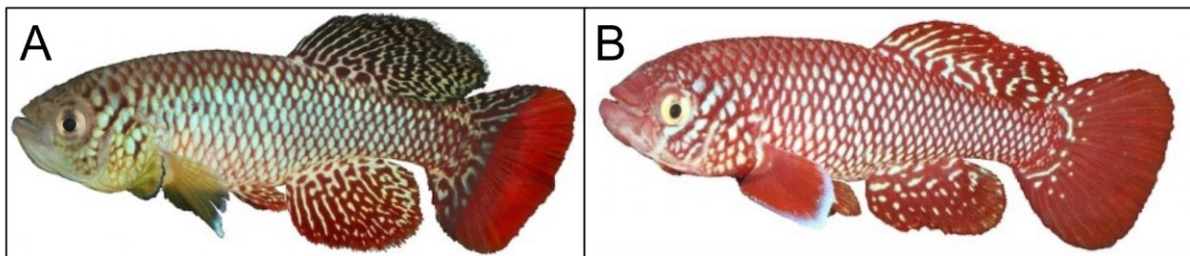


Obr. 1: Jedinec druhu *B. aloikae*. (foto bylo laskavě pořízeno RNDr. Jörgem Bohlenem, Ph.D.)

1.7 Halančici rodu *Nothobranchius*

Halančici rodu *Nothobranchius* (řád Cyprinodontiformes, čeleď Nothobranchiidae) jsou drobné sladkovodní ryby adaptované na značně nestabilní biotop malých vodních tůňích v savanách východní Afriky. Tento biotop opakovaně vzniká a zaniká v důsledku střídání období dešťů a sucha. Mezi hlavní adaptace halančičků patří diapauza, tj. dormantní stádium, ve kterém embrya přečkávají období sucha, zatímco celá populace dospělců pomře. Další důležitou adaptací je neobvykle rychlý vývoj, neboť se halančici musí vylíhnout, dospět a rozmnožit se v rámci několika málo (obvykle dvou až třech) měsíců, kdy je tůň zaplněná vodou (Cellerino et al. 2016, Furness 2016). Embrya se tedy začínají líhnout při kontaktu s vodou z prvních srážek období dešťů a např. *N. kadleci* (Reichard, 2010) (Obr. 2B) může dosáhnout dospělosti už za 17 dní svého života (Blažek et al. 2013). Pokud nepočítáme období diapauzy, mají halančici rodu *Nothobranchius* nejrychlejší dosud popsany životní cyklus ze všech obratlovců, spojený s rychlým růstem a brzkou pohlavní dospělostí (Furness 2016). Projevují se u nich navíc typické symptomy stárnutí, což z halančičků dělá ideální modelový organizmus i pro biomedicinský výzkum (Platzer a Englert 2016). Recentní studie u těchto ryb dále odhalily, že minimálně u několika druhů je jejich pohlaví determinováno pohlavními chromozómy se samčí heterogametii. Zatímco standardní systém $\text{♀XX}/\text{♂XY}$ u halančička tyrkysového *N. furzeri* (Jubb, 1971) (Obr. 2A) byl odhalen až na základě celogenomového sekvenování (Reichwald et al. 2015), cytogenetické metody odhalily u šesti dalších druhů systém mnohočetných pohlavních chromozómů typu $\text{♀X}_1\text{X}_1\text{X}_2\text{X}_2/\text{♂X}_1\text{X}_2\text{Y}$. Konkrétně se

jedná o: *N. guentherii*, *N. brieni*, *N. ditte*, *N. janpapi*, *N. lourensi* a *N. sp* z oblasti Kasenga (Ewulonu et al. 1985, Krysanov et al. 2016, Krysanov a Demidova 2018). Tento systém pohlavních chromozómů byl odhalen i u blízce příbuzného druhu *Fundulosoma thieryi* (Krysanov a Demidova 2018), který je významnou tzv. „outgroup“ skupinou (oddělil se od linie vedoucí k rodu *Nothobranchius*; van der Merwe et al. 2021). Druhy, u kterých byly pohlavní chromozómy nalezeny, nejsou v rámci fylogenetického stromu rodu *Nothobranchius* blízce příbuzné, což může naznačovat opakovaný nezávislý vznik mnohočetných pohlavních chromozómů. Tato hypotéza zatím nebyla ověřena empiricky. Na karyotypové úrovni bylo dosud analyzováno 65 druhů (Krysanov a Demidova 2018) a získaná data ukazují značnou variabilitu v počtu a morfologii chromozómů, a tedy vysoký počet chromozómových přestaveb, především centrických fúzí a rozpadů, v průběhu evoluce karyotypu halančiků. U drtivé většiny druhů však nebyla identifikována přítomnost heteromorfních pohlavních chromozómů (Krysanov a Demidova 2018). Doposud byly používány u halančiků hlavně genomické metody (celogenomové sekvenování) (Reichwald et al. 2015, Valenzano et al. 2015, Cui et al. 2019, Willemsen et al. 2020), zatímco cytogenetické metody zahrnovaly pouze standardní karyotypování (Ewulonu et al. 1985, Krysanov et al. 2016, Krysanov a Demidova 2018), některé pruhovací metody a mapování omezeného počtu repetitivních sekvencí (Reichwald et al. 2009).



Obr. 2: Samci rodu *Nothobranchius* – *N. furzeri* (A) a *N. kadleci* (B). (foto laskavě poskytnuto doc. RNDr. Martinem Reichardem Ph.D.).

2. Cíle práce

- 1) Zjistit úroveň diferenciace pohlavních chromozómů u různých populací *N. furzeri* a sesterského druhu *N. kadleci*
- 2) Zjistit způsob párování pohlavních chromozómů v meióze analýzou synaptonemálních komplexů u různých populací *N. furzeri* a sesterského druhu *N. kadleci*
- 3) Ověřit, zda by v evoluci pohlavních chromozómů *N. furzeri* mohla hrát úlohu pohlavně specifická distribuce rekombinace (tj. heterochiasmie)
- 4) Obvěřit možnou přítomnost mnohočetného systému pohlavních chromozómů $\text{♀}X_1X_1X_2X_2/\text{♂}X_1Y_1X_2Y_2$ a odhalit cytogenetické rozdíly mezi pohlavími u jedinců rodu *Bunocephalus*
- 5) Analyzovat dynamiku a mechanismy chromozómových přestaveb u jedinců rodu *Bunocephalus*

3. Materiál a Metody

3.1. Materiál

Ve své práci jsem studoval samce a samice tří populací druhu *N. furzeri*: NFU GRZ, NFU MZCS 121 a NFU MZCS-222 a samců dvou populací druhu *N. kadleci*: NKA MZCS-91 a NKA MZCS-430 a dále jsem studoval jedince rodu *Bunocephalus*. Jedince *N. furzeri* a *N. kadleci* nám laskavě poskytl doc. RNDr. Martin Reichard, Ph.D. (Ústav biologie obratlovců, AV ČR). Jedinci rodu *Bunocephalus* byli získáni přes velkodavatele akvarijních ryb Aquarium Glasser GmbH (Frankfurt) prostřednictvím Vivarium Mělník (Tomáš Kučera) a následně přeurčení pomocí fylogenetické analýzy (viz dále).

Všechny ryby byly chovány v akváriích o objemu 50 l při teplotě vody 26–27 °C a byly krmeny mraženými larvami pakomárů rodu *Chironomus*. S analyzovanými jedinci ryb se zacházelo dle evropských standardů v souladu s §17 zákona č. 246/1992 Sb. Na manipulování 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). Před přímými preparacemi byly ryby anestetovány smrtící dávkou 2-fenoxyetanolu (Sigma-Aldrich).

3.2. Metody

3.2.1. Příprava chromozómových suspenzí

Chromozómové suspenze byly připraveny přímými preparacemi z ledvin a gonád, které jsem prováděl za asistence zkušených kolegů Mgr. Tomáše Dvořáka a RNDr. Jörga Bohlena, Ph.D. Ledviny a gonády jsem po usmrcení ryb vypreparoval a přenesl na kovovou mřížku a zakápl je hypotonickým roztokem 0,075M chloridu draselného (KCl; Lach:ner). Pomocí pinzety jsem tkáň rozetřel a přenesl ji do 15ml kónické zkumavky a nechal roztok působit 10 minut (min). Zbylé orgány a tkáně (mozek, játra, sval) jsem prudce zmrazil v tekutém dusíku a uskladnil při teplotě -80 °C, případně jsem ploutve vložil do ethanolu a uskladnil při -20 °C. Po uplynutí 10 min jsem hypotonizaci ukončil přidáním 1-2 ml fixáže: methanol 99,99%: kyselina octová 99,8% (obojí Lach:ner) v poměru 3:1 (v/v). Zkumavku jsem promíchal a dal ji centrifugovat (10 min, 259 × g, 4 °C). Po skončení centrifugace jsem odsál supernatant tak, aby na dně trocha roztoku zůstala a přidal jsem čerstvě připravenou fixáž do objemu 5 ml. Po

promíchání jsem vzorky inkuboval v lednici (8 °C) po dobu 20 min. Následně jsem proces centrifugace, odsátí supernatantu a přidání čerstvé fixáže ještě dvakrát zopakoval. Na závěr jsem odsál potřebné množství fixáže s ohledem na množství přítomné tkáně tak, abych získal suspenzi o přiměřené hustotě buněk. Konečnou suspenzi jsem přenesl do 1,5ml zkumavky a skladoval při -20 °C.

3.2.2 Příprava chromozómových preparátů pro metody FISH

Podložní skla jsem nejprve očistil ponořením do 96% ethanolu (10 min) při pokojové teplotě (RT, z angl. room temperature). Chromozómové suspenze připravené v kapitole 2.2.1. jsem nakapal (jedna kapka = 10-15 µl suspenze) na podložní sklo na vytemperované histologické ploténce (60 °C), dle metody popsané Bertollem et al. (2015). V případě více koncentrovaných suspenzí jsem na preparát aplikoval ještě ještě 10 µl čerstvého fixativa.

Kvalitu preparátů ve smyslu hustoty a rozptřeni jader a chromozómů jsem průběžně kontroloval pod fázovým kontrastem ve světelném mikroskopu (Olympus BX53) a vybraná skla jsem odvodnil v ethanolové řadě (70%, 80%, 96%, inkubace po 2 minutách) a skladoval při -35 °C. Pro analýzu v mikroskopu (ZEISS Axio Imager Z2), který byl vybavený platformou pro automatické hledání metafázi (Metafer-MSearch), byla část preparátů obarvena 5% roztokem Giemsa-Romanowski ve fosfátovém pufru (pH 6,8) (Dr. Kulich), který se nechal působit 10 min při RT.

3.2.3 Izolace genomové DNA

Pro účely fylogenetické analýzy, přípravy hybridizačních sond a kompetitivní DNA jsem izoloval genomovou DNA pomocí izolační soupravy MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen), která využívá magnetických kuliček, a soupravy Qiagen DNAeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). U obou kitů jsem postupoval podle instrukcí výrobce, pouze v případě soupravy s magnetickými kuličkami musela být kvůli vysoké hustotě buněk z izolovaných tkání zdvojnásobena množství všech roztoků vyjma elučního pufru, jehož množství se neměnilo (100 µl na každou eluci), a v případě kitu DNAeasy Blood & Tissue byl konečný objem elučního pufru poloviční (100 µl). Kvalitu získané DNA jsem ověřil pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu a změřil její koncentraci pomocí fluorometru Qubit (Invitrogen).

3.2.4 Příprava kompetitivní DNA

Kompetitivní DNA, která je potřebná pro přípravu sond pro celochromozómové malování (WCP) a pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH), slouží k vyvážení repetice s vysokým množstevním zastoupením v genomu, které jsou tím pádem přítomny i v sondě a jejich hybridizace na chromozómy pak znesnadňuje vyhodnocení hybridizačních vzorů. Kompetitivní DNA jsem připravoval z celogenomové DNA izolované kitem MagAttract HMW DNA Kit (viz výše) ze samců *B. aloikae* (pro WCP a CGH na samičích sklech) a samic *B. aloikae* (pro CGH na samičích sklech) a všech populací samic *N. furzeri* a *N. kadleci* (pro CGH na samčích sklech). Kompetitivní DNA byla připravena metodou polymerázové řetězové reakce s degenerovanými primery (DOP PCR z angl. *degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction*) dle protokolu Yang et al. (2009). Tato PCR probíhá ve dvou kolech (termální profily viz Tab. 1 a 2; sekvence primeru 5' - CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G -3'), jedna reakce PCR o objemu 50 μ l pro první kolo obsahovala 25 μ l ultračisté vody PCR Ultra H₂O (dále v textu již jen „ultračisté vody“; Top Bio), 5 μ l PCR pufru neobsahujícího kationty Mg₂₊ (Top Bio), 5 μ l nukleotidového mixu (koncentrace každého nukleotidu 2,5 mM), 5 μ l MgCl₂ (25 mM; Top Bio), 10 μ l DOP primeru (10 μ M), 0,5 μ l Taq polymerázy Unis (Top Bio) a 100 ng celogenomové DNA. Nukleotidový mix byl složený z 10 mM nukleotidů dATP, dGTP, dCTP a dTTP smíchaných v poměru 1:1:1:1. Uvedené jsou (i dále v textu, pokud není uvedeno jinak) výchozí koncentrace složek před smícháním. Délkový rozsah fragmentů jsem poté ověřil pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu.

Sekundární DOP PCR jsem namíchal až na zdroj templátové DNA ze stejných chemikálií o stejných koncentracích jako předchozí reakci. Na jednu reakci (50 μ l) směs obsahovala 31 μ l ultračisté vody, 3 μ l PCR pufru bez MgCl₂, 5 μ l nukleotidového mixu, 5 μ l MgCl₂, 2,5 μ l DOP primeru, 0,5 μ l Taq polymerázy a 2 μ l produktu amplifikační reakce z prvního kola. Po druhém kole PCR jsem opět ověřil délku fragmentů pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu. Každý vzorek kompetitivní DNA jsem připravoval ve větším objemu, který odpovídal násobkům dílčí 50 μ l reakce. Produkty amplifikační reakce jsem po elektroforetickém ověření sloučil do jedné zkumavky a snížil objem na vakuové odparce na cca 100 μ l. Poté jsem změřil koncentraci výsledného produktu pomocí fluorometru Qubit (Invitrogen).

Tab. 1: Termální profil primární reakce DOP PCR

PCR krok	DOP PCR 1. reakce
Počáteční denaturace	95 °C / 5 min
a. Denaturace 1	92 °C / 1 min
b. Nasedání primerů 1	30 °C / 1 min 30 s
c. Elongace 1	72 °C / 2 min
d. Denaturace 2	92 °C / 1 min
e. Nasedání primerů 2	62 °C / 1 min 30 s
f. Elongace 2	72 °C / 2 min
g. Závěrečná elongace	5 min
Počet opakování cyklu a.-c.	8×
Počet opakování cyklu d.-f.	25×

Tab. 2: Termální profil sekundární reakce DOP PCR

PCR krok	DOP PCR 2. reakce
a. Denaturace	92 °C / 1 min
b. Nasedání primerů	56 °C / 2 min
c. Elongace	72 °C / 2 min
d. Závěrečná elongace	5 min
Počet opakování cyklu a.-c.	32×

3.2.5 Příprava sond

Namíchané sondy spolu s kompetitivní DNA (specifické složení pro každou metodu viz níže) jsem vysrážel přidáním 3M acetátu sodného v množství 0,1× objem sondy a 96% vymraženého ethanolu (2,5× objem sondy) sondy a tuto směs jsem poté uložil minimálně přes noc na -20 °C, aby se efektivně vysrážela DNA. Následně jsem vzorky centrifugoval (18 600 × g, 4 °C) po dobu 25 min, odsál supernatant a přidal 700 µl vymraženého 70% ethanolu za účelem odmytí acetátu sodného z DNA a vzorky jsem opět centrifugoval (16 000 × g, 4 °C), tentokrát po dobu 17 min. Opět jsem odsál supernatant a nechal ethanol zcela vypařit. Výsledný pelet jsem poté rozpouštěl v hybridizačním mixu (složení a konečné koncentrace složek: 50% formamid, 10% dextran sulfát, 2× SSC, 0.04M pufr NaPO₄ pufr, 0.1% SDS, Denhardtovo činidlo). Pro WCP jsem ve 14 µl hybridizačního mixu takto rozpustil jen samotnou kompetitivní DNA (7,5 µg) spolu s tRNA z *Escherichia coli* (11 µg; Merck), která slouží jako nosič pro efektivnější vysrážení DNA. Pelet jsem následně rozpouštěl 2-4 h v termobloku (37 °C, 400–500 rpm). Značenou sondu jsem přidal až později (viz kapitola 3.2.5.1)

3.2.5.1 Chromozómové malovací sondy (WCP)

Základní analýza karyotypů u širokohlavců poukázala na vhodné cíle pro přípravu malovacích sond. Jednalo se o samčí meiotický tetravalent u samce BAL ♂4 a v rámci mitotických metafází toho samého samce dále jeden velký metacentrický chromozóm, který

evidentně postrádal homologa. Příprava preparátů pro mikrodisekci probíhala standardním způsobem (popsaném v kapitole 3.2.2). Suspenze se ale tentokrát nanášela nikoliv na podložní sklíčka, nýbrž na sklíčka krycí (22 × 60 mm). Preparáty jsem následně obarvil 5% roztokem Giemsa-Romanowski (viz kapitola 3.2.2). Díky spolupráci s týmem Dr. Thomase Liehra (Jena University Hospital Institute of Human Genetics, Německo) byly za asistence mého školitele z těchto skel vybrané cíle mikrodisekovány Dr. Ahmedem Al-Rikabim pomocí skleněné kapiláry připevněné na mechanický manipulátor pod invertovaným mikroskopem (Zeiss Axiovert 135) (detaily metody viz Al-Rikabi et al. 2020). Cíle byly mikrodisekovány v deseti kopiích. Mikrodisekované chromozómy byly poté amplifikovány dvěma koly DOP-PCR dle protokolu Yang et al. (2009). 1 µl produktu byl poté použit pro značící DOP-PCR se SpectrumOrange-dUTP nebo SpectrumGreen-dUTP (Vysis). Sondy připravil v obou variantách fluorochromů Ahmed Al-Rikabi.

Na přípravu výsledného hybridizačního mixu pro WCP jsem na jedno sklo použil 100 ng každé ze dvou vybraných malovacích sond, 7,5 µg kompetitivní DNA a 11 µg tRNA, které jsem společně nechal promíchat na termobloku po dobu 1 h (37 °C, 400-500 rpm).

3.2.5.2 Celogenomové sondy pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH)

Pro přípravu celogenomových sond jsem použil DNA získanou v kapitole 3.2.3. Pro přípravu sondy na jedno sklo bylo použito 500 ng DNA z obou pohlaví, které jsem označil nick translací (česky též „posun zlomu“) soupravami pro přímé značení Fluorescein NT Labeling Kit nebo Cy3 NT Labeling Kit (Jena Bioscience). Fluorescein-dUTP byl použit pro samičí pohlaví a Cy3-dUTP pro značení samčího pohlaví. Nick translační reakci jsem míchal jinak, než je uvedeno v protokolu výrobce. Cílem bylo více naředit enzymovou směs, která naše vzorky fragmentovala příliš rychle. Pro naznačení 500 ng DNA daného samčího nebo samičího vzorku 1 µl nick translačního pufru (10× NT labeling buffer), 1 µl fluorescenčního mixu (Fluorescein nebo Cy3), 0,9 µl enzymového mixu a reakci jsem doplnil ultračistou vodou (Top Bio) do celkového objemu 14 µl. Směs jsem poté inkuboval při 15 °C po dobu 30 min a reakci jsem poté ukončil přidáním 2,5 µl tzv. stop pufru. Délkový rozsah značených fragmentů (optimálně 200-500 bp) jsem nakonec ověřil pomocí elektroforézy. Poté jsem smíchal 500 ng samčí DNA značené Cy3 a 500 ng samičí DNA značené fluoresceinem a přidal jsem 10 µg kompetitivní DNA a 25 µg sonikované DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich), která funguje jako nespecifická kompetitivní DNA. Tuto směs jsem poté vysrážel stejně jako kompetitivní DNA v kapitole 3.2.4 a rozpustil ve 20 µl hybridizačního mixu.

3.2.5.3 Sonda pro 18S rDNA FISH

Fragment 18S rDNA jsem získal pomocí reakce PCR (termální profil reakce viz Tab. 3, sekvence primerů: forward 5'- CCGAGGACCTCACTAAACCA -3', reverse 5'- CCGCTTTGGTGACTCTTGAT -3'), ve které byl templátovou DNA zaklonovaný fragment 18S rDNA z druhu *N. guentheri*. Sonda byla připravena kolegy z týmu pro účely paralelních experimentů (viz Lukšíková 2021). Klonování prováděla laborantka Petra Šejnohová. Produkt amplifikační reakce jsem ověřil pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu a následně přečistil soupravou NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel GmpH) podle návodu výrobce. Nakonec jsem změřil koncentraci čistého produktu na fluorometru Qubit.

Pro sondu na jedno sklo jsem použil 250 ng 18S rDNA, kterou jsem označil nick translací pomocí soupravy Nick Translation kit (Abbott Molecular). Reakci jsem míchal obvykle pro více preparátů najednou. Pro zjednodušení zde uvádím složení reakční směsi na 500 ng DNA: 2,5 µl nukleotidového mixu, 2,5 µl NT pufru, 5 µl enzymového mixu (DNA polymeráza I a Dnáza I), templátové DNA a směs jsem doplnil ultračistou vodou (Top Bio) do konečného objemu 25 µl. Nukleotidový mix pro nick translaci se připravoval v alikvotech po 50 µl o složení: 5 µl dATP, 5 µl dGTP, 5 µl dCTP, 3,4 µl dTTP (všechny o koncentraci 2,5 mM) a 4 µl dUTP konjugovaného s biotinem (biotin-16-dUTP; Roche) a směs byla doplněna do 50 µl ultračistou vodou (Top Bio). Nick translace probíhala při 15 °C po dobu 1,5-2 h (v závislosti na konkrétním vzorku a především na stáří alikvotu enzymového mixu). Výsledek reakce jsem ověřil pomocí elektroforézy a reakci zastavil přidáním 2 µl EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina; pH 8.0) a inkubováním při 65 °C po dobu 10 min. K této směsi jsem poté přidal 12,5 µg DNA z lososích spermií a celý mix jsem poté vysrážel stejným způsobem, jako je uvedeno v kapitole 3.2.4. Pelet jsem rozpustil ve 30 µl hybridizačního mixu (15 µl na jedno sklo).

Tab. 3: Termální profil pro amplifikaci 18S rDNA

PCR krok	18S rDNA
Počáteční denaturace	95 °C / 5 min
a. Denaturace	95 °C / 1 min
b. Nasedání primerů	60 °C / 1 min
c. Elongace	72 °C / 1 min 30 s
d. Závěrečná elongace	10 min
Počet opakování cyklu a.-c.	35×

3.2.6. Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

3.2.6.1 Mapování 18S rDNA

Základem metody FISH a jejích modifikací (CGH, WCP) je hybridizace fluorescenčně značených sond na úseky chromozómové DNA, které jsou k nim komplementární. Metodu FISH jsem prováděl dle protokolu popsaného v práci Sember et al. (2015) s mírnými úpravami. Alespoň 2 h před samotným počátkem FISH (nejlépe přes noc) jsem preparáty odvodnil v ethanolové řadě (70%, 80%, 96%, po 2 min) a nechal je inkubovat při 37 °C, aby chromozómy lépe přilnuly na preparát (tomuto kroku se říká tzv. „aging“, česky též „stárnutí“ skel). Pro ještě lepší přilnavost chromozómového materiálu k preparátu a jeho odolnosti vůči pozdějšímu působení pepsinu (viz dále) jsem skla dále inkuboval na histologické ploténce (60 °C, 1 hod). Následně jsem preparáty opláchl v kyvetě s 2× SSC (5 min, RT), přenesl na každé sklo 500 µl RNázy A (Sigma-Aldrich; 200 ng/µl ve 2× SSC), překryl krycím sklem (22 × 60 mm) a inkuboval při 37 °C ve vlhké komůrce (70 min). Poté jsem preparáty opět opláchl v kyvetě s 2× SSC (RT, 1 min) a odvodnil v ethanolové řadě. Skla jsem po oschnutí vložil do 1× PBS (RT, 5 min) a poté je přemístil do kyvety s pepsinem (Chemos CZ) v H₂O okyselené 1N HCl (Lach:ner) (pro stimulaci aktivity pepsin). Konečná koncentrace pepsinu byla 0,05 µg/µl a preparáty jsem v tomto roztoku inkuboval 3 min při teplotě 37 °C ve vodní lázni. Po pepsinizaci jsem skla opláchl v 1× PBS (RT, 1 min) a odvodnil v ethanolové řadě. Díky působení RNázy a pepsinu došlo k odstranění cytoplazmy a RNA z preparátů, které by mohly vytvářet nespecifické signály na pozadí či omezit nasedání sondy na chromozómy. V následném kroku jsem denaturoval chromozómy v 75% formamidu (72 °C, 3 min) a poté je ihned zchladil ve vymraženém 70% ethanolu (3 min), aby nedošlo ke zpětné renaturaci chromozómů, a následně jsem dokončil odvodnění v ethanolové řadě (80%, 90%, po 3 min). V průběhu denaturace preparátů jsem rovněž denaturoval sondu (86 °C, 6 min), kterou jsem dal poté zchladit na led (alespoň na 10 min), opět za účelem zamezit renaturaci DNA. Pak jsem na preparáty aplikoval sondu (15 µl na sklo) a přikryl krycím sklem (24 × 50 mm). Abych zabránil vysychání sondy, mezery na okrajích mezi krycím a podložním sklem jsem zacelil pomocí Rubber cementu (Marabu). Skla jsem inkuboval ve vlhké komůrce (37 °C) do druhého dne.

Druhý den jsem nejprve odstranil Rubber cement. Pro odstranění nespecifických signálů jsem preparáty značené biotinem nebo digoxigeninem nejdříve krátce opláchl v 4× SSC/0,1% Tween-20 (RT, 1 min) a následně jsem skla promýval třepáním ve dvou kyvetách s 50% formamidem ve 2× SSC (obě 42 °C, 140 rpm, po 10 min). Preparáty jsem poté inkuboval ve

třech kyvetách s 1× SSC (42 °C, 140 rpm, po 7 min) a pak je krátce opláchl ve 2× SSC (RT, 1 min). Na každé sklo jsem následně přenesl 500 µl 3% BSA (z angl. *bovine serum albumin*; Vector Labs) ve 4× SSC/0,01% Tween-20, překryl jej krycím sklem (22 × 60 mm) a nechal inkubovat ve vlhké komůrce (37 °C, 20 min). BSA pomáhá vysytit nespecifická vazebná místa pro nasedání protilátek. Dále jsem připravil detekční mix: na jedno sklo jsem smíchal 2 µl Streptavidin-Cy3 (Invitrogen Life Technologies), který jsem zředil v 10% GNS/PBS v poměru 1:100 a naněs celou směs na preparát. Skla jsem následně překryl krycím sklem (24 x 60 mm) a nechal je inkubovat ve vlhké komůrce (37 °C, 70 min). Po skončení inkubace jsem opatrně odstranil krycí skla a nenávané protilátky odmyl postupně ve čtyřech kyvetách s 4× SSC/0,1% Tween-20 (42 °C, 140 rpm, 7 min každá). Poté jsem skla opláchl v destilované vodě (RT, 1 min) a následně jsem na každý preparát aplikoval 20 µl montovacího média s DAPI o koncentraci 1.5 µg/ml (Cambio), překryl ho krycím sklem (24 x 50 mm) a okraje preparátu jsem následně zalakoval.

3.2.6.3 Mapování telomerických repetice

Telomerické tandemové repetice jsem detekoval pomocí soupravy Telomere PNA FISH Kit/Cy3 (Dako) dle návodu výrobce s jedinou úpravou, kdy jsem prodloužil dobu hybridizace z 30 min na 1,5 h. Sonda PNA (z angl. *peptide nucleic acid*) je stabilnější než standardní hybridizační sondy a lépe hybridizuje, jelikož má v kostře polymeru fosfát nahrazený cukrem, díky čemuž postrádá záporný náboj.

3.2.6.3 Hybridizace celochromozómových sond (WCP)

Celochromozómové malování umožňuje lokalizovat vybrané chromozómy v metafázi a zjistit homologii těchto chromozómů mezi druhy nebo populacemi stejného druhu. Samotný protokol této metody se první den moc neliší od protokolu 18S rDNA FISH popsaného výše. Jediná změna je, že preparáty jsem po pepsinizacióni navíc ještě inkuboval v 1% formaldehydu (RT, 10 min), abych zajistil lepší stabilizaci chromatinu (1% formaldehyd obsahoval 1350 µl zásobního 36 – 38% formaldehydu, 125 µl MgCl₂ a nakonec byl doplněn PBS do konečného objemu 50 ml). Hybridizaci sondy na preparáty jsem prodloužil z jednoho na tři dny.

Jelikož malovací sondy byly značeny fluorochromem a nikoliv biotinem jako v případě 18S rDNA FISH, post-hybridizační odmyváání nespecifických signálů jsem provedl podle protokolu Yano et al. (2017). Z preparátů jsem odstranil Rubber cement a krátce je opláchl v 1× SSC (RT, 1 min). Poté jsem odmyval sondu ve dvou kyvetách s 1× SSC (65 °C, 140 rpm, 5 min v každé). Následně jsem preparáty promýval v kyvetě se 4× SSC/0,1% Tween-20 (42 °C,

140 rpm, 5 min) a poté je vložil do 1× PBS (RT, 1 min, ruční třepání). Preparáty jsem následně odvodnil ethanolovou řadou po 2 minutách. Preparáty jsem nechal oschnout a nanesl na každý z nich 20 µl montovacího média s DAPI o koncentraci 1.5 µg/ml (Cambio). Preparáty jsem následně zalakoval.

3.2.6.4 Průběh komparativní genomové hybridizace (CGH)

Principem CGH je společná hybridizace celogenomových sond připravených ze dvou zdrojů – v mém typu experimentu se jedná o sondy obou pohlaví v rámci druhu a u halančíků i v rámci každé populace. Obě sondy jsou značeny jiným fluorochromem a hybridizace probíhá na chromozómech heterogametického pohlaví (nebo obou pohlaví, pokud není o pohlavních chromozómech nic známo). Pozitivním výsledkem by mělo být odhalení oblasti na alozómu, která akumuluje pohlavně-specifické nebo obohacené repetice (tj. bude značena výhradně nebo převážně jednou genomovou sondou). Tímto způsobem můžeme odhalit přítomnost a do jisté míry i rozsah úseku diferenciacce pohlavních chromozómů. Samotný průběh CGH je shodný s protokolem pro WCP (viz výše).

3.2.7 Příprava preparátů pro imunodetekci

Ryba byla usmrcena a vypitvána stejně jako v kapitole 3.2.1. Pro získání pachytenních chromozómů jsem gonády nejprve vložil do vychlazeného PBS a odstříhl z nich asi 1 mm tkáně. Tuto tkáň jsem poté pomocí dvou špičatých pinzet rozmělnil ve skle s jamkou obsahující vychlazené 1× PBS (400-600 µl v závislosti na velikosti gonády).

Pro přípravu preparátů ze samčích gonád jsem postupoval dle protokolů Moens et al. (2006) a Kochakpour a Moens (2008) s drobnými úpravami. Nejprve jsem na jedno podložní sklo (vychlazené na 10 °C) napipetoval osm oddělených kapek (každá o objemu 30 µl) vychlazeného hypotonického roztoku (PBS:H₂O v poměru 1:2). Do každé kapky jsem následně přidal 1 µl suspenze z gonád a nechal vše hypotonizovat ve vlhké komůrce s destilovanou vodou v lednici (10 °C, 20 min), aby se chromozómy/bivalenty dobře rozprostřely. Následně jsem na každý preparát nanesl 500 µl vychlazeného 2% paraformaldehydu (aby došlo k fixaci materiálu na povrch skla) a nechal ho působit 3 min.

Pro přípravu preparátů ze samičích gonád jsem postupoval dle protokolu Araya-Jaime et al. (2015) s drobnými úpravami. Na jedno sklo jsem aplikoval 20 µl suspenze a zakápl ji 40 µl 0.2M roztoku sacharózy a 40 µl 0.2% Tritonu X-100. Vše jsem nechal inkubovat ve vlhké

komůrce po dobu 7 min při RT. Následně jsem materiál fixoval na povrch skla po dobu 16 min přidáním 500 μ l 2% paraformaldehydu.

Poté jsem preparáty obou pohlaví vložil do kyvety s destilovanou vodou (RT, 1 min), abych odmyl paraformaldehyd, a nechal je oschnout na vzduchu. Suchá skla jsem buď skladoval v -35 °C, nebo jsem na ně rovnou aplikoval protilátky (viz další kapitola).

3.2.8 Imunodetekce synaptonemálních komplexů

Imunodetekce sloužila k vizualizaci synaptonemálních komplexů, které vznikají v profázi I během leptotene a zanikají až v diplotene (jednotlivá stadia jsou charakteristická svou morfologií; kompletního párování homologů do bivalentu je dosaženo v pachytene; Alavattam et al. 2018). Na preparáty připravené v předchozím kroku jsem nanášel komerčně prodávané protilátky, konkrétně proti proteinu SYCP3 (z angl. *synaptonemal complex protein 3*), který se váže na laterální elementy synaptonemálních komplexů a proti MLH1 (z angl. *MutL homolog 1*), které se nacházejí v místech, kde proběhl crossing-over. Nejprve jsem preparáty připravené v předchozím kroku vložil do kyvety se 4 \times SSC/0,1% Tween-20 (RT, 10 min). Poté jsem na skla aplikoval 100 μ l blokovacího roztoku (3% BSA) rozpuštěné v 0.05% Triton X-100/PBS), abych vysytil místa, kde může docházet k nespecifickému nasedání protilátek a překryl je krycím sklem. Preparáty jsem poté inkuboval ve vlhké komůrce s destilovanou vodou (RT, 30 min). Následně jsem si připravil roztoky s primárními protilátkami: na jedno sklo jsem aplikoval 100 μ l roztoku obsahujícího 0,33 μ l rabbit anti-SYCP3 (Abcam, RRID: AB_301639) a 2 μ l mouse anti-MLH1 (Abcam, RRID: AB_300987) smíchané s 97,66 μ l 3% BSA rozpuštěném v 0.05% Triton X-100/PBS. Takto připravený roztok jsem nanesl na preparáty, překryl krycím sklem a přes noc nechal hybridizovat ve vlhké komůrce při 4 °C. Druhý den jsem odstranil krycí skla a z preparátů odmyl přebytečné protilátky třepáním v kyvetách s PBS (RT, 145 rpm, 3 \times 5 min). Následně jsem připravil detekční směs sekundárních protilátek: na jedno sklo jsem nanášel 100 μ l roztoku, který obsahoval 2 μ l Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit Alexa 488 (1:300; Abcam; RRID: AB_2630356) a 2 μ l Alexa Fluor 594 goat anti-mouse Alexa 555 (1:100; Abcam; RRID: AB_2687594) smíchané s 96 μ l 3% BSA rozpuštěném v 0.05% Triton X-100/PBS. Preparáty jsem poté překryl krycím sklem a nechal je inkubovat ve vlhké komůrce (RT, 4 hod). Po skončení inkubace jsem odstranil krycí skla a odmyl přebytečné protilátky třepáním v kyvetách s 0,1% Tween-20 rozpuštěném v PBS (RT, 145 rpm, 3 \times 5min). Následně jsem skla opláchl destilovanou vodou a odvodnil je v ethanolové řadě (70 %, 80%, 96% po 2 min). Po oschnutí jsem na každý preparát nanesl 20 μ l montovacího média s DAPI o

koncentraci 1.5 µg/ml (Cambio), překryl ho krycím sklem (24 × 50 mm) a okraje preparátu jsem následně zalakoval.

3.2.9 Recyklace skel po imunodetekci

V některých případech jsem použil preparát po imunodetekci na metodu FISH. V takovém případě jsem nejprve preparáty nechal 20 min v kyvetě s destilovanou vodou, aby se odmočil lak na krycím skle. Ten jsem poté opatrně odstranil pomocí skalpelu. Poté jsem preparáty inkuboval v kyvetě s 4× SSC/0,1% Tween-20 (5 min, RT) a pak odstranil krycí skla. Následně jsem preparáty promýval ve dvou kyvetách s 4× SSC/0,1% Tween-20 (37 °C, 125 rpm, po 10 min). Cílem bylo odstranit DAPI, ale zároveň neodmýt SYCP3, aby bylo možné sledovat hybridizační sondy na synaptonemálních komplexech. Po odmývacích krocích jsem ještě preparáty odvodnil v ethanolové řadě po 3 minutách, aby se synaptonemální komplexy lépe zafixovaly na povrch skla a nechal je oschnout. Preparáty jsem poté denaturoval v 75% formamidu (72 °C, 3 min) a dále pokračoval dle příslušného protokolu FISH (viz výše).

3.2.10 Recyklace skel po metodě FISH

Některé preparáty jsem využil pro více následných protokolů FISH. Recyklace skel probíhala zpočátku podobným způsobem jako je uvedeno v předchozí kapitole. Po odstranění laku jsem skla promýval ve dvou kyvetách s 4× SSC/0,1% Tween-20 (30 min, 37 °C, třepačka 130 rpm), kdy jsem před přendáním do druhé kyvety opatrně odstranil krycí sklo. Poté jsem preparáty odvodnil v ethanolové řadě po 2 minutách a přemístil je do kyvety s fixativem (30 min, RT). Dále jsem skla inkuboval 2 h v termostatu (37 °C) a po inkubaci jsem skla vložil do kyvety s 1× PBS (5 min, RT). Následně jsem skla přemístil do kyvety s 1% formaldehydem (příprava viz kapitola 3.2.6.3) na 5 min při RT. Nakonec jsem preparáty opět přemístil do PBS (5 min, RT) a odvodnil v ethanolové řadě po 2 minutách. Poté jsem pokračoval příslušným navazujícím protokolem FISH.

3.2.11 Vyhodnocení preparátů

Všechny preparáty s aplikovanými fluorescenčními sondami nebo protilátkami jsem prohlížel na fluorescenčním mikroskopu BX63 Olympus. Snímky vybraných metafází a synaptonemálních komplexů jsem fotil pod 1000x zvětšením pomocí digitální kamery Black and white CCD camera (DP30W Olympus). Černobílým snímkům jsem poté přiřadil pseudobarvy a jednotlivé barevné kanály byly spojeny v programech DP manager (Olympus) a ImageJ 1.52 (<https://imagej.nih.gov/ij>). Spojené snímky jsem upravil v programu Adobe

Photoshop CS6. Ze snímků pořízených platformou Metafer a vyfocených pod 1000× zvětšením pomocí digitální kamery CoolCube 1 b/w (MetaSystems) jsem sestavil karyotypy v programu Ikaros (MetaSystems). Diploidní počet chromozómů jsem ověřil pomocí programu ImageJ 1.52 (<https://imagej.nih.gov/ij>) s nainstalovaným doplňkem Levan (Sakamoto a Zacaro 2009), který třídí jednotlivé chromozómy na základě polohy centromery do kategorií sestavených dle Levana et al. (1964). Levanovu klasifikaci morfologie chromozómů jsem použil u dvouramenných chromozómů (m – metacentrický, sm – submetacentrický), ale u jednoramenných chromozómů jsem místo označení „t“ pro telocentrický chromozóm (Levan et al. 1964) použil „a“, tedy akrocentrický chromozóm. Zároveň jsem začlenil subtelocentrické a akrocentrické chromozómy do jedné kategorie, protože u ryb je přechod mezi těmito kategoriemi plynulý a není tak jednoduché (a ani to nemá příliš praktický význam) určit přesnou hranici mezi nimi (např. Sember et al. 2015).

3.2.12. Fylogenetická analýza

Vzhledem k tomu, že jsou jednotlivé druhy rodu *Bunocephalus* mezi sebou těžko morfologicky rozlišitelné, bylo potřeba použít moderní fylogenetické metody, abych mohl taxonomicky správně zařadit jedince ve své práci. V této oblasti mi velmi pomohl kolega Mgr. Tomáš Dvořák. K fylogenetické analýze jsem použil metody sekvenování části mitochondriálního a jaderného genomu. Celogenomová DNA byla nejprve amplifikována pomocí reakce PCR za použití primerů pro gen kódující cytochrom oxidázu I (COI) (termální profil reakce viz Tab. 4; sekvence primerů forward: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3', reverse: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA -3') a genu pro enzym *RAG1* (z angl. *recombination activating gene*) (termální profil reakce viz Tab. 5; sekvence primerů forward: 5'-CAGAGCATGAGGTV CAGGGAGATCT-3', reverse: 5'-GTCAAACACACAGACTTCACATC-3'). *COI* je mitochondriální gen často používaný pro tyto účely, stejně jako jaderný gen *RAG1*, který jsem použil z důvodu, abych vyloučil mezidruhové křížení jako příčinu polymorfizmu. Reakce PCR pro amplifikaci genu *COI* o objemu 25 µl obsahovala 9 µl ultračisté vody (Top Bio), 12,5 µl PPP Master Mixu (obsahuje reakční pufr a Taq polymerázu; Top Bio), 1 µl každého z primerů a 2 µl izolátu z celogenomové DNA (alespoň 20 ng DNA). Reakce PCR pro namnožení genu *RAG1* o objemu 25 µl obsahovala 17,25 µl ultračisté vody (Top Bio), 5 µl PCR pufru bez Mg²⁺ (Top Bio), 5 µl nukleotidového mixu (koncentrace 2,5 mM), 5 µl MgCl₂, 0,5 µl enhanceru (Top Bio), 0,25 µl každého z primerů, 0,25 µl Taq polymerázy Unis (Top Bio) a 2 µl izolátu z celogenomové DNA

(alespoň 20 ng DNA). Amplifikovaná PCR byla poté odeslána na sekvenování (Macrogen) a získané sekvence byly sesazeny v programu SeqMan II. Následně byly vytvořeny alignmenty v programu BioEdit. Alignmenty byly importovány do programu MEGA 7, kde byly vytvořeny první testovací fylogenetické stromy metodou Neighbour-Joining. Po kontrole byly vygenerovány nejvhodnější evoluční modely a vytvořeny konečné soubory ve formátu nexus. Tyto soubory byly poté nahrány na webový portál CIPRES Science Gateway a zde byla spuštěna Bayesovská analýza v programu MrBayes on XSEDE 3.2.7a. Výsledné fylogenetické stromy byly vizualizovány v programu FigTree v1.4.

Tab. 4: Termální profil reakce PCR pro amplifikaci genu *COI*

PCR krok	COI
Počáteční denaturace	95 °C / 5 min
a. Denaturace 1	94 °C / 1 min
b. Nasedání primerů 1	60 °C / 1 min 30 s
c. Elongace 1	72 °C / 2 min
d. Denaturace 2	95 °C / 1 min
e. Nasedání primerů 2	58 °C / 1 min 30 s
f. Elongace 2	72 °C / 2 min
g. Denaturace 2	94 °C / 1 min
h. Nasedání primerů 2	54 °C / 1 min 30 s
ch. Elongace 2	72 °C / 2 min
i. Závěrečná elongace	7 min
Počet opakování cyklu a.-c.	1×
Počet opakování cyklu d.-f.	1×
Počet opakování cyklu g.-ch.	29×

Tab. 5: Termální profil reakce PCR pro amplifikaci genu *RAG1*

PCR krok	RAG1
Počáteční denaturace	95 °C / 5 min
a. Denaturace	94 °C / 30 sec
b. Nasedání primerů	54,3 °C / 30 sec
c. Elongace	72 °C / 2 min
d. Závěrečná elongace	10 min
Počet opakování cyklu a.-c.	35×

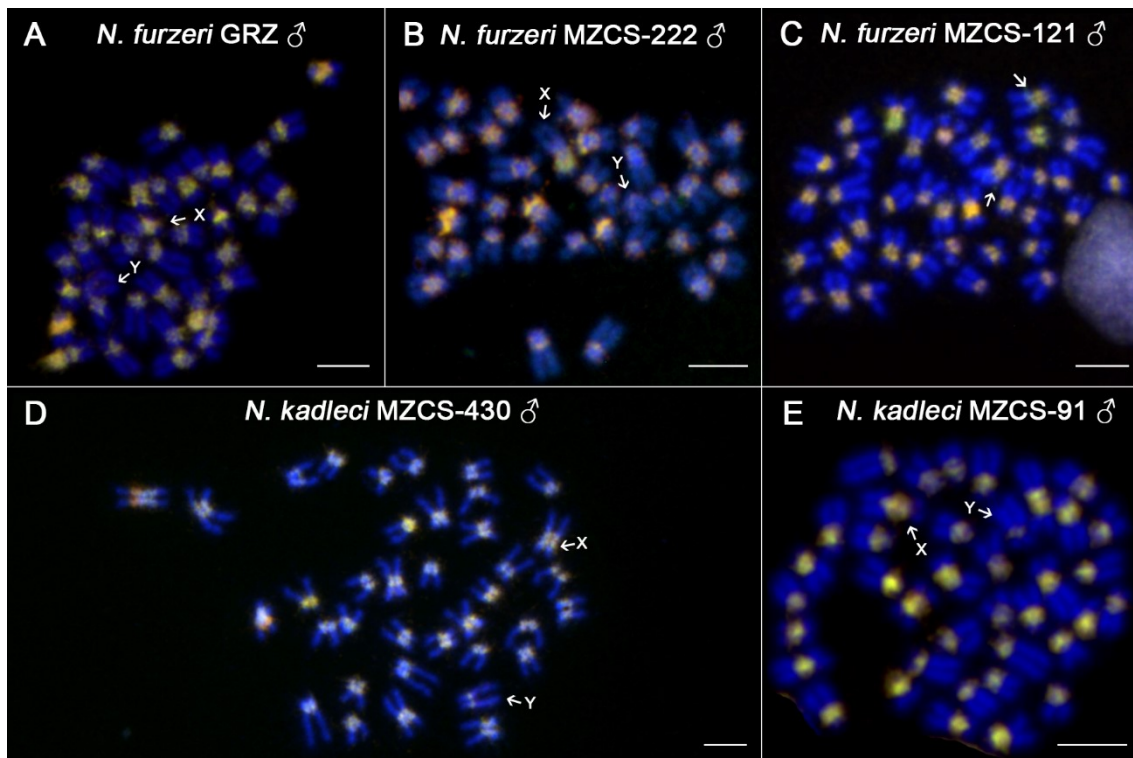
4. Výsledky

4.1 Analýza pohlavních chromozómů u halančíků *Nothobranchius furzeri* a *N. kadleci*

Moje analýzy zahrnovaly jedince ze tří populací modelového druhu *N. furzeri* a dvou populací sesterského druhu *N. kadleci*.

4.1.1 Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Nejdříve jsem pomocí metody CGH u samců analyzoval přítomnost a molekulární složení pohlavních chromozómů XY (Obr. 3). Experimenty jsem prováděl (i) na čerstvých preparátech, které předtím nepodstoupily žádnou jinou cytogenetickou metodu, a dále (ii) na preparátech, které podstoupily BAC-FISH s klony nesoucími sekvenční vázané na pohlavní chromozómy (metodu prováděli kolegové z týmu – viz. Štundlová et al. 2022 in rev.), a tak byla identita pohlavních chromozómů jasně definovaná. Ani v jedné populaci jsem na pohlavním chromozómu Y neodhalil oblast, která by byla značena preferenčně nebo výhradně samčí specifickou celogenomovou sondou. Samčí a samičí genomové sondy hybridizovaly rovnoměrně na všech chromozómech, a tedy kombinací fluorochromů vyzařujících v zelené a červené oblasti světelného spektra se vytvořil uniformní žlutý/žlutavý vzor signálů. Nejvýraznější signály se nacházely v rozsáhlých (peri)centromerických oblastech. Chromozóm Y však bylo možné identifikovat u všech populací s výjimkou NFU MZCS-121 na základě absence tohoto robustního (peri)centromerického signálu.



Obr. 3: Komparativní genomová hybridizace (CGH) na mitotických chromozómech samečů *N. furzeri* (A-C) a *N. kadleci* (D,E). Samčí specifické sondy jsou značené Cy3 (červená). Samičí specifické sondy jsou značené FITC (zelená). Jejich vzájemná hybridizace má žlutavou barvu. Chromozómy jsou podbarveny DAPI. Pohlavní chromozómy jsou označeny šipkami a byly určeny na základě předchozích experimentů BAC-FISH (viz Štundlová et al. 2022 in rev.). Pouze v jednom případě (B) nebylo možné odlišit od sebe chromozómy X a Y, jelikož jsou homomorfní. Měřítka = 10 μ m.

4.1.2 Imunodetekce proteinů SYCP3 a MLH1 na pachytenních jádrech

Druhou cytogenetickou metodou, kterou jsem posuzoval diferenciaci pohlavních chromozómů XY u obou druhů halančíků byla imunodetekce synaptonemálních komplexů (konkrétně proteinu SYCP3) a oblastí, kde proběhla rekombinace (mapováním akumulace proteinů MLH1). Celkem jsem analyzoval u populací *N. furzeri*: NFU GRZ 3♂, NFU MZCS 121 4♂ a NFU MZCS-222 4♂/ 2♀ a samce dvou populací druhu *N. kadleci*: NKA MZCS-91 4♂ a NKA MZCS-430 2♂. Všichni analyzovaní samci měli v profázi prvního meiotického dělení 19 bivalentů ($2n = 38$). Všechny páry homologních chromozómů tvořily bivalenty se standardním párováním po celé délce chromozómů v naprosté většině studovaných jader. Odchyly párování (např. nepárující úseky nebo opožděné párování), které by naznačovaly přítomnost oblasti genetické diference na pohlavních chromozómech XY, jsem nepozoroval. Pouze u jednoho samčího jedince z populace NFU MZCS-222 jsem minimálně na dvou pachytenních jádrech s jistotou pozoroval bivalent s nestandardním párováním ve formě nepárujícího úseku na jednom z homologů, který tvořil útvar připomínající smyčku (mohlo se jednat i o párování úseků v rámci daného homologu, tzv. „self-pairing“). Samice (studované

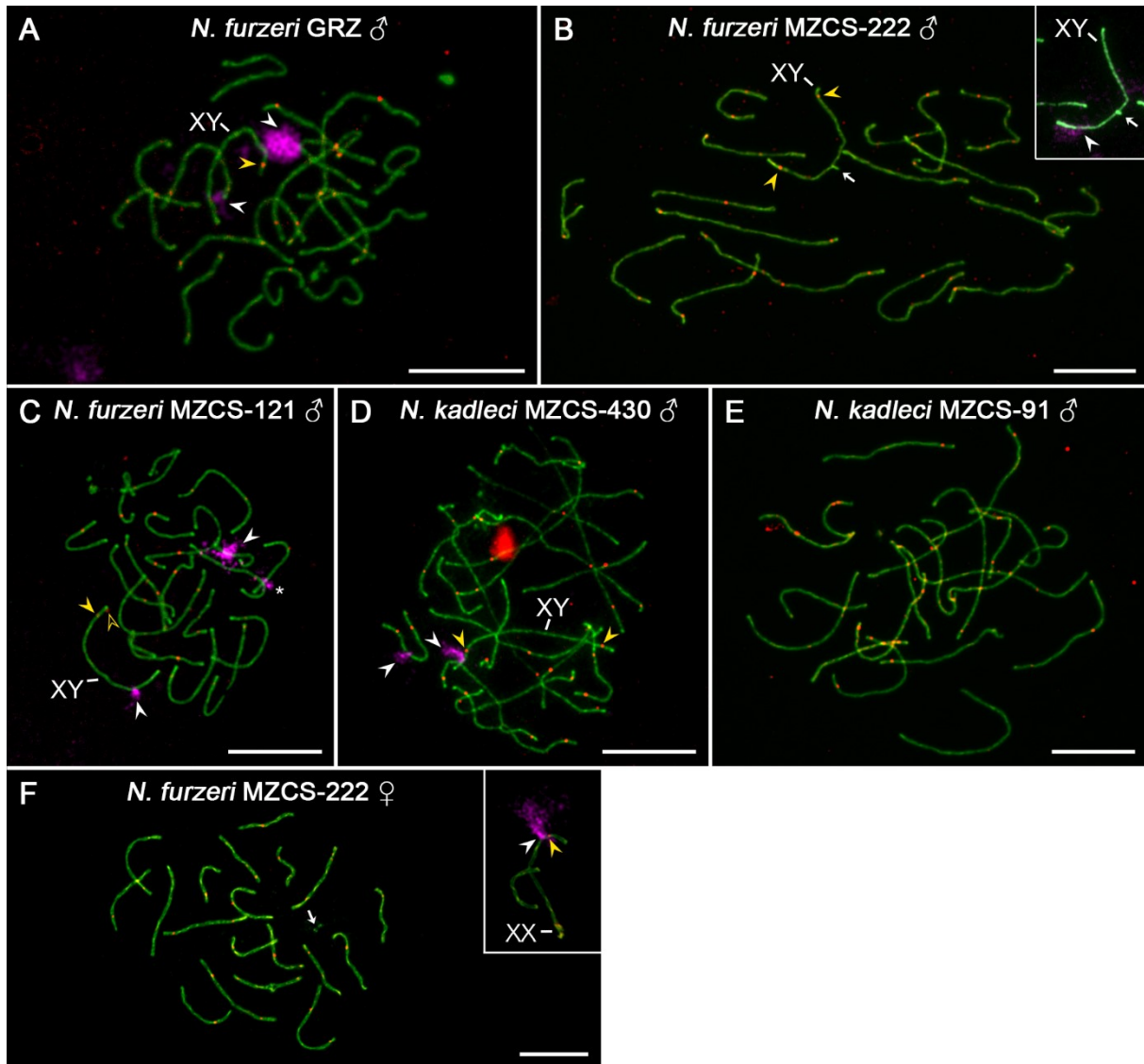
pouze u populace NFU-MZCS-222) vykazovaly, dle očekávání, rovněž standardní pachytenní bivalenty. Pozoruhodnou odchylkou byla ve většině jader přítomnost drobného tělesa připomínajícího nadpočetný (B) chromozóm (Obr. 4F). U samců jsem podobné těleso pozoroval jen velmi vzácně na některých pachytenních jádrech samců z populací NKA MZCS-91, NFU-MZCS-221 a NFU-MZCS-222.

Ložiska akumulace proteinu MLH1, které představují oblasti, kde proběhl crossing-over, jsem u všech zkoumaných jedinců (tj. samců napříč populacemi a samic z populace NFU MZCS-222) pozoroval obvykle jednu nebo dvě na bivalent (Obr. 4). Vzácně se vyskytovaly bivalenty se třemi signály (Obr. 4B). Většina signálů se nacházela v koncových částech bivalentů. V rámci omezeného vzorku samic NFU MZCS-222 výsledky naznačovaly, že proporce terminálních signálů MLH1 je o trochu nižší než u samců. V rámci přípravy manuskriptu (Štundlová et al. 2022) kolegové z týmu toto pozorování podpořili statisticky (viz diskuze).

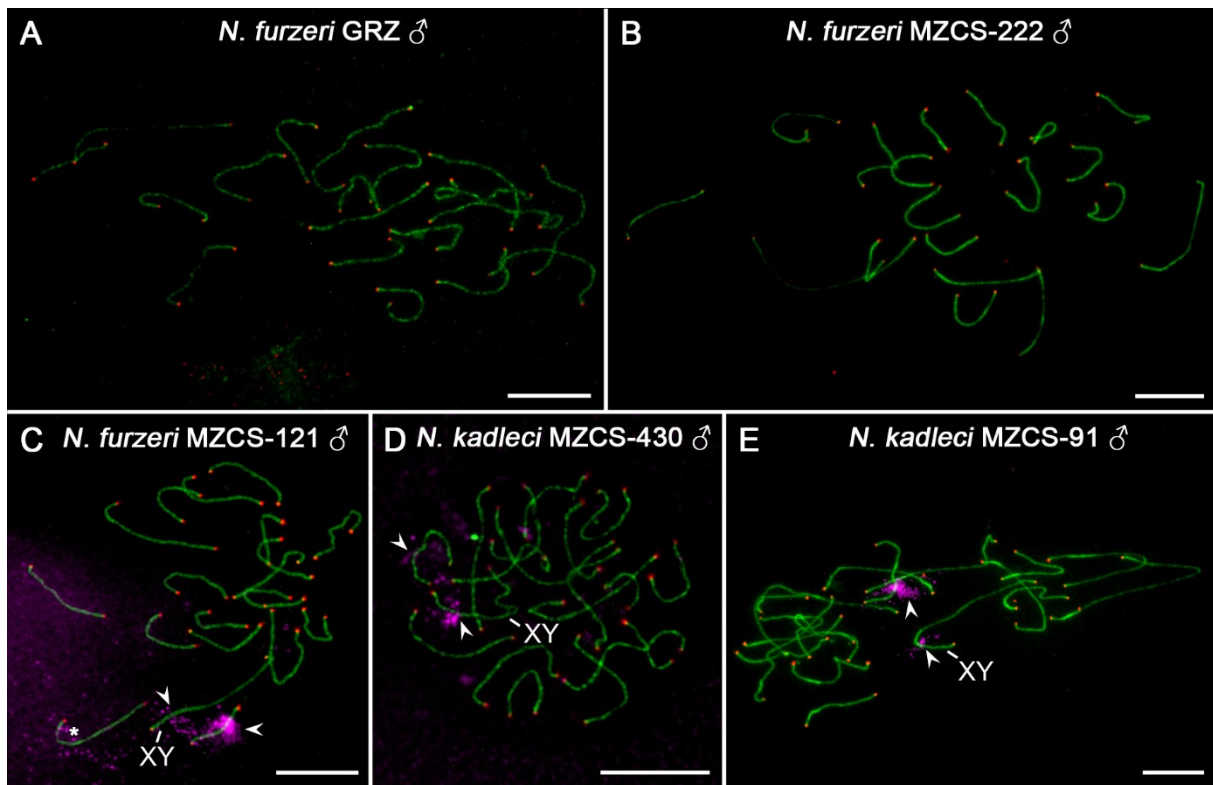
3.1.3 Detailní analýza bivalentu pohlavních chromozómů XY následnými protokoly FISH

Předchozí experimenty rDNA FISH prováděných na mitotických chromozómech u mnou studovaných populací *N. furzeri* a *N. kadleci* (Lukšíková 2021, Štundlová et al. 2022) odhalily, že klastry 18S rDNA nese stabilně jeden autozómový pár a dále chromozóm X a nikoliv Y. I přes výskyt polymorfizmů v počtu a pozici signálů (Lukšíková 2021, Štundlová et al. 2022) byly pohlavní chromozómy XY vždy nejdelším párem chromozómů, kde alespoň jeden homolog nesl repeticce 18S rDNA. Proto bylo možné s použitím 18S rDNA FISH na meiotických preparátech se značenými synaptonemálními komplexy určit, který bivalent je tvořen pohlavními chromozómy XY. Skla odmytá po imunozačnění protilátkami proti SYCP3 a MLH1 si zachovala signály protilátek SYCP3 a v kombinaci s 18S rDNA sondou tak bylo možné pozorovat dva bivalenty nesoucí signál ribozomální sondy: jeden velký se slabším signálem (bivalent XY) a jeden malý se silnějším signálem. Při srovnání těch samých pachytenních jader z obou navazujících typů experimentů bylo tedy možné odvodit, že se na samčím bivalentu tvořeném pohlavními chromozómy nachází nejčastěji pouze jediný MLH1 signál, a to v subtelomerické oblasti dlouhých ramének. Jen výjimečně jsem pozoroval ještě druhý signál na krátkých raménkách, a to v blízkosti klastru 18S rDNA.

U pachytenních jader samic NFU MZCS-222 byla distribuce MLH1 podobná jako u samců. Na jejich pohlavním bivalentu byl pozorován jediný MLH1 signál, který se nacházel na krátkých raménkách v blízkosti oblasti značené sondou 18S rDNA.



Obr. 4: Imunodetekce SYCP3 a MLH1 (A-F) s následnou 18S rDNA FISH (A-D,F) na pachytenních bivalentech halančíků *N. furzeri* (A-D,F) a *N. kadleci* (D,E). Protilátky proti SYCP3 jsou značené zeleně, protilátky proti MLH1 červeně. Pro přehlednost jsou signály 18S označeny fialovou pseudobarvou a přesněji označené hrotem šípky. Pohlavní bivalent je označen XY a žluté hroty šipek ukazují na místa s MLH1 na tomto bivalentu. Pohlavní bivalent byl určený na základě experimentů na mitotických chromozómech (Štundlová et al. 2022) jako větší z bivalentů značených sondou 18S rDNA. Šipka (F) ukazuje na nadpočetný chromozóm. Šipka (B) ukazuje na místo s nespárovaným úsekem na XY bivalentu. Měřítko = 10 μ m.



Obr. 5: Imunodetekce SYCP3 s následnou telomerickou PNA FISH (A-E) nebo 18S rDNA FISH (C-E) na pachytenních bivalentech halančičků *N. furzeri* (A-C) a *N. kadleci* (D,E). Protilátka proti SYCP3 je značená zeleně, červeně jsou značené telomerické sekvence a klastry 18S rDNA jsou prezentovány ve fialové pseudobarvě a přesněji označené hrotem šipky. Pohlavní bivalent je označený XY, hvězdička (C) poukazuje na pravděpodobně falešný 18S rDNA signál (založeno na pozorování mnoha mitotických a meiotických fází samců z této populace; Lukšíková 2021, Štundlová et al. 2022 a tato práce). Měřítka = 10 μm .

Druhou metodou použitou na preparáty, které předtím podstoupily imunoznačení, byla telomerická FISH (Obr.5). Důvod jejího použití souvisí s výsledky kolegů z týmu (Štundlová et al. 2022), kteří na základě BAC-FISH odhalili, že samci obou studovaných druhů halančičků mají heteromorfní pohlavní chromozómy XY, kdy chromozóm Y je kratší než jeho partner. V takovém případě analýza telomerických signálů může naznačit, jestli se v rámci bivalentu XY odehrává synaptické přizpůsobení (angl. „synaptic adjustment“), tedy proces, díky kterému dojde při párování heteromorfních chromozómů ke k přizpůsobení velikosti chromozómů tak, že jejich konce párují spolu. Pokud by se tento proces neodehrával, telomerické signály na kratším chromozómu Y by se nemohly shodovat s pozicí telomerických signálů na chromozómu X (Torgasheva et al. 2021). U všech studovaných samců jsem ovšem bezvýhradně pozoroval telomerické signály pouze na koncích všech samčích bivalentů, tedy včetně bivalentu XY, což naznačuje, že v něm probíhá synaptické přizpůsobení.

4.2 Analýza karyotypu u širokohlavců druhu *B. aloikae*

Na širokohlavcích jsem prováděl následující metody: CGH, WCP, 18S rDNA FISH, telomerickou PNA FISH a fylogenetickou analýzu. K fylogenetické analýze jsem měl k dispozici 29 jedinců, z nichž jsem pro další experimenty použil celkem devět (7♂/ 2♀) na základě kvality chromozómových preparátů. Detaily jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 6: Diploidní počty chromozómů u jedinců použitých při experimentech

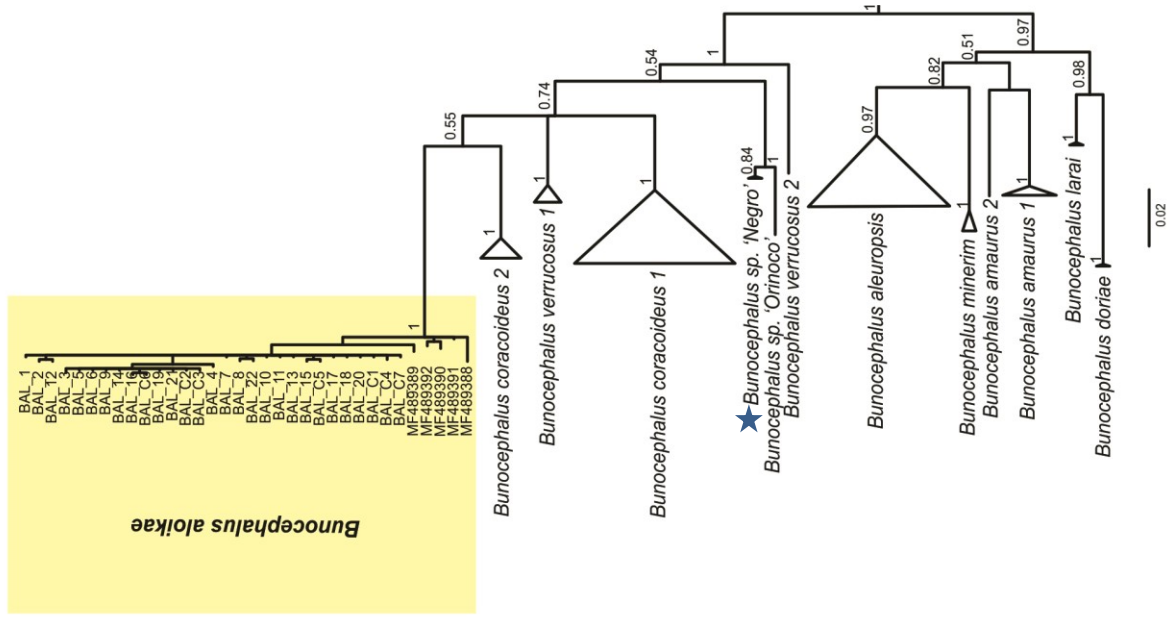
Jedinec	Počet chromozómů (2n)
<i>B. aloikae</i> vz. 1 ♂4	2n = 48
<i>B. aloikae</i> vz. 1 ♂5	2n = 50
<i>B. aloikae</i> vz. 1 ♂7	2n = 51
<i>B. aloikae</i> vz. 1 ♂9	2n = 49
<i>B. aloikae</i> vz. 1 ♂10	2n = 50
<i>B. aloikae</i> vz. 2 ♂6	2n = 49
<i>B. aloikae</i> vz. 2 ♂9	2n = 49
<i>B. aloikae</i> vz. 1 ♂10	2n = 50
<i>B. aloikae</i> vz. 1 ♀3	2n = 50
<i>B. aloikae</i> vz. 1 ♀8	2n = 47

4.2.1 Základní fylogenetická a karyotypová analýza

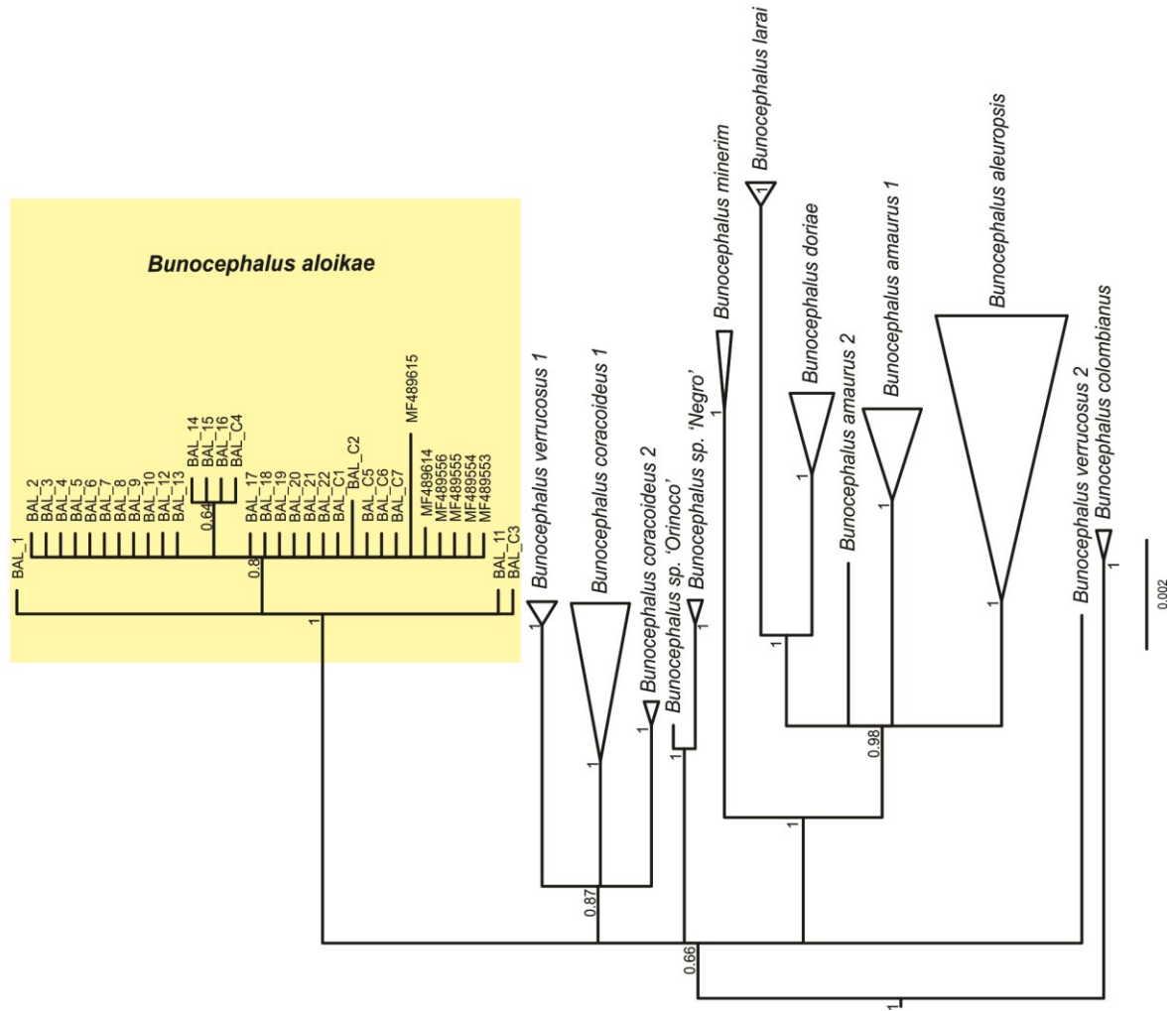
S ohledem na značnou mezidruhovou fenotypovou podobnost širokohlavců a také vzhledem k výrazným rozdílům v počtu chromozómů mezi analyzovanými jedinci (viz dále) bylo nutné udělat jejich fylogenetickou analýzu, abych ověřil zařazení do druhu a eliminoval možnost, že rozdílná 2n jsou důsledkem mezidruhového křížení. Sekvence pro mitochondriální gen *COI* (délka 679 párů bází) a jaderný gen *RAG1* (délka 1396 párů bází) získané ze všech 29 jedinců prokázaly, že všichni jedinci jsou si blízce příbuzní a neprokazují téměř žádnou sekvenční variabilitu. Výsledky založené na genech *COI* a *RAG1* jednoznačně prokázaly příslušnost analyzovaných jedinců ke druhu *B. aloikae*.

Obr. 6 (na následující stránce): Schématické znázornění fylogenetických stromů z mitochondriálního genu *COI* (vpravo) a jaderného genu *RAG1* (vlevo). Sekvence druhu *B. aloikae* začínající písmeny MF byly staženy z GenBank, sekvence začínající BAL byly osekvenovány pro účely této práce. Klad *Bunocephalus* sp. „Negro“ označený hvězdičkou obsahuje také jedince *Bunocephalus* cf. *aloikae* z práce Ferreira et al. (2020). Outgroup obsahující druhy *B. chamaizelus* a *A. aspredo* zde není zobrazena. Originální fylogenetické stromy v příloze.

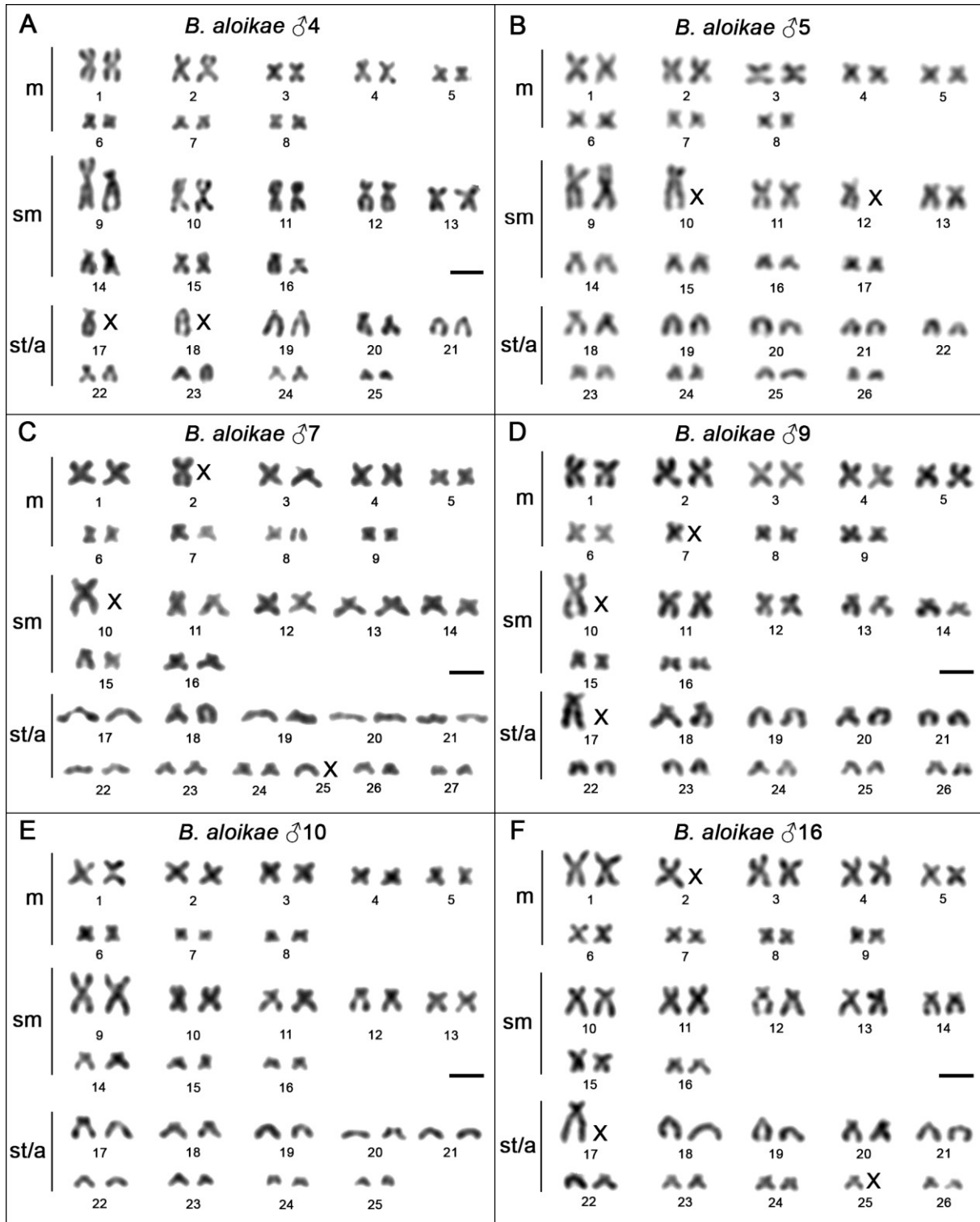
Co1 tree

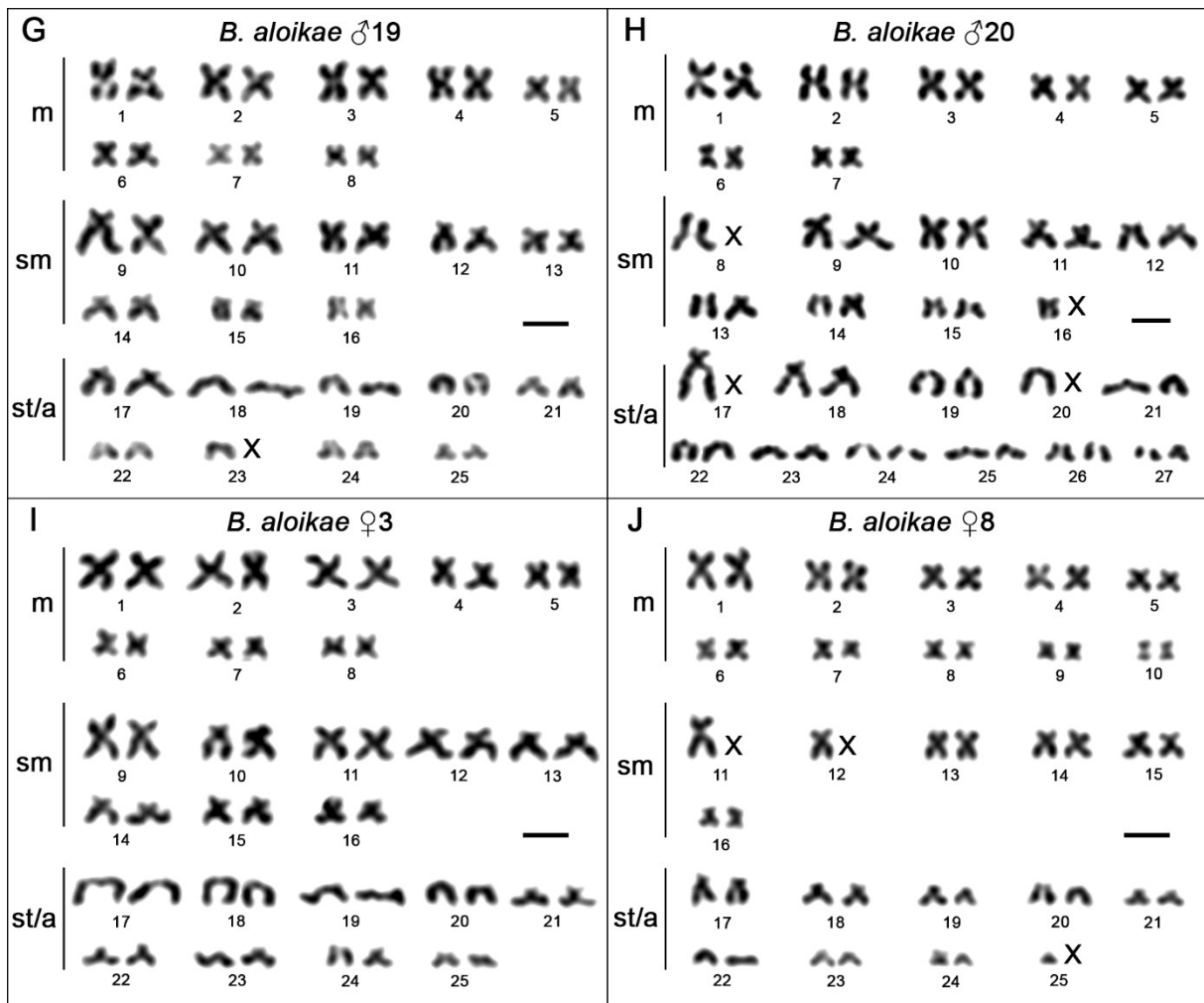


RAG-1 tree



Vybrané mitotické preparáty všech jedinců uvedených v Tab. 6 jsem obarvil Giemsou a z vhodných metafází jsem vytvořil karyotypy. U většiny jedinců (výjimky Obr. 7E,I) se nacházely chromozómy, které neměly zřejmého homologa do páru. Přibližně jedna třetina karyotypu byla tvořena st nebo a chromozómy.



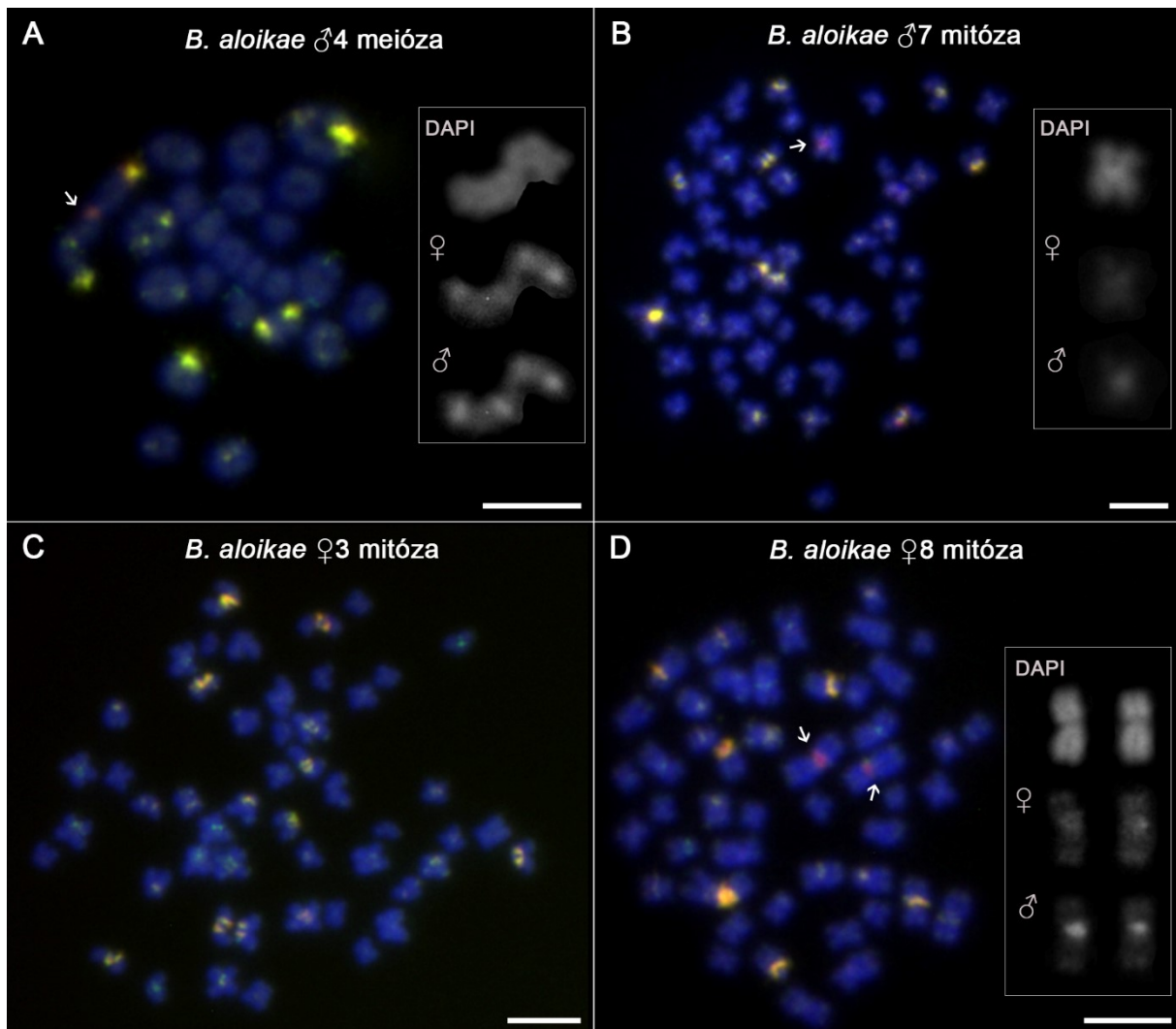


Obr. 7: Karyotypy samců (A-H) a samic *B. aloikae* (I-J) z mitotických metafází obarvených Giemsou. Pokud neměl chromozóm vhodného kandidáta do páru, byl určen jako nepárový a chybějící homolog byl nahrazen křížkem. Měřítko = 10 μ m.

4.2.2 Komparativní genomová hybridizace (CGH)

Metodu CGH jsem použil na dva samce a dvě samice (Obr. 8). Pokud se v genomu nachází cytogeneticky odlišitelné pohlavní chromozómy, měla by CGH u jednoho pohlaví odhalit oblast preferenčně značenou sondou daného pohlaví, zatímco na chromozómech druhého pohlaví by taková oblast neměla být přítomna. CGH aplikovaná na meiotický preparát samce, z něhož pochází mikrodisekovaný tetravalent použitý pro výrobu malovací sondy, odhalila, že právě na tetravalentu se nachází oblast se silným signálem samčí specifické sondy a současně velmi slabým signálem samičí sondy (Obr. 8A). Na mitotickém preparátu druhého analyzovaného samce jsem odhalil podobný signál, zde v pericentrické oblasti jednoho metacentrického chromozómu (Obr. 8B). U *BAL* ♀3 žádný takový region viditelný nebyl a jak samčí, tak i samičí sonda značily rovnoměrně všechny chromozómy. CGH u *BAL* ♀8 ovšem překvapivě odhalila dva chromozómy, jejichž pericentrická oblast byla preferenčně značená

sondou ze samčího pohlaví (Obr. 8D). Nelze proto s jistotou říct, zda specificky značené oblasti u samčího pohlaví opravdu reprezentují oblast diference pohlavních chromozómů.



Obr. 8: Komparativní genomová hybridizace (CGH) na meiózách (A) a na mitózách (B, C, D) samců a samic *B. aloikae*. Samčí specifické sondy jsou značené Cy3 (červená). Samičí specifické sondy jsou značené FITC (zelená). Jejich vzájemná hybridizace má žlutavou barvu. Pohlavně specifické části chromozómů jsou označeny šípkami a jednotlivé kanály těchto označených chromozómů jsou rozloženy vedle metafází v pravé části příslušného obrázku. Chromozómy jsou podbarveny DAPI (modrá). Měřítko = 10 μ m.

4.2.3 Detailní analýza karyotypu širokohlavců pomocí celochromozómových malovacích sond (WCP)

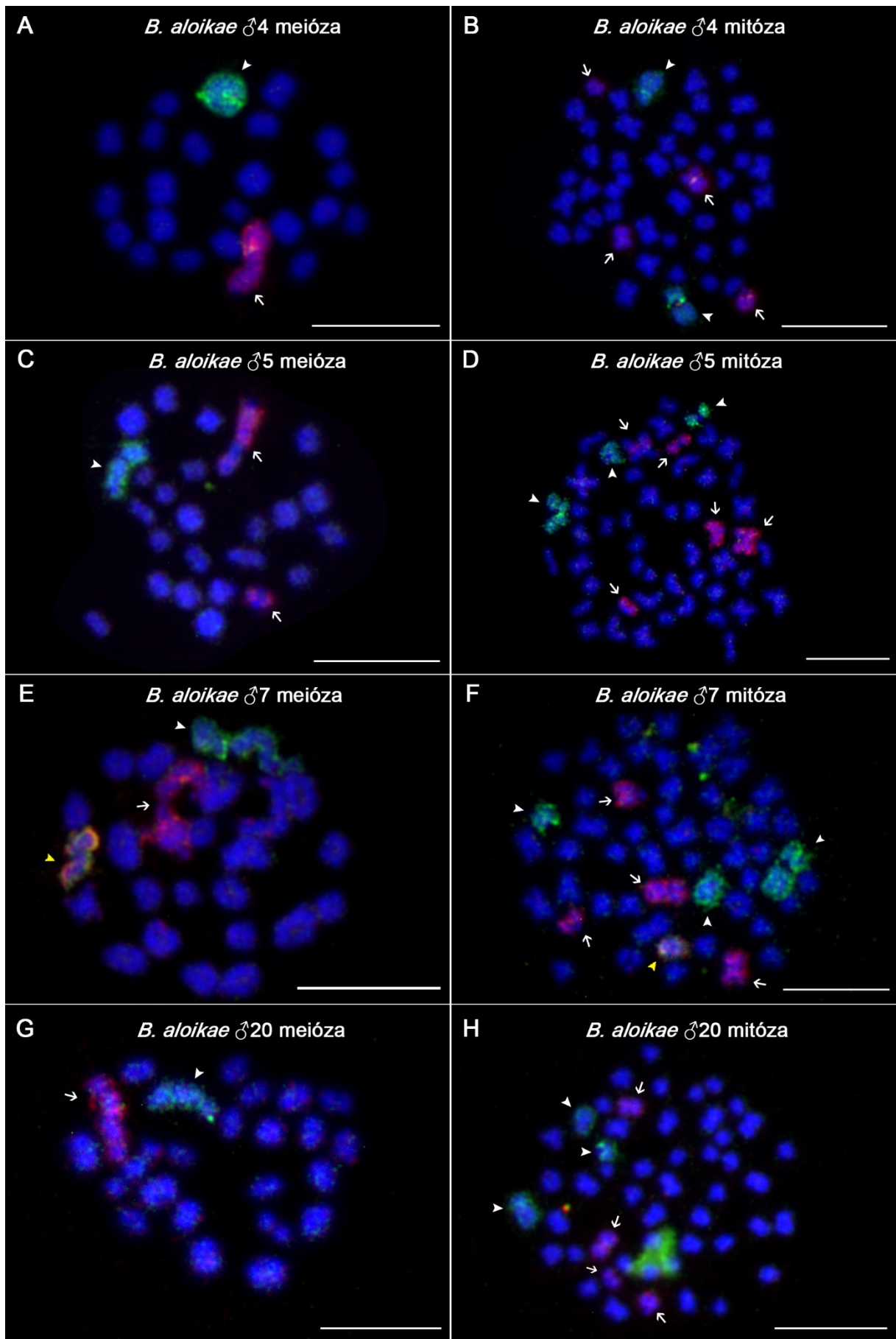
Metodou WCP jsem mapoval velký nepárový metacentrik č. 9 a tetravalent z jedince BAL ♂4. V případě tetravalentu: pokud by byl tvořený pohlavními chromozómy a představoval by stejný systémem, jako byl navržen u *B. coracoideus* (Ferreira et al. 2016), měla by malovací sonda u všech jedinců barvit čtyři chromozómy, přičemž u samců by to byl jeden homomorfní pár a jeden pár heteromorfní, zatímco u samic by to měly být dva páry homomorfních

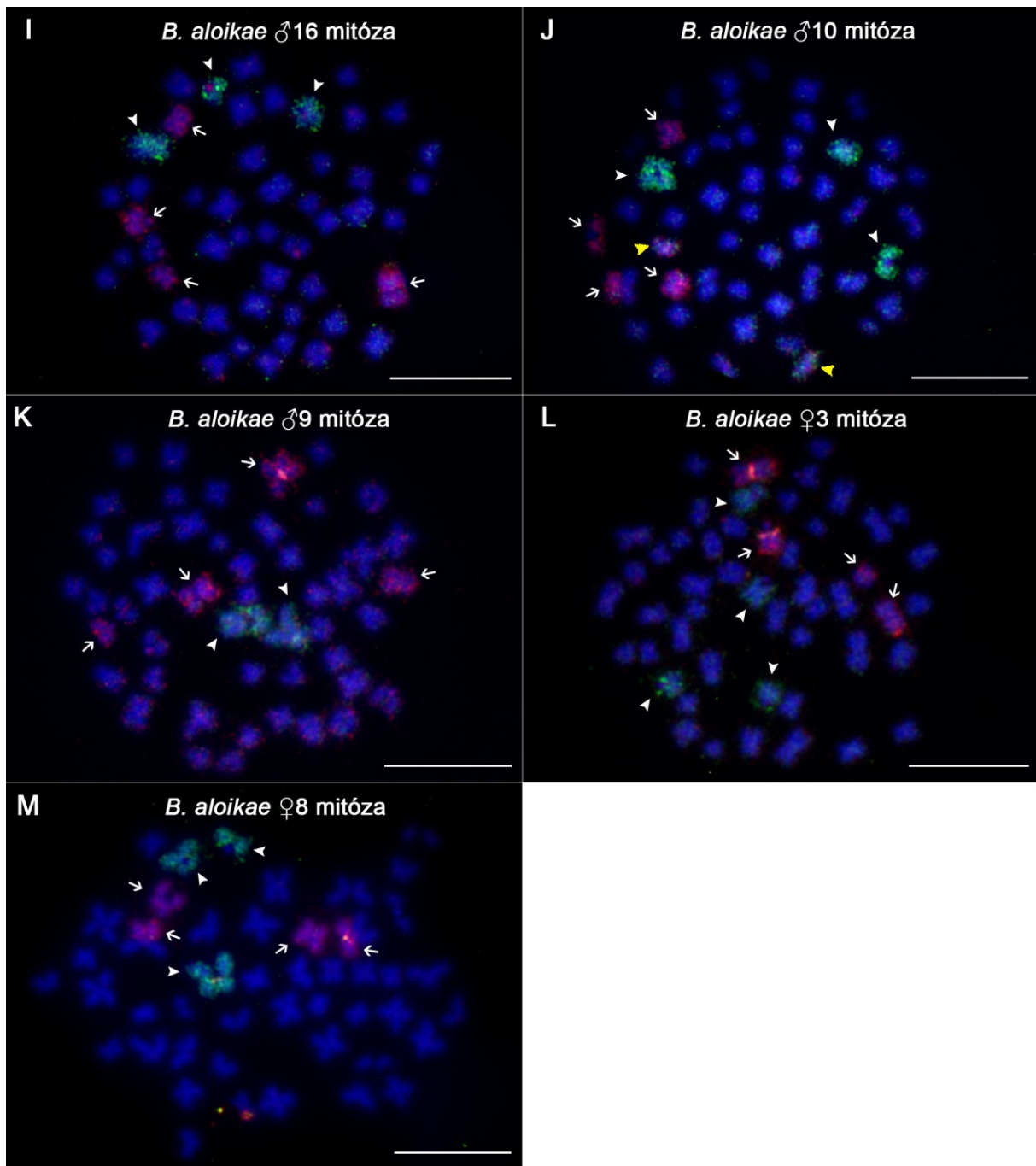
chromozómů. moje výsledky však ukázaly, že ač u osmi jedinců tato sonda barvila čtyři chromozómy (výjimka Obr. 9D), nejednalo se dle pozorované morfologie o stejné chromozómy. V některých případech sonda dokonce značila jen části chromozómů (Obr. 9D,J,M). Druhá malovací sonda (připravená z nepárového metacentrického chromozómu) značila u dvou samců včetně toho, ze kterého byla tato sonda získána, dva heteromorfní chromozómy (Obr. 9B,K), ale v naprosté většině případů značila chromozómy tři, v jednom případě dokonce čtyři (Obr. 9L). Navíc tyto dvě sondy spolu ve dvou případech kolokalizovaly (Obr. 9E,F,J). WCP aplikované na meiotické bivalenty ukázalo, že chromozómy značené sondou z tetraivalentu spolu párují a tvoří jeden útvar u všech analyzovaných jedinců s výjimkou BAL ♂5, kde značí dva útvary (Obr. 9C). Chromozómy značené sondou z metacentriku také párují vždy spolu a chromozóm, u kterého tyto dvě sondy kolokalizovaly, nepároval při meióze s jinými chromozómy (Obr. 9E). Zajímavé výsledky přinesla analýza různých stadií meiózy u samce BAL ♂7 (Obr. 10), kde jsem v metafázích druhého meiotického dělení pozoroval přítomnost jednoho, dvou či žádného z chromozómů obarvených současně oběma sondami, což naznačuje nerovnoměrnou segregaci (nondisjunkci) tohoto chromozómu.

Dále jsem na tyto jedince také aplikoval 18S rDNA FISH (Obr. 11), protože první experimenty provedené na meiózách samce BAL ♂4 ukázaly, že se tato multigenová rodina vyskytuje na tetraivalentu. Následné experimenty jsem prováděl (i) na čerstvých preparátech, které předtím nepodstoupily žádnou jinou cytogenetickou metodu, a dále (ii) na preparátech, na kterých bylo předtím provedeno WCP. Takřka u všech jedinců značila sonda dva chromozómy, pouze v jednom případě byly slaběji značené ještě dva další chromozómy (Obr. 11D). Experimenty dělané na recyklovaných sklech (Obr. 11C,G) potvrdily, že signál 18S rDNA se nachází na chromozómech, které předtím značila také malovací sonda z tetraivalentu. Ve všech případech značila sonda alespoň jeden chromozóm se čtyřmi raménky, druhý značený chromozóm byl kromě jednoho případu (Obr. 11E) akrocentrický.

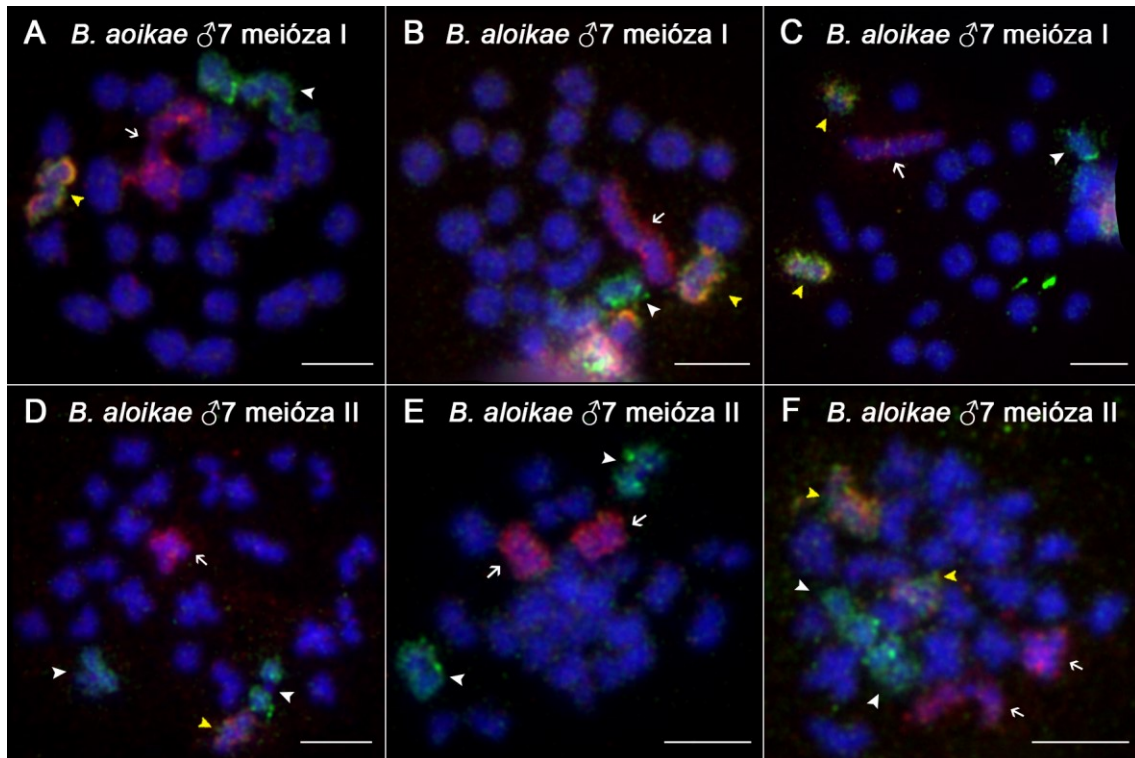
Poslední cytogenetickou metodou, kterou jsem u širokohlavců použil, byla telomerická FISH (Obr. 12), která dokáže odhalit některé typy přestaveb, jako jsou fúze nebo inverze zahrnující koncové části chromozómů. Pokud takovými přestavbami projdou pohlavní chromozómy, měli bychom pozorovat rozdíly v počtu intersticiálních signálů mezi pohlavími. Výsledky však žádný takový rozdíl neukázaly; samci měli ve čtyřech případech dva signály ITS v pericentromerickém regionu jednoho metacentrického a jednoho submetacentrického chromozómu, stejně jako samice BAL ♀3, nebo v jednom případě (12F) dvou submetacentrických. V jednom případě jsem pozoroval jen jeden signál ITS v pericentromerické oblasti submetacentrického chromozómu (Obr. 12D). V jednom případě

jsem u samce žádný signál ITS nepozoroval (Obr. 12C). U druhé cytogeneticky studované samice BAL ♀8 jsem pozoroval dokonce tři signály ITS.





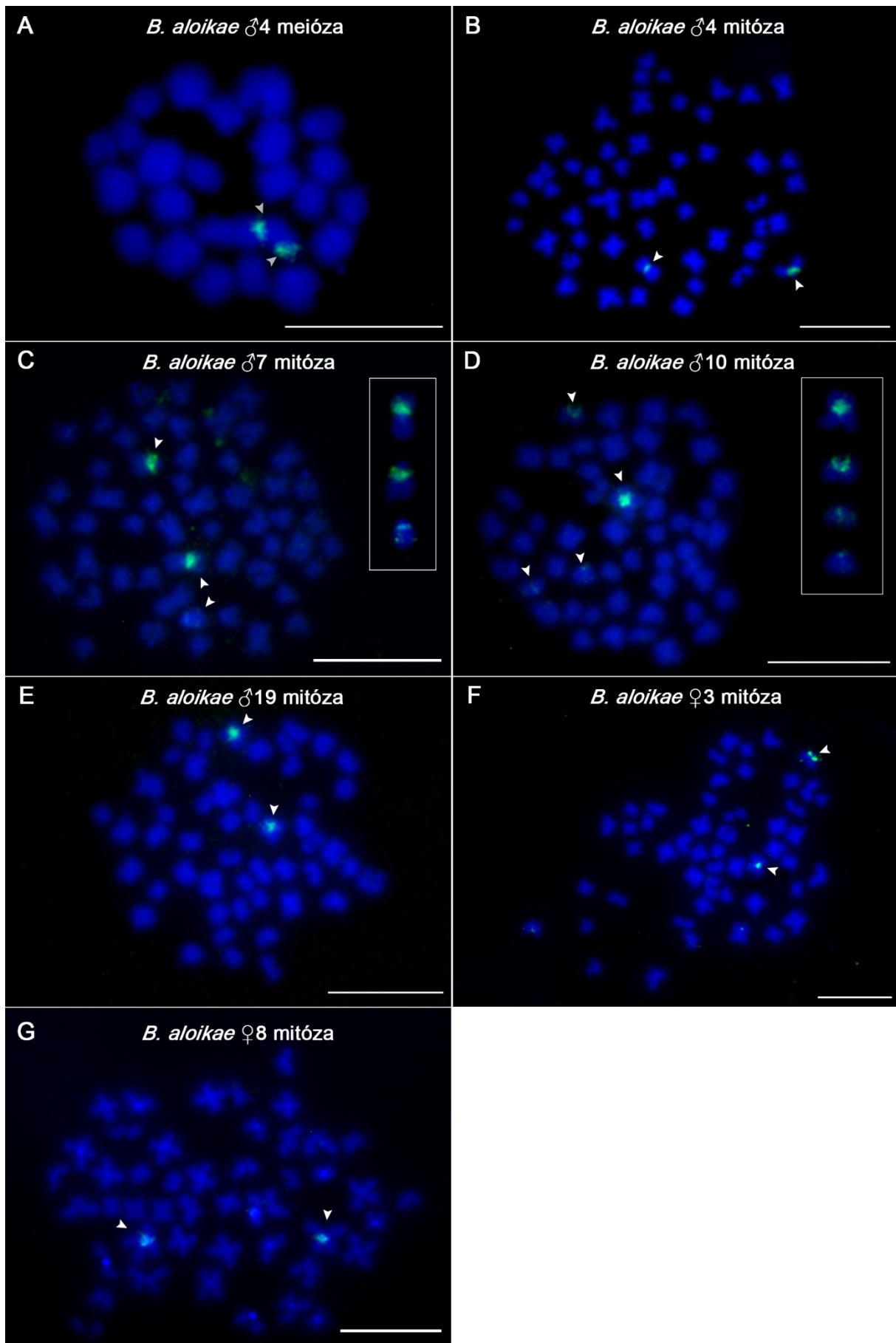
Obr. 9: Celochromozómové malovací sondy (WCP) aplikované na meiózách (A,C,E) a na mitózách (B,D,F,G,H,I, J, K, L, M) samců (A-K) a samic (L,M) *B. aloikae*. Sonda připravená z tetraivalentu je značená červeně (označená šipkami) a sonda z metacentrického chromozómu je značená zeleně (označená hroty šipek). Případná kolokalizace obou sond vytváří žluto-oranžový signál a je označená žlutými hroty šipek. Chromozómy jsou podbarveny DAPI (modrá). Měřítka = 10 μm .

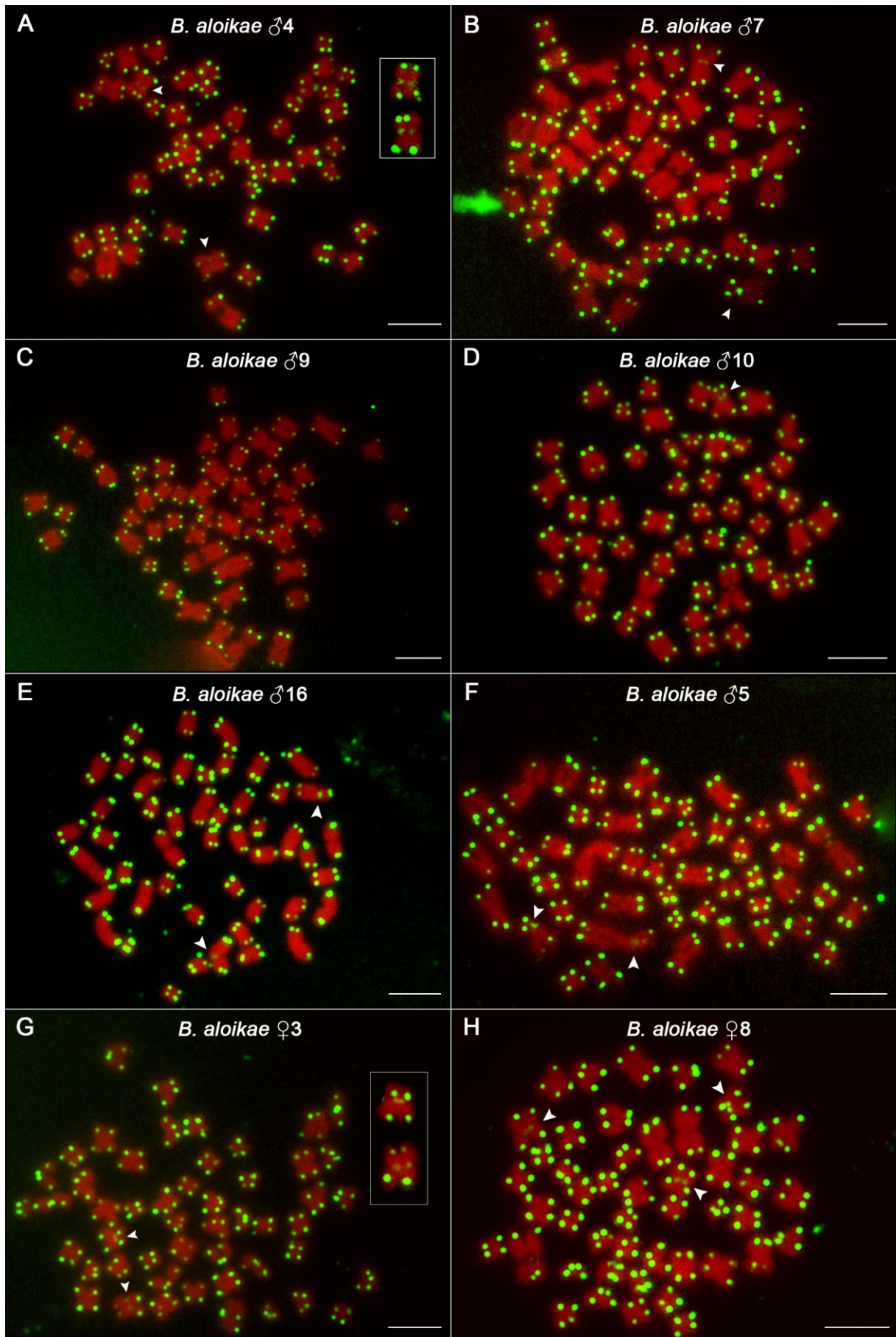


Obr. 10: Celochromozómové malovací sondy (WCP) aplikované na fáze prvního (A-C) a druhého (D-F) meiotického dělení u samce *B. aloikae* BAL ♂7. Sonda z tetraivalentu je značená červeně (označená šipkami) a sonda z metacentriku je značená zeleně (označená hroty šipek). Případná kolokalizace obou sond vytváří žlutooranžový signál a je označená žlutými hroty šipek. Chromozómy jsou podbarveny DAPI (modrá). Měřítko = 10 μ m.

Obr 11 (na následující straně): 18S rDNA FISH na mitotických metafázních chromozómech *B. aloikae*. Klastry 18S rDNA (zelené signály) jsou označené hroty šipek. V některých případech (C,D) byly signály slabé, proto jsou chromozómy se zesílenými signály 18S rDNA vyobrazeny v rámečcích na pravé straně vedle těchto metafází. Chromozómy jsou podbarveny DAPI (modrá). Měřítko = 10 μ m.

Obr. 12 (na straně 47): Telomerická PNA FISH na mitotických metafázních chromozómech samců (A-F) a samic (A) *B. aloikae*. Pro lepší kontrast jsou telomerické signály vobrazeny ve žlutozelené pseudobarvě a DAPI (podbarvení chromozómů) v červené pseudobarvě. ITS jsou označené hroty šipek. V případě, že byly signály slabé (A), jsou tyto chromozómy vobrazeny se zesílenými signály v rámečku vedle metafáze. Měřítko = 10 μ m.





5. Diskuze

5.1 Pohlavní chromozómy halančků *N. furzeri* a *N. kadleci*

Výzkum, který jsem v rámci své diplomové práce prováděl u halančků rodu *Nothobranchius*, je součástí projektu Junior GAČR 19-22346Y. Související výsledky tohoto projektu byly již dříve prezentovány v diplomové práci Lukšíkové (2021) a data byla zahrnuta do článku Štundlová et al. (2022 in rev.; prvotní verze publikovaná v tomtéž roce jako preprint na serveru biorXiv). Lukšíková (2021) ve své práci provedla karyotypovou analýzu, metodu C-pruhování pro mapování distribuce konstitutivního heterochromatinu a analýzu vybraných repetitivních sekvencí na mitotických chromozómech (rDNA, satDNA, telomerické repetece) všech druhů Jižního kladu halančků (a některých dalších druhů) včetně mnou zde studovaných populací *N. furzeri* a *N. kadleci*. Rukopis Štundlová et al. (2022 in rev.) poskytl syntézu dat pro populace *N. furzeri* a *N. kadleci* a zahrnuje kromě výsledků z Lukšíková (2021) a výsledků mých také metodu BAC-FISH a následné provázané experimenty FISH, analýzu obsahu repetitivní DNA programem RepeatExplorer, molekulární (PCR) sexing s předpokládanou pohlavní determinantou *gdf6Y* a formální analýzu mých dat distribuce proteinu MLH1 na synaptonemálních komplexech (viz dále) pomocí Multiple analysis of variance (MANOVA). Stěžejním objevem našeho společného úsilí bylo odhalení, že systém pohlavních chromozómů XY, který byl dříve popsán u druhu *N. furzeri* na základě genomických dat (Reichwald et al. 2015, Valenzano et al. 2015, Willemsen et al. 2020), se nachází i u sesterského druhu *N. kadleci*. Všechna data jednoznačně ukazují na homologii pohlavních chromozómů XY mezi oběma druhy, včetně sdílené pohlavní determinanty *gdf6Y* a většiny rysů diference pohlavních chromozómů. Je pozoruhodné, že na rozdíl od genomické práce (Reichwald et al. 2015) náš cytogenetický výzkum ukazuje, že pohlavní chromozómy jsou u většiny populací (s výjimkou NFU MZCS-121) heteromorfní. Nesoulad mezi cytogenetickými a genomickými daty by mohl být způsoben vynecháním nebo nevhodným vyhodnocením vysoce repetitivních úseků při poskládání genomu *N. furzeri* (Reichwald et al. 2015; problematiku genomického zpracování repetitivních úseků popisuje např. práce Peona et al. 2020).

5.1.1 Analýza pohlavních chromozómů metodou CGH

Ve své práci jsem nejprve provedl experimenty CGH, při kterých jsem porovnával na cytogenetické úrovni genomy obou pohlaví v rámci každé populace, abych ověřil možnou přítomnost oblastí diference na pohlavních chromozómech. Analogické experimenty byly

v minulosti provedeny u různých druhů ryb s různou mírou úspěšnosti (např. Traut a Winking 2001, Sember et al. 2018b, Yano et al. 2017, 2021). U populací *N. furzeri* a *N. kadleci* nasedaly obě celogenomové sondy na samčí chromozómy rovnoměrně a ve zvýšené míře pak značily rozsáhlé pericentromerické oblasti všech chromozómů z důvodu akumulace repetitivní DNA. Žádnou oblast preferenčně značenou samčí nebo samičí specifickou sondou jsem nepozoroval. Tento výsledek je pozoruhodný z toho důvodu, že oblast genetické degenerace s předpokládanou výrazně redukovanou četností rekombinace na pohlavním chromozómu Y všech mnou studovaných populací byla kolegy odhalena při mapování satelitní DNA námi označenou jako Nfu-SatC (Lukšíková 2021, Štundlová et al. 2022 in rev.). Jelikož se jedná o repetici vyskytující se v mnoha klastrech napříč všemi chromozómy druhů *N. furzeri* a *N. kadleci*, je možné, že CGH v tomto případě není schopna zaznamenat kvantitativní rozdíl na chromozómu Y ve srovnání s chromozómem X. U samců všech populací s výjimkou NFU MZCS-121 jsem však na základě hybridizačních vzorů po CGH pozoroval zřetelný nepárový chromozóm se značně redukovanou pericentromerickou oblastí. Následné sekvenční experimenty (užití BAC-FISH pro identifikaci pohlavních chromozómů XY a recyklace preparátů pro CGH) pak potvrdily, že se jedná o chromozóm Y (data viz článek Štundlová et al. 2022 in rev.). Delece repetitivní oblasti na chromozómu Y, která přispěla ke změně velikosti a morfologie tohoto chromozómu, může být výsledkem ektopické rekombinace (tj. rekombinace mezi homologickými sekvencemi v nehomologických oblastech genomu; obvykle mezi kopiemi repetitivní DNA) (Navrátilová et al. 2008, Li et al. 2017). V tomto případě by se jednalo o rekombinaci mezi úseky v rámci stejného chromozómu.

5.1.2 Analýza synaptonemálních komplexů pomocí imunodetekce a následnými metodami FISH

Pro ověření, jak diferenciací pohlavních chromozómů XY ovlivňuje jejich párování v meióze a jaká je distribuce rekombinace na pohlavních chromozómech i autozómech, provedl jsem analýzu synaptonemálních komplexů v pachytenních jádrech samců všech pěti populací. V rámci ryb i řady jiných organismů (převážně ptáků a savců) bylo dokumentováno, že bivalent tvořený pohlavními chromozómy může párovat opožděně (tzv. „delayed pairing“), anebo může část bivalentu odpovídající oblasti diferenciací zůstat nespárovaná. Pohlavní chromozómy v pokročilé fázi diferenciací dokonce nemusí párovat vůbec a vyskytují se jako univalenty (např. Alavattam et al. 2018, Torgasheva et al. 2021). V některých případech dochází u heteromorfních pohlavních chromozómů také k tzv. synaptickému přizpůsobení, při kterém

dojde ke změnám v uspořádání chromozómů tak, aby mohly efektivně párovat po celé své délce (u ryb pozorováno např. v: Carrasco et al. 1999, Traut a Winking 2001, Chen et al. 2008, Lisachov et al. 2015, Nath et al. 2022). Moje experimenty u studovaných samců obou druhů halančíků neodhalily žádné konzistentní odchylky párování chromozómů, tj. pozoroval jsem 19 bivalentů párujících po celé své délce. Abych se mohl zaměřit čistě na pohlavní bivalent, identifikoval jsem jej díky přítomnosti signálu 18S rDNA na chromozómu X. Zjistil jsem, že náznaky opožděného párování anebo párování úseků v rámci jednoho chromozómu (tzv. „self-pairing“; cf. Cardoso et al. 2022), které jsem pozoroval v několika případech u jednoho samce *N. furzeri* z populace MZCS-222, se skutečně vyskytují na bivalentu XY. Není možné s jistotou říct, zda pozorovaný úsek, který se nachází zhruba v polovině délky bivalentu, přímo zasahuje do oblasti diferenciaci, ale je to s vysokou pravděpodobností oblast na dlouhých raménkách, která obsahují akumulaci satDNA Nfu-SatC. Tato akumulace se do jisté míry vyskytuje i v pericentromerické oblasti na chromozómu X (Lukšíková 2021, Štundlová et al. 2022 in rev.). Je možné, že tato satDNA napomáhá kompletní synapsi pohlavních chromozómů XY navzdory úseku diferenciaci u *N. furzeri* a *N. kadleci*. Možná úloha satDNA v takovémto procesu byla diskutována i u koljušky *Gasterosteus aculeatus*, kde pohlavní chromozómy taktéž párují v meiotické profázi I po celé své délce (Nath et al. 2022) navzdory pokročilé diferenciaci (Peichel et al. 2020). Kompletní párování pohlavních chromozómů XY bylo recentně pozorováno i u živorodky *Micropoecilia picta*, kde je chromozóm Y výrazně degenerovaný (Nanda et al. 2022), dokonce natolik, že se u tohoto druhu vyvinula u ryb dosud vzácně pozorovaná kompenzace dávky genů na pohlavních chromozómech (Darolti et al. 2019).

Pro lepší pochopení, jak pohlavní chromozómy XY párují a zda u samců *N. furzeri* a *N. kadleci* skutečně dochází k synaptickému přizpůsobení, mapoval jsem na pachytenní jádra s detekovanými synaptonemálními komplexy telomerické sekvence. Pokud u heteromorfních chromozómů toto přizpůsobení neprobíhá, projevilo by se to nestandardním signálem mimo konce chromozómů (pozn.: na mitotických chromozómech halančíků žádné signály ITS pozorovány nebyly; Lukšíková 2021, Štundlová et al. 2022 in rev.). Žádné telomerické signály, které by se vyskytovaly mimo koncové části bivalentů, jsem u samců nepozoroval, což výrazně podporuje hypotézu, že u všech populací *N. furzeri* a *N. kadleci* s heteromorfními chromozómy k synaptickému přizpůsobení dochází.

Imunodetekcí ložisek akumulace proteinu MLH1 jsem vizualizoval na synaptonemálních komplexech místa, kde proběhl crossing-over. Obvykle jsem u všech samců pozoroval jedno až dvě, vzácně tři chiazmata na bivalent. Bivalent XY nesl u všech samců jedno chiazma v distální části dlouhého raménka a v některých případech (Obr. 4B,D) bylo

patrné druhé chiazma na krátkých raménkách poblíž mapovaného klastru 18S rDNA. Většina akumulací proteinu MLH1 u studovaných samců se nacházela v koncových částech bivalentů. Takováto situace, tj. crossing-over limitovaný na koncové části chromozómů, byla již u samců jiných druhů ryb dokumentována. U samic takových druhů často distribuce chiazmat byla více rovnoměrná napříč délkou bivalentu (Sutherland et al. 2017, Sadrell et al. 2018, Bergero et al. 2019, Edvardsen et al. 2022). Jak jsem již zmínil v úvodu, takováto situace se označuje jako heterochiazmie (přehled viz Sardell a Kirkpatrick 2020). Heterochiazmie může také být mechanismus, který vede k supresi rekombinace na alozómu bez nutné účasti pohlavně antagonistické selekce (např. Perrin 2021). Abych ověřil možnost výskytu heterochiazmie, a tedy jejího možného vlivu na evoluci pohlavních chromozómů XY u halančíků, analyzoval jsem distribuci MLH1 na synaptonemálních komplexech také u samic *N. furzeri* z populace MZCS-222. Distribuce míst, kde proběhl crossing-over, byla u studovaných samic podobná jako u samců. V rámci omezeného počtu analyzovatelných pachytenních jader se ovšem zdálo, že terminální chiasmata se u samic vyskytují o něco méně. Tyto moje výsledky nebyly dostačující k prokázání heterochiazmie u halančíků a nepochybně bude potřeba je do budoucna zopakovat na větším počtu jedinců a také u dalších populací. Pro potřeby článku Štundlová et al. (2022 in rev.) byla provedena ještě detailnější analýza mých výsledků mými kolegy. Tato analýza zahrnovala přesnější popis pozice foků MLH1 na základě proměření relativní vzdálenosti signálu MLH1 od nejbližšího konce bivalentu pomocí programu ImageJ a následné formální analýzy (pomocí MANOVA), která testovala vztah mezi typem pohlaví a distribucí MLH1. Tato analýza prokázala znatelné rozdíly v pozici rekombinačních míst mezi pohlavími a naznačila tak, že heterochiazmie by se vskutku mohla vyskytovat u *N. furzeri* (viz Štundlová et al. 2022 in rev.). Dá se tedy uvažovat o tom, že heterochiazmie mohla hrát důležitou úlohu v utváření pohlavních chromozómů XY u *N. furzeri* a tím pádem zřejmě i u *N. kadleci*. Dalším možným vysvětlením by mohlo být, že tyto pohlavní chromozómy vznikly z páru autozómů, u něhož došlo k redukci rekombinace již dříve v evoluci (Charlesworth 2019). Pro podporu této hypotézy ale v současné chvíli chybí jakákoliv data.

Na závěr stojí za zmínku podivný drobný útvar (chromozóm nebo bivalent), který jsem pozoroval v meióze samic populace NFU MZCS-222. Rozsah mého výzkumu (jedna populace a omezený počet studovaných samičích jedinců) neumožňuje vyvozovat žádné hlubší závěry, ale jelikož se tento element nevyskytoval v mitotických metafázích samic (Lukšíková 2021, Štundlová et al. 2022 in rev.) a nebyl přítomen v mitoze ani meióze samců (Lukšíková 2021, Štundlová et al. 2022 in rev.), vzniká podezření, že se jedná o nadpočetný tkánově-specifický

chromozóm podobný těm, které byly označeny jako germline restricted chromosomes (GRC) u jiných organismů, především ptáků (např. Torgasheva et al. 2019, Pokorná a Reifová 2021).

5.2 Širokohlavci rodu *Bunocephalus* – diferenciace karyotypu a pohlavních chromozómů

5.2.1 Fylogenetická analýza

Molekulární studie zaměřené na čeleď Aspredinidae dokázaly, že se v případě rodu *Bunocephalus* jedná o monofyletický taxon (Sullivan et al. 2006, 2008, Kappas et al. 2016). Pouze v případě druhu „*Bunocephalus*“ *chamaizelus* bylo odhaleno, že do rodu *Bunocephalus* nepatří (Carvalho et al. 2018). Jak ukázal fylogenetický strom mitochondriálního genu *COI* v této práci (Obr. 6, který byl vytvořený z dostupných sekvencí jedinců publikovaných v jiných pracech a z jedinců sekvenovaných pro potřeby této práce, rod *Bunocephalus* je dále rozdělený na dvě monofyletické skupiny. Jednu tvoří *B. aloikae* spolu s druhy *B. coracoideus*, *B. verrucosus* a dvěma taxony čekajícími na oficiální popis (*B. sp. negro*, *B. sp. orinoco*). Druhá skupina je tvořena druhy *B. aleuropsis*, *B. amaurus*, *B. doriae*, *B. larai* a *B. minerim*. V této práci uvedený fylogenetický strom sestavený na podkladu dat z jaderného genu *RAG1* (Obr. 6) podporuje uspořádání pouze druhé zmiňované skupiny, zatímco první skupina je v něm rozdělena do čtyř různých evolučních větví. Pro druh *B. colombianus* nejsou v literatuře dostupná data pro mitochondriální gen *COI*, ale v rámci dat z jaderných genů tento druh tvoří sesterskou větev ke všem ostatním druhům rodu *Bunocephalus*. Ve fylogenetických stromech lze také najít výraznou populační variabilitu v rámci některých druhů (*B. coracoideus* a *B. aleuropsis*) a také několik druhů, které ještě nebyly řádně popsány. Fylogenetická analýza mitochondriálního genu *COI* i jaderného genu *RAG1* jednoznačně prokázala, že jedinci sekvenovaní pro potřeby mé práce náleží ke druhu *B. aloikae*.

5.2.2 Základní karyotypová analýza

Molekulární analýzy ukazují, že čeleď Aspredinidae je nejbližší příbuznou linií ke kladu Doradoidea (skládajícího se z čeledí Doradidae a Auchenipteridae) (Sullivan et al. 2006, 2008, Kappas et al. 2016, Carvalho et al. 2018). Většina dosud studovaných zástupců Doradoidea má 58 chromozómů a předpokládá se, že z tolika chromozómů byl tvořen i ancestrální karyotyp této skupiny. Určitou variabilitu vnášejí druhy, jejichž $2n$ je 56, 60 nebo 66 (u Doradidae;

přehled viz Takagui et al. 2021) nebo 46 (u Auchenipteridae; přehled viz Machado et al. 2021). Obě čeledi zároveň zahrnují ojedinělé případy výskytu B chromozómů a pohlavních chromozómů. V tom druhém případě se jedná o systém ZW u *Tenellus trimaculatus* (Doradidae) a *Centromochlus heckelii* (Auchenipteridae) (přehledy viz Machado et al. 2021, Takagui et al. 2021). U Doradidae se u druhů s odchylkami od standardního karyotypu předpokládá fixace karyotypových změn pod výrazným vlivem genetického driftu v malých populacích s omezenou migrací (přehled viz Takagui et al. 2021). Pro úplnost je třeba zmínit, druhy sdílející $2n=58$ se často liší v zastoupení morfologických typů chromozómů a distribucí klastrů rDNA, tedy karyotypová dynamika u nich probíhá mechanismy, které nemění $2n$ (Takagui et al. 2017, Baumgärtner et al. 2018, Takagui et al. 2019, Machado et al. 2021).

Oproti karyotypovým charakteristikám u Doradoidea vykazuje osm dosud karyotypovaných zástupců čeledi Aspredinidae výraznou variabilitu v počtu chromozómů ($2n=42-74$) (Fenocchio a Swarca 2012, Ferreira 2016, 2017, 2020). Ferreira et al. (2020) diskutují, že při srovnání dosud známých karyotypových charakteristik je čeleď Asperinidae karyotypovou variabilitou nápadně podobná asijským sumcům nadčeledi Sisoroidea a naznačují tak, že navzdory molekulárním analýzám by mohly být skupiny Asperinidae a Sisoroidea sesterské a/nebo karyotypy jejich zástupců se vyvíjely pod podobnými selekčními tlaky.

Nejnižší $2n$ v rámci Asperinidae patřila jedincům z druhů *B. coracoideus* ($2n=42$) a *B. aloikae* ($2n=44$), jejichž karyotypy mají mnohem více metacentrických a submetacentrických chromozómů oproti zbývajícím šesti karyotypovaným druhům, zatímco nejvyšší $2n$ (74) náleží blízkce příbuznému širokohlavci vychrtlému *Amaralia hypsiura*. Pokud budeme vycházet z dosavadních představ o hypotetickém ancestrálním karyotypu Siluriformes ($2n=56$) (Oliveira a Gosztonyi 2000), můžeme u širokohlavců pozorovat dva základní trendy karyotypové diferenciace: (i) přestavby jako jsou fúze, které vedly k redukci $2n$ a (ii) přestavby jako centromerické rozpady a pericentrické inverze, které vedly ke zvýšení $2n$ při současném navýšení počtu akrocentrických chromozómů (Fenocchio a Swarca 2012, Ferreira et al. 2016, 2017, 2020). U čeledi Aspredinidae byly dále objeveny hned dva systémy pohlavních chromozómů – vedle již zmíněného systému $\text{♀}X_1X_1X_2X_2/\text{♂}X_1Y_1X_2Y_2$ u *B. coracoideus* se jedná také o systém $\text{♀}XX/\text{♂}X0$ nalezený u širokohlavce bičoočasého *Platystacus cotylephorus* (Ferreira et al. 2020). Jedinci *B. aloikae*, které jsem karyotipoval ve své diplomové práci, měli rozsah $2n$ v rozmezí 47–51, zatímco dva samci studovaní v práci Ferreira et al. (2020) pod označením *B. cf. aloikae* měli chromozómů 44. To může být důsledkem toho, že tito jedinci pocházejí z jiné geografické oblasti, ale to nemohu dále diskutovat, neboť přesné lokality

jedinců, které jsem analyzoval, mi nejsou známy. Může se také ale jednat o úplně jiný, ještě nepopsaný druh, jak naznačuje fylogenetická analýza mitochondriálního genu *COI* (viz Obr. 6). Ferreira et al. (2017) pozorovali podobně výrazné rozdíly v diploidním počtu chromozómů u druhu *B. coracoideus*, a tam se 2n jedinců lišilo v závislosti na místě odchytu. V jednom případě byly dokonce pozorovány rozdílné karyotypy u jedinců, kteří byli odchyceni na jedné lokalitě na řece Purus. Tato lokalita je charakteristická sezónními záplavami, které umožní migraci jedinců mezi subpopulacemi, které se po návratu vodní hladiny na původní úroveň vyvíjejí nezávisle na sobě a k jejich vzájemnému kontaktu dojde zase až při dalších záplavách (Luize et al. 2015). Data doposud získaná u *B. coracoideus* a *B. aloikae* (Ferreira et al. 2017, tato práce) dohromady naznačují, že u těchto druhů širokohlavců chromozómové přestavby zatím nefungují jako reprodukční bariéra a jedinci s odlišnými karyotypy se spolu mohou volně křížit. Takový případ je možný např. v genomech, kde proběhly recentní Rb translokace (Simakov et al. 2022). Zároveň fylogenetická analýza vylučuje, že by se jednalo o variabilitu způsobenou nesprávnou identifikací jedinců do druhu. V případech prací, kdy jsou známy pouze fylogenetické analýzy založené na *COI* (např. *B. cf. aloikae* ve Ferreira et al. 2020) však nemůžeme vyloučit, že jedinec je hybridem dvou druhů. U některých jiných na karyotypové úrovni variabilních taxonů neotropické sladkovodní ichtyofauny, typicky u druhového komplexu *Hoplias malabaricus*, již nedochází mezi karyomorfy ke genovému toku, neboť nebyly nalezeny až na jedinou výjimku (Utsunomia et al. 2014) žádné hybridní formy (Marques et al. 2013). Je možné, že v reprodukční izolaci hraje úlohu i variabilita způsobená přítomností různých systémů pohlavních chromozómů (Cioffi et al. 2017), což ostatně naznačuje i studie zaměřená na další druhový komplex, *Erythrinus erythrinus* (Souza et al. 2022). Vskutku, v některých případech přispěly chromozómové přestavby zahrnující fúze pohlavního chromozómu s autozómem k vytvoření reprodukční bariéry mezi druhy nebo k jejich rozdílné adaptaci (např. Nguyen et al. 2013, Bracewell et al. 2017, Beaudry et al. 2020, Wang et al. 2022), jako se stalo u populace koljušky tříostné, *Gasterosteus aculeatus*, žijící v Japonském moři (Kitano et al. 2009).

Ferreira et al. (2016) ve své práci navrhli, že se u *B. coracoideus* nachází mnohočetný systém pohlavních chromozómů ♀X₁X₁X₂X₂/♂X₁Y₁X₂Y₂. Tento systém v následné studii přímo nepotvrdili, ale pozorovali v meióze jedinců z jedné populace tetravalent (Ferreira et al. 2017). Systém ♀X₁X₁X₂X₂/♂X₁Y₁X₂Y₂ nebyl dosud popsán u žádného jiného rybího druhu a v rámci ostatních organismů byl dosud objeven u jednoho druhu žáby (Toups et al. 2019), jednoho rodu opic (Steinberg et al. 2014) a také jedné rostliny (Howell et al. 2009). Je ale nutné zmínit, že multivalenty vyskytující se v meióze byly nalezeny i u dalších živočichů

z amazonské oblasti, jako jsou dva druhy cichlid rodu *Symphysodon*, u nichž byl nalezen multivalent tvořený dvaceti chromozómy (Gross et al. 2009), nebo u žáby *Leptodactylus pentadactylus*, u které je tento multivalent tvořený dvanácti (Gazoni et al. 2018) nebo desíti (Noronha et al. 2020) pohlavními chromozómy v závislosti na populaci. Zdá se tedy, že amazonská oblast nějakým způsobem vytváří vhodné podmínky pro rychlou evoluci karyotypů, alespoň u některých studenokrevných obratlovců. V mojí práci byl vůbec poprvé pozorován tetravalent v meióze také u druhu *B. aloikae*.

5.2.3 Analýza chromozómů metodou CGH

Nejprve jsem použil metodu CGH, abych zjistil, jestli se v karyotypu *B. aloikae* nenacházejí cytogeneticky odlišitelné oblasti specifické pro jedno pohlaví. Prvotní výsledky na meióze samce ukázaly, že se přímo v rámci tetravalentu nachází úsek na jednom chromozómu, který je preferenčně značený sondou specifickou pro samčí pohlaví a podobný region jsem pak pozoroval také v pericentromerické oblasti jednoho mitotického chromozómu jiného samce. U jedné samice žádná taková oblast značena nebyla, ale u druhé studované samice jsem objevil hned dva chromozómy, které byly v centromerické oblasti preferenčně značené samčí specifickou sondou. Nejpravděpodobnější možností, která by toto vysvětlovala, je ta, že odlišná akumulace repetitivní DNA, kterou detekovala CGH, se nachází na autozómu (tj. nemá vliv na determinaci pohlaví a daný chromozóm není součástí systému pohlavních chromozómů) a v důsledku aneuploidie se v genomu vyskytly dva chromozómy u samice. Nemohu ovšem zcela vyloučit, že samice se dvěma samčími specifickými signály není nějakým způsobem anomální jedinec (např. po prodělaném pohlavním zvratu), ale na histologické úrovni jsem nepozoroval žádné anomálie orgánů. Definitivní řešení této situace může nabídnout pouze zopakování CGH na větším počtu samičích, ale i samčích jedinců.

5.2.4 Detailní analýza tetravalentu pomocí metod WCP a FISH

U výše zmíněných případů s mnohočetnými pohlavními chromozómy $\text{♀X}_1\text{X}_1\text{X}_2\text{X}_2/\text{♂X}_1\text{Y}_1\text{X}_2\text{Y}_2$ bylo dokázáno, že tyto chromozómy vznikly důsledkem reciprokových translokací. Ferreira et al. (2016) navrhli, že u *B. coracoideus* tento systém mohl vzniknout pomocí fúze dvou chromozómů a následnou inverzí zahrnující klastr 5S rDNA. Tuto teorii založili na pozorování velkého nepárového metacentrického chromozómu, který nesl klastr 5S rDNA, a na výskytu dalšího chromozómového páru, který také nese signál 5S rDNA. V rámci toho druhého páru je jeden homolog výrazně heterochromatinizován (na základě C-pruhování)

a na základě odlišné pozice klastru 5S rDNA mezi homology, jeden z nich prodělal inverzi. Pokud by v rámci mé studie tetraivalent pozorovaný u *B. aloikae* zahrnoval chromozómy homologní k systému pohlavních chromozómů $X_1Y_1X_2Y_2$ u *B. coracoideus*, měl bych teoreticky pozorovat podobné výsledky hybridizačních experimentů jako Ferreira et al. (2016). Abych mohl chromozómy, které tvoří tetraivalent, s jistotou identifikovat, použil jsem malovací sondy připravené jak z meiotického tetraivalentu, tak také z největšího metacentrického chromozómu v karyotypu. Malovací chromozómové sondy včetně jejich mezidruhového mapování (Zoo-FISH) již byly u ryb několikrát použity k analýze pohlavních chromozómů (např. Pansonato Alves et al. 2014, Yano et al. 2017, 2021), včetně systémů s mnohočetnými pohlavními chromozómy (např. de Oliveira et al. 2018, Deon et al. 2022b). Původně jsem očekával, že v souladu s pozorováními u *B. coracoideus* (Ferreira et al. 2016, 2017), nepárový metacentrický chromozóm bude zahrnut do tetraivalentu. Namísto očekávané kolokalizace malovacích sond jsem však zjistil, že tyto sondy značí ve většině případů jiné chromozómy a v případech, kdy kolokalizují (Obr. 8C, 8E), se nejedná o metacentrické chromozómy. Na preparátu s meiotickými chromozómy, kde proběhla kolokalizace dvou malovacích sond, jsem na metafázích druhého meiotického dělení (metafáze II) dokumentoval nondisjunkci tohoto chromozómu, neboť některé sesterské metafáze II obsahovaly žádný nebo oba homology. Právě časté nondisjunkce mohou být vedle přestaveb důvodem, proč jsem u jedinců *B. aloikae* pozoroval natolik rozdílné diploidní počty chromozómů, což jako jednu z možností navrhli pro *B. coracoideus* i Ferreira et al. (2017). Sonda z metacentrického chromozómu nejčastěji značila tři chromozómy, které spolu párovali v meióze ve formě trivalentu, což je důkaz rozpadu chromozómů, které se uvádí jako častý mechanismus vedoucí k vyššímu počtu akrocentrických chromozómů oproti ancestrálnímu karyotypu sumců (viz výše). V jednom případě (Obr. 8I) sonda značila čtyři chromozómy, z toho dva si byly morfologicky podobné, proto je možné, že se v tomto případě jedná také o aneuploidii. Sonda z tetraivalentu značila standardně čtyři chromozómy, ale v některých případech jsem pozoroval, že sonda nehybridizuje v centromerické oblasti nebo značí jen polovinu chromozómu (Obr. 8J). V jednom případě došlo k inzerci části chromozómu z jednoho páru do centrální části dlouhých ramének jiného chromozómu (Obr. 8B). V meióze jsem pak pozoroval, že tyto tři chromozómy spolu párují ve formě trivalentu, zatímco druhý pár značený sondou z tetraivalentu tvoří samostatný bivalent. To naznačuje, že u jedinců proběhly různé nezávislé přestavby jako jsou centrické fúze a translokace, které měly za následek párování zúčastněných chromozómů do multivalentů v prvním meiotickém dělení. Tyto výsledky u *B. aloikae* tedy spíše naznačují vnitropopulační polymorfismus různých typů přestaveb, který mohl vzniknout při (opakovaném) křížení jedinců

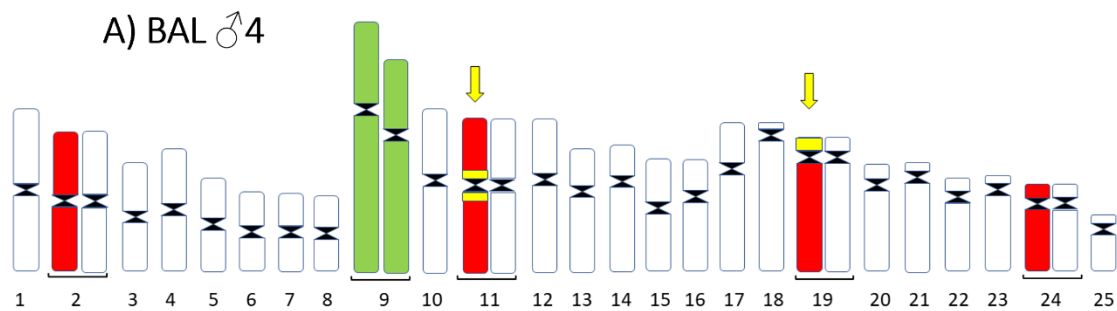
s různými karyotypy. Ačkoliv takovýmto způsobem mohou vznikat i nové systémy pohlavních chromozómů, např. při křížení dvou druhů živorodek rodu *Xiphophorus* (Franchini et al. 2019) nebo u žáby *G. rugosa* (Miura et al. 2022), moje data naznačují u *B. aloikae* spíše mnohočetné komplexní přestavby a zda tyto zahrnují i pohlavní chromozómy, nedokážu s jistotou určit.

Abych mohl lépe objasnit evoluci přestaveb u *B. aloikae*, mapoval jsem na chromozómy telomerické sekvence a 18S rDNA. Přítomnost klastru 18S byla pozorována na pohlavních chromozómech některých ryb (např. Cioffi a Bertollo 2010, Yano et al. 2017, Scacchetti et al. 2015; přehled viz Sember et al. 2021). V meióze sonda značila dva signály na tetraivalentu a na mitotických chromozómech značila nejčastěji dva morfologicky odlišné chromozómy. U dvou jedinců jsem mapoval klastry 18S rDNA na preparáty použité také pro WCP. Signály 18S rDNA se v obou případech nacházely na chromozómech značených sondou z tetraivalentu. Tím jsem dokázal jejich vzájemnou homologii a potvrdil, že u tohoto páru v minulosti došlo k reciproké translokaci s jiným párem, což mohlo být příčinou vzniku tetraivalentu. Jedním z preparátů, které jsem recykloval pro rDNA FISH, byla samice, u níž sonda z tetraivalentu značila dva chromozómy jen z poloviny, což indikovalo fúzi chromozómů s jiným chromozómovým párem než v ostatních případech. U této samice mapovaly klastry rDNA právě na tyto fúzované chromozómy (Obr. 8J). Je pozoruhodné, že se nadpočetné signály 18S rDNA nacházely na chromozómech, které také vznikly fúzí chromozómů a následnými extenzivními intrachromozómovými přestavbami (patrně inverzemi), u nich došlo k „promíchání“ genetického obsahu dvou původně nezávislých vazebných skupin tak, že obě malovací sondy hybridizovaly shodně po celé délce těchto chromozómů (Obr. 8C, 8E). Podobnou situaci s komplexními přestavbami popisuje Simakov et al. (2022). Klastry rDNA se velmi často účastní přestaveb jako jsou fúze (Sember et al. 2015, 2020, Barros et al. 2017, Deon et al. 2020). Soudí se, že důvodem je jejich organizace do dlouhých tandemově uspořádaných úseků a vysoká míra jejich transkripce (Schöfer a Weipoltshammer 2018), což vede ke vzniku dlouhých rozvolněných euchromatinových úseků náchylných ke zlomům a ektopické rekombinaci (Berthelot et al. 2015, Potapova a Gerton 2019, Warmerdam a Wolthuis 2019).

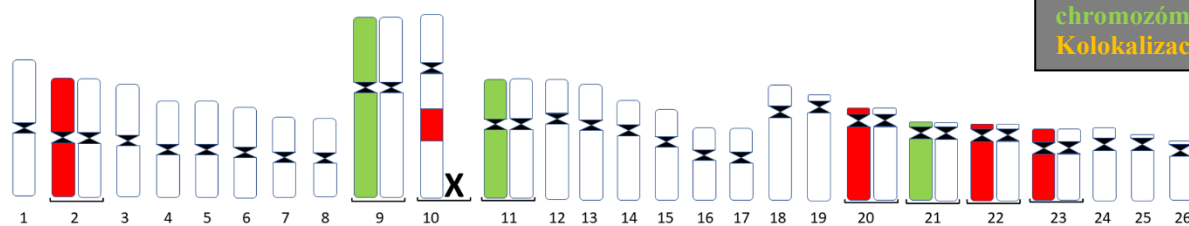
Značením telomer na mitotických chromozómech jsem chtěl odhalit přestavby zahrnující koncové části chromozómů, jako jsou fúze, translokace nebo inverze. V takovém případě může někdy část telomerických sekvencí zůstat v oblasti zlomu jako ITS (viz Úvod). Signály ITS byly objeveny např. na chromozómu Y u mnohočetného pohlavního systému X_1X_2Y u trahira *Erythrinus erythrinus* (Cioffi a Bertollo 2010), ale v polovině případů, kdy byla použita telomerická FISH pro analýzu mnohočetných pohlavních chromozómů, které vznikly fúzemi, nebyly žádné ITS odhaleny (přehled viz Sember et al. 2021). Důvody absence

ITS v takových případech mohou být (i) postupná genetická degenerace telomerických sekvencí z důvodu, že přestavba proběhla již relativně dávno v rámci evoluce (ii) k eliminaci telomerických repetitiv došlo již během procesu přestavby (Slijepcevic 1998, Ruiz-Herrera 2008). U *B. aloikae* jsem signály ITS našel u všech jedinců s výjimkou jednoho, ale žádný rozdíl v počtu ITS mezi samci a samicemi jsem nepozoroval. Jejich počty spíše korelovaly s rozdílnými diploidními počty chromozómů jednotlivých jedinců a jsou tedy pravděpodobně výsledkem přestaveb vzniklých při křížení jedinců s různými karyotypy. Rozdílné počty signálů ITS našli i Ferreira et al. (2017) u variabilní populace z řeky Purus, což přikládají opětovným kontaktům různých subpopulací v době záplav (jak jsem již popisoval výše).

Obr. 8 (na následující straně) – Schématické znázornění výsledků WCP a 18S rDNA FISH. Žluté šipky ukazují na chromozómy se signálem 18S rDNA. Chromozómy značené malovacími sondami jsou vždy vyobrazeny se svým homologem (pro zjednodušení jsem chromozómy seřadil dle karyotypů z Obr. 3, i když se zjevně nejedná o homology, jelikož konvenční cytogenetika často nedokáže odhalit chromozómové přestavby). Pokud daný chromozóm postrádá homologa do páru, je tato skutečnost znázorněna jako křížek (X). Signály 18S rDNA se stabilně nacházely na chromozómech zúčastněných ve tvorbě tetraivalentu. Zajímavé je, že nadpočetné signály rDNA se nacházely na chromozómech, které vznikly fúzí částí chromozómu z tetraivalentu a chromozómu značeného sondou připravenou z metacentrického chromozómu (C,E).

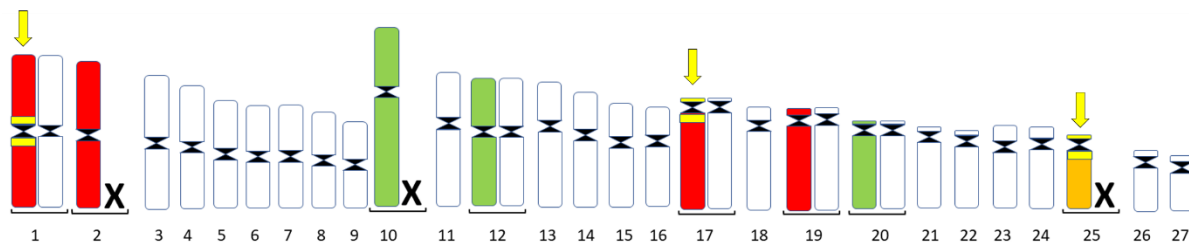


B) BAL ♂5

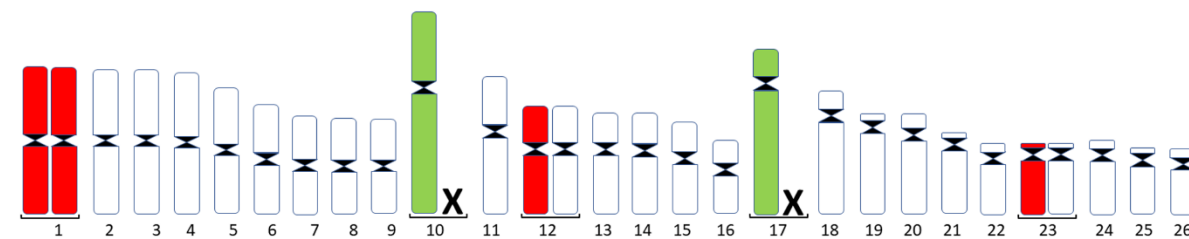


18S rDNA
Sondy WCP:
Tetralent
Metacentrický
chromozóm
Kolokalizace

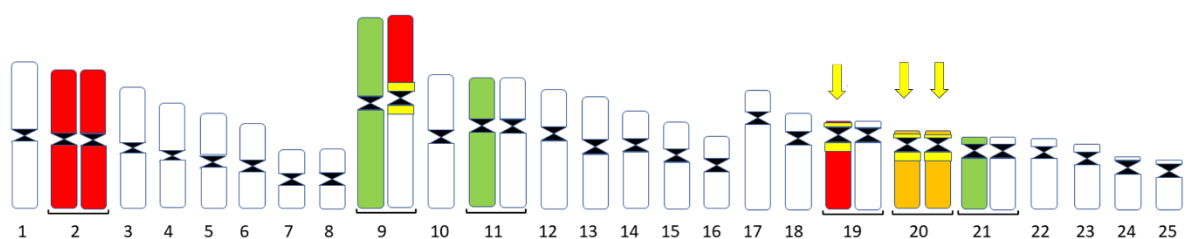
C) BAL ♂7



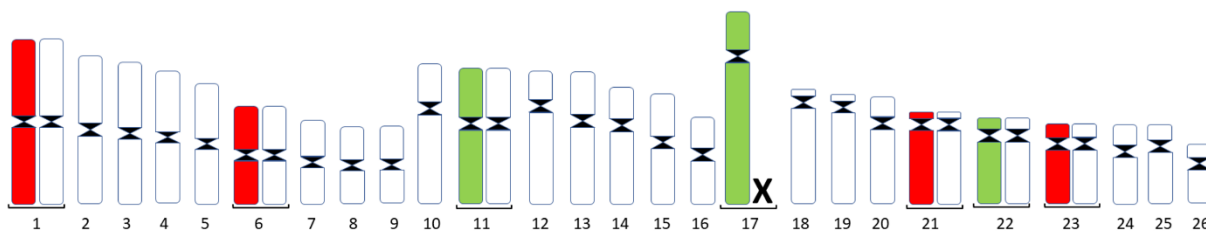
D) BAL ♂9



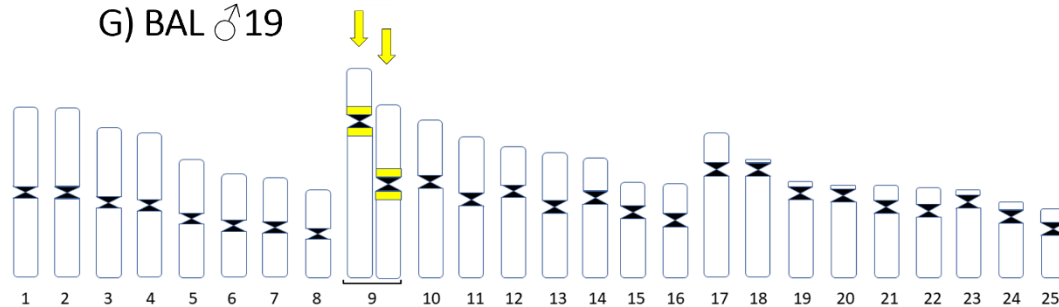
E) BAL ♂10



F) BAL ♂16

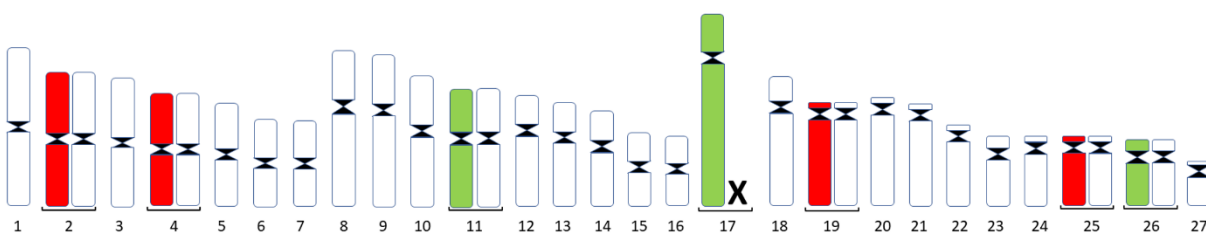


G) BAL ♂19

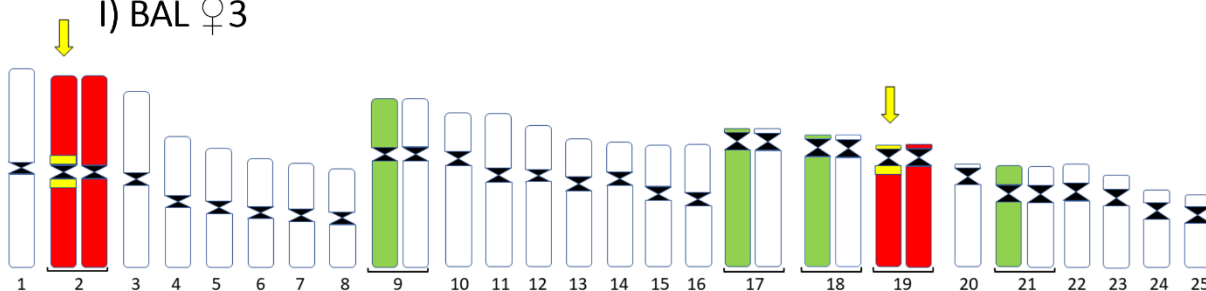


18S rDNA
Sondy WCP:
Tetrivalent
Metacentrický
chromozóm
Kolokalizace

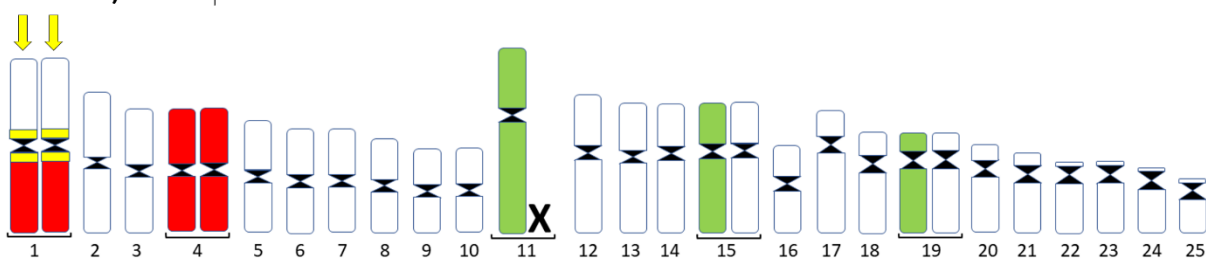
H) BAL ♂20



I) BAL ♀3



J) BAL ♀8



6. Závěr

V rámci této práce jsem studoval evoluci pohlavních chromozómů u dvou taxonů kostnatých ryb, konkrétně halančíků rodu *Nothobranchius* a širokohlavců rodu *Bunocephalus*. Jednalo se o druhy *N. furzeri* a *N. kadleci* a *B. aloikae*. U halančíků jsem zjistil, že i přes heteromorfii pohlavních chromozómů XY a přítomnost oblasti diferenciace na chromozómu Y (obojí cytogeneticky ověřeno mými kolegy v paralelních experimentech), úsek diferenciace byl pod rozlišovací schopnosti metody CGH, která však nepřímou může sloužit k identifikaci chromozómu Y, jelikož to je jediný chromozóm s nápadnou delecí pericentromerických repetic. Pohlavní chromozómy párovaly standardně v meiotické profázi I, s přispěním synaptického přizpůsobení. Náznaky opožděného párování jsem pozoroval jen v několika případech u jednoho samce z populace *N. furzeri* (MZCS-222). U samic téže populace jsem pozoroval v pachytene malý nadpočetný útvar (chromozóm nebo bivalent), který se ve studovaných somatických tkáních nevyskytoval a jeho výskyt a význam umožní objasnit pouze rozsáhlejší budoucí studie. Distribuci crossing-overu, kterou jsem studoval pomocí imunodetekce proteinu MLH1, byla u obou pohlaví podobná, ale u samic bylo méně míst lokalizováno v koncových oblastech bivalentů. Tato situace může naznačovat určitou míru heterochiazmie a její možný vliv na evoluci pohlavních chromozómů XY. Tuto hypotézu podpořila analýza kolegů pomocí MANOVA (tato analýza není součástí mé práce).

Analýzovaní jedinci širokohlavců byli identifikováni jako *Bunocephalus aloikae* a jejich karyotypy se mezi jedinci výrazně lišily v počtu chromozómů ($2n = 47 - 51$). Přítomnost tetraivalentu v meiózách některých samců naznačovala přítomnost neobvyklého systému pohlavních chromozómů $X_1Y_1X_2Y_2$, popsaného dříve u blízkého příbuzného druhu *B. coracoideus*. Detailnější analýzou pomocí hybridizace malovacích chromozómových sond a repetitivní DNA jsem ovšem odhalil značnou dynamiku přestaveb, především translokací, fúzí a centrických rozpadů, a také aneuploidií. V tomto kontextu se jeví jako více pravděpodobné, že tetraivalent u samců je výsledkem této dynamiky a jedná se o chromozómový polymorfismus nevázaný na pohlaví. Na druhou stranu, CGH odhalila, že právě na jednom chromozómu ze samčího tetraivalentu se nachází úsek preferenčně značený samčí sondou, který byl nalezený i na jednom chromozómu v rámci mitotického dělení jiného samce. Výsledky na samičích chromozómech však nepřinesly jednoznačné potvrzení, že by signály u samců skutečně reprezentovaly oblast diferenciace samčí specifické oblasti na pohlavním chromozómu. Analýza většího počtu jedinců bude nezbytná pro rozluštění této problematiky.

Během této práce jsem si osvojil různé cytogenetické metody a fylogenetickou analýzu a naučil se pracovat v týmu českých a zahraničních kolegů. Můj výzkum pohlavních chromozómů halančíků byl součástí rozsáhlé cytogenetické analýzy (Štundlová et al. 2022; v revizi v časopisu *Chromosome Research*), která odhalila, že systém pohlavních chromozómů XY u *N. furzeri* je oproti dřívějším představám vlastně heteromorfní a vznikl dříve v evoluci, než se předpokládalo, neboť ho sdílí i sesterský druh *N. kadleci*. Naše data ukázala důležitost příspěvku cytogenetického výzkumu pro ověření představ poskytnutých genomickými daty. Konkrétně moje výsledky dále přispěly k pochopení, jak pohlavní chromozómy párují v meióze a kde u nich probíhá crossing over. Tato data pomohla při formování hypotézy o evoluci suprese rekombinace na těchto pohlavních chromozómech. Můj výzkum na širokohlavcích zase ukázal, že je potřeba u tohoto rodu studovat karyotypovou variabilitu opravdu na detailní cytogenetické úrovni (např. pomocí mapování syntenních bloků malovacími sondami) a na dostatečném množství jedinců, neboť dynamika přestaveb je zde příliš komplikovaná a interpretace založené na konvenčním karyotypování a mapování běžně používaných markerů mohou být nedostatečné. Příkladem je unikátní systém pohlavních chromozómů $X_1Y_1X_2Y_2$ u *B. coracoideus*, který by mohl existovat i u mnou studovaného *B. aloikae*, ale mé analýzy naznačují, že je více pravděpodobné, že se jedná o chromozómový polymorfismus. Moje práce tak odhalila řadu fenoménů u obou studovaných taxonů, které si určitě zaslouží další podrobný výzkum.

7. Seznam literatury

Abbott JK, Nordén AK, Hansson B. (2017). Sex chromosome evolution: Historical insights and future perspectives. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1854).

Adolfi MC, Herpin A, Scharl M. (2021). The replaceable master of sex determination: bottom-up hypothesis revisited. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1832), 20200090

Alavattam KG, Abe H, Sakashita A, Namekawa SH. (2018). Chromosome spread analyses of meiotic sex chromosome inactivation. In *X-Chromosome Inactivation* (pp. 113-129). Humana, New York, NY.

Albert JS, Tagliacollo VA, Dagosta F. (2020). Diversification of Neotropical freshwater fishes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51, 27-53.

Al-Rikabi A, Liehr LB, Liehr T. (2020). Glassneedle-based chromosome microdissection—How to set up probes for molecular cytogenetics. *Video J. Clin. Res*, 2, 1-6.

Anderson JL, Rodríguez M, Braasch I, Amores A, Hohenlohe P, Batzel P, Postlethwait, JH. (2012). Multiple sex-associated regions and a putative sex chromosome in zebra fish revealed by RAD mapping and population genomics. *PloSone*, 7(7), e40701.

Arai R. (2011): *Fish Karyotypes: a Check List*. 1st edition. Springer, Tokyo, Japan. 340 pp.

Araya-Jaime C, Serrano ÉA, de Andrade Silva DMZ, Yamashita M, Iwai T, Oliveira C, Foresti F. (2015). Surface-spreading technique of meiotic cells and immunodetection of synaptonemal complex proteins in teleostean fishes. *Molecular Cytogenetics*, 8(1), 1-6.

Auvinet J, Graça P, Dettai A, Amores A, Postlethwait JH, Detrich HW, et al. (2020). Multiple independent chromosomal fusions accompanied the radiation of the Antarctic teleost genus *Trematomus* (Notothenioidei: Nototheniidae). *BMC evolutionary biology*, 20(1), 1-14.

Bachtrog D. (2013). Y-chromosome evolution: Emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Reviews Genetics*, 14(2), 113–124.

Bachtrog D, Mank JE, Peichel CL, Kirkpatrick M, Otto SP, Ashman TL, et al. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biology*, 12(7), 1–13.

Barby F, Ráb P, Lavoue S, Ezaz T, Bertollo LAC, Kilian A, et al. (2018): From chromosomes to genome: insights into the evolutionary relationships and biogeography of Old World knifefishes (Notopteridae; Osteoglossiformes). *Genes* 9: 306.

Baroiller JF, D’Cotta H, Saillant E. (2009). Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sexual Development*, 3, 118–135.

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.

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.

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

Baumgärtner L, Paiz LM, Takagui FH, Lui RL, Moreira-Filho O, Giuliano-Caetano L, et al. (2018). Comparative cytogenetics analysis on five genera of thorny catfish (Siluriformes, Doradidae): Chromosome review in the family and inferences about chromosomal evolution integrated with phylogenetic proposals. *Zebrafish*, 15(3), 270-278.

Beaudry FE, Barrett SC, Wright SI. (2020). Ancestral and neo-sex chromosomes contribute to population divergence in a dioecious plant. *Evolution*, 74(2), 256-269.

Berg PR, Star B, Pampoulie C, Bradbury IR, Bentzen P, Hutchings JA, et al. (2017). Trans-oceanic genomic divergence of Atlantic cod ecotypes is associated with large inversions. *Heredity*, 119(6), 418-428.

Bergero R, Gardner J, Bader B, Yong L, Charlesworth D. (2019). Exaggerated heterochiasmy in a fish with sex-linked male coloration polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(14), 6924-6931.

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 LA, Fontes MS, Fenocchio AS, Cano J. (1997). The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome research*, 5(7), 493-499.

Bertollo LAC, Oliveira C, Molina WF, Margarido VP, Fontes MS, Pastori MC, et al. (2004). Chromosome evolution in the erythrinid fish, *Erythrinus erythrinus* (Teleostei: Characiformes). *Heredity*, 93(2), 228–233.

Bertollo LAC, Cioffi MB, Moreira-Filho O. (2015): Direct chromosome preparation from freshwater teleost fishes. In: *Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and*

Teleosts). Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF (eds), pp. 21–26, *CRC Press*, Enfield, BocaRaton, FL.

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

Bracewell RR, Bentz BJ, Sullivan BT, Good JM. (2017). Rapid neo-sex chromosome evolution and incipient speciation in a major forest pest. *Nature communications*, 8(1), 1-14.

Bull JJ. (1983). *Evolution of Sex Determining Mechanisms* (California/USA, Benjamin/CummingsPublishing).

Calegari BB, Vari RP, Reis RE. (2019). Phylogenetic systematics of the driftwood catfishes (Siluriformes: Auchenipteridae): a combined morphological and molecular analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 187(3), 661-773.

Capel B. (2017). Vertebrate sex determination: Evolutionary plasticity of a fundamental switch. *NatureReviewsGenetics*, 18(11), 675–689.

Cardoso AL, Venturelli NB, da Cruz I, de Sá Patroni FM, de Moraes D, de Oliveira RA, et al. (2022). Meiotic behavior, transmission and active genes of B chromosomes in the cichlid *Astatotilapia latifasciata*: new clues about nature, evolution and maintenance of accessory elements. *Molecular Genetics and Genomics*, 297(4), 1151-1167.

Carrasco LA, Penman DJ, Bromage N. (1999). Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. *Aquaculture*, 173(1-4), 207-218.

Carvalho TP, Arce M, Reis RE, Sabaj MH. (2018). Molecular phylogeny of Banjo catfishes (Ostariophysi: Siluriformes: Aspredinidae): A continental radiation in South American freshwaters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 459-467.

Castro JP, Hattori RS, Yoshinaga TT, de Silva A DMZ, Foresti F, Santos MH, Almeida MC Artoni RF. (2018). Differential Expression of *dmrt1* in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) Is Correlated with B Chromosome Occurrence. *Zebrafish*, 16(2), 182–188.

Cayuela H, Rougemont Q, Laporte M, Mérot C, Normandeau E, Dorant Y, et al. (2020). Shared ancestral polymorphisms and chromosomal rearrangements as potential drivers of local adaptation in a marine fish. *Molecular Ecology*, 29(13), 2379-2398.

Cellerino A, Valenzano DR, Reichard M. (2016). From the bush to the bench: the annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. *Biological Reviews*, 91(2), 511-533.

- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G.** (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95(2), 118–128.
- Charlesworth D.** (2019). Young sex chromosomes in plants and animals. *New Phytologist*, 224(3), 1095-1107.
- Charlesworth D.** (2021). When and how do sex-linked regions become sex chromosomes?. *Evolution*, 75(3), 569-581.
- Charlesworth D, Bergero R, Graham C, Gardner J, Keegan K.** (2021) How did the guppy Y chromosome evolve? *PLoS Genet* 17(8):e1009704.
- Chen J, Fu Y, Xiang D, Zhao G, Long H, Liu J, Yu Q.** (2008). XX/XY heteromorphic sex chromosome systems in two bullhead catfish species, *Liobagrus marginatus* and *L. styani* (Amblycipitidae, Siluriformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 122(2), 169-174.
- Chen S, Zhang G, Shao C, Huang Q, Liu G, Zhang P, et al.** (2014). Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 46(3), 253–260.
- 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, Bertollo LAC.** (2012). Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. *Repetitive DNA*, 7, 197-221.
- Cioffi MB, Liehr T, Trifonov V, Molina WF, Bertollo LAC.** (2013). Independent sex chromosome evolution in lower vertebrates: a molecular cytogenetic overview in the Erythrinidae fish family. *Cytogenetic and Genome Research*, 141(2-3), 186-194.
- Cioffi MB, Yano CF, Sember A, Bertollo LAC.** (2017). Chromosome evolution in lower vertebrates: Sex chromosomes in neotropical fishes. *Genes*, 8(10), 1–14.
- Clark FE, Kocher TD.** (2019). Changing sex for selfish gain: B chromosomes of Lake Malawi cichlid fish. *Scientific Reports*, 9(1), 1-10.
- Clark FE, Akera T.** (2021). Unravelling the mystery of female meiotic drive: where we are. *Open Biology*, 11(9), 210074.
- Correns C.** (1903) Weitere Beiträge zur Kenntnis der dominierenden Merkmale und der Mosaikbildung der Bastarde. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 21, 195–201.
- Cremer T, Cremer M.** (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3), a003889.
- Cui R, Medeiros T, Willemsen D, Iasi LNM, Collier GE, Graef M, et al.** (2019): Relaxed Selection Limits Lifespan by Increasing Mutation Load. *Cell* 178: 385- 399.

Dagosta FC, de Pinna MC. (2019). The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 431:1–163

Damas J, Corbo M, Lewin HA. (2021): Vertebrate chromosome evolution. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 9: 1–27.

Darolti I, Wright AE, Sandkam BA, Morris J, Bloch NI, Farré M, et al. (2019). Extreme heterogeneity in sex chromosome differentiation and dosage compensation in livebearers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(38), 19031-19036.

de Barros LC, Piscor D, Parise-Maltempo PP, Feldberg E. (2018). Differentiation and Evolution of the W Chromosome in the Fish Species of *Megaleporinus* (Characiformes, Anostomidae). *Sexual Development*, (July).

de Brito Ferreira GE, Barbosa LM, Prizon-Nakajima AC, de Paiva S, de Rossi Vieira MM, Gallo RB, et al. (2019). Constitutive heterochromatin heteromorphism in the Neotropical armored catfish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraguay River basin (Mato Grosso do Sul, Brazil). *Comparative Cytogenetics*, 13(1), 27.

de Oliveira EA, Sember A, Bertollo LAC, Yano CF, Ezaz T, Moreira-Filho O, et al. (2018). Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY1Y2 system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). *Chromosoma*, 127(1), 115-128.

de Oliveira EHC, Neusser M, Müller S. (2012). Chromosome evolution in new world monkeys (Platyrrhini). *Cytogenetic and Genome Research*, 137(2-4), 259-272.

de Oliveira RR, Feldberg E, DosAnjos MB, Zuanon J. (2008). Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica*, 134(2), 243-249.

de Souza Machado A, Kowalski S, Paiz LM, Margarido VP, Blanco DR, Venere PC, et al. (2021). Comparative cytogenetic analysis between species of *Auchenipterus* and *Entomocorus* (Siluriformes, Auchenipteridae). *Caryologia*, 74(2), 89-101.

Deakin JE, Potter S, O'Neill R, Ruiz-Herrera A, Cioffi MB, Eldridge MD, et al. (2019). Chromosomics: Bridging the gap between genomes and chromosomes. *Genes*, 10(8), 627.

Deon GA, Glugoski L, Vicari MR, Nogaroto V, Sassi FDMC, Cioffi MDB, et al. (2020). Highly rearranged karyotypes and multiple sex chromosome systems in armored catfishes from the genus *Harttia* (Teleostei, Siluriformes). *Genes*, 11(11), 1366.

Deon GA, Glugoski L, Sassi FDMC, Hatanaka T, Nogaroto V, Bertollo LAC, et al. (2022a). Chromosomal rearrangements and origin of the multiple XX/XY1Y2 sex chromosome system in *Harttia* species (Siluriformes: Loricariidae). *Frontiers in Genetics*, 13.

Deon GA, Glugoski L, Hatanaka T, Sassi FDMC, Nogaroto V, Bertollo LAC, et al. (2022b). Evolutionary breakpoint regions and chromosomal remodeling in *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae) species diversification. *Genetics and Molecular Biology*, 45.

Devlin RH, Nagahama Y. (2002): Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191–364.

Dixon G, Kitano J, Kirkpatrick M. (2019). The origin of a new sex chromosome by introgression between two stickleback fishes. *Molecular biology and evolution*, 36(1), 28-38.

Doležalková M, Sember A, Marec F, Ráb P, Plötner J, Choleva L. (2016). Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclinal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*?. *BMC genetics*, 17(1), 1-9.

Do Nascimento VD, Coelho KA, Nogaroto V, de Almeida RB, Ziemniczak K, Centofante L, et al. (2018): Do multiple karyomorphs and population genetics of fresh water darter characines (*Apareiodonaffinis*) indicate chromosomal speciation? *Zool. Anz.* 272: 93–103.

Edvardsen RB, Wallerman O, Furmanek T, Kleppe L, Jern P, Wallberg A, et al. (2022). Heterochiasmy and the establishment of *gsdf* as a novel sex determining gene in Atlantic halibut. *PLoS genetics*, 18(2), e1010011.

El Taher A, Ronco F, Matschiner M, Salzburger W, Boehne A. (2021). Dynamics of sex chromosome evolution in a rapid radiation of cichlid fishes. *bioRxiv*, 2020-10.

Ene AC. (2003). Chromosomal polymorphism in the goby *Neogobius eurycephalus* (Perciformes: Gobiidae). *Marine Biology*, 142(3), 583-588.

Ewulonu UK, Haas R, Turner BJ. (1985): A multiple sex chromosome system in the annual killifish, *Nothobranchius guentheri*. *Copeia* 2: 503–508.

Ezaz T, Stiglec R, Veyrunes F, Graves JAM. (2006). Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Current Biology*, 16(17), R736-R743.

Favarato RM, Ribeiro LB, Ota RP, Nakayama CM, Feldberg E. (2019). Cytogenetic characterization of two *Metynnis* species (Characiformes, Serrasalminidae) reveals B chromosomes restricted to the females. *Cytogenetic and Genome Research*, 158(1), 38-45.

Fenocchio AS, Swarça AC. (2012). Cytogenetic description of *Bunocephalus doriae* Boulenger, 1902 (Siluriformes: Aspredinidae) from the Paraná River (Misiones, Argentina). *Neotropical Ichthyology*, 10, 461-464.

Ferchaud AL, Mérot C, Normandeau E, Ragoussis J, Babin C, Djambazian H, et al. (2022). Chromosome-level assembly reveals a putative Y-autosomal fusion in the sex determination system of the Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *G3*, *12*(1), jkab376.

Ferreira M, Kavalco KF, de Almeida-Toledo LF, Garcia C. (2014). Cryptic diversity between two *Imparfinis* species (Siluriformes, Heptapteridae) by cytogenetic analysis and DNA barcoding. *Zebrafish*, *11*(4), 306-317.

Ferreira M, Garcia C, Matoso DA, de Jesus IS, Feldberg E. (2016). A new multiple sex chromosome system X1X1X2X2/X1Y1X2Y2 in Siluriformes: cytogenetic characterization of *Bunocephalus coracoideus* (Aspredinidae). *Genetica*, *144*(5), 591–599.

Ferreira M, Garcia C, Matoso DA, de Jesus IS, Cioffi MDB, Bertollo LA, et al. (2017). The *Bunocephalus coracoideus* species complex (Siluriformes, Aspredinidae). Signs of a speciation process through chromosomal, genetic and ecological diversity. *Frontiers in genetics*, *8*, 120.

Ferreira M, de Jesus IS, Viana PF, Garcia C, Matoso DA, Cioffi MB, et al. (2020). Chromosomal evolution in Aspredinidae (Teleostei, Siluriformes): insights on intra-and interspecific relationships with related groups. *Cytogenetic and Genome Research*, *160*(9), 539-553.

Ferreira-Neto M, Artoni RF, Vicari MR, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Bakkali M, et al. (2012). Three sympatric karyomorphs in the fish *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae) do not seem to hybridize in natural populations. *Comparative Cytogenetics*, *6*(1), 29.

Franchini P, Jones JC, Xiong P, Kneitz S, Gompert Z, Warren WC, et al. (2018). Long-term experimental hybridisation results in the evolution of a new sex chromosome in swordtail fish. *Nature communications*, *9*(1), 1-11.

Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Van der Laan, R. (eds) (2022). ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>)

Furman BL, Metzger DC, Darolti I, Wright AE, Sandkam BA, Almeida P, et al. (2020). Sex chromosome evolution: so many exceptions to the rules. *Genome biology and evolution*, *12*(6), 750-763.

Furman BL, Cauret CM, Knytl M, Song XY, Premachandra T, Ofori-Boateng C, et al. (2020). A frog with three sex chromosomes that co-mingle together in nature: *Xenopus*

tropicalis has a degenerate W and a Y that evolved from a Z chromosome. *PLoS genetics*, 16(11), e1009121.

Furness AI. (2016). The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. *Biological Reviews*, 91(3), 796-812.

Gamble T, Coryell J, Ezaz T, Lynch J, Scantlebury DP, Zarkower D. (2015). Restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) reveals an extraordinary number of transitions among gecko sex-determining systems. *Molecular Biology and Evolution*, 32(5), 1296-1309.

Gammerding WJ, Kocher TD. (2018). Unusual Diversity of Sex Chromosomes in African Cichlid Fishes. *Genes*, 9(10), 480.

Garrido-Ramos MA. (2017). Satellite DNA: An evolving topic. *Genes*, 8(9).

Gazoni T, Haddad CFB, Narimatsu H, Cabral-de-Mello DC, Lyra ML, Parise-Maltempi PP. (2018). More sex chromosomes than autosomes in the Amazonian frog *Leptodactylus pentadactylus*. *Chromosoma*, 127(2), 269-278.

Glasauer SM, Neuhauss SC. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular genetics and genomics*, 289(6), 1045-1060.

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.

Godwin J, Roberts R. (2018). Environmental and genetic sex determining mechanisms in fishes. In *Transitions between sexual systems* (pp. 311-344). Springer, Cham.

Godwin JR. (1994) Behavioral aspects of protandrous sex change in the anemone fish *Amphiprion melanopus* and endocrine correlates. *Anim Behav* 48:551–567

Goes CAG, Daniel SN, Piva LH, Yasui GS, Artoni RF, Hashimoto DT, et al. (2020): Cytogenetic markers as a tool for characterization of hybrids of *Astyanax Baird&Girard, 1854* and *Hyphess obrycon 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.

Gross MC, Feldberg E, Cella DM, Schneider MC, Schneider CH, Porto JIR, Martins C. (2009). Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and a report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. *Heredity*, 102(5), 435-441.

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 1*. pp. 35–63.

Harewood L, Fraser P. (2014). The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. *Human molecular genetics*, 23(R1), R76-R82.

Hattori RS, Gould RJ, Fujioka T, Saito T, Kurita J, Strüssmann CA, et al. (2007). Temperature-Dependent Sex Determination in Hd-rR Medaka *Oryzias latipes*: Gender Sensitivity, Thermal Threshold, Critical Period and *DMRT1*. *Sex Determination*, 1, 138–146.

Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, de Almeida-Toledo LF. (2008). Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 121(1), 55-58.

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(2), 391–400.

Herpin A, Schartl M. (2011). *Dmrt1* genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *The FEBS journal*, 278(7), 1010-1019.

Herpin A, Schartl M. (2015). Plasticity of gene-regulatory networks controlling sex determination: of masters, slaves, usual suspects, newcomers, and usurpators. *EMBO Reports*, 16, 1260–1274.

Hillis DM, Dixon MT. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411–453.

Holleley CE, O'Meally D, Sarre SD, Marshall Graves JA, Ezaz T, Matsubara K, et al. (2015). Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature*, 523(7558), 79-82.

Howell EC, Armstrong SJ, Filatov DA. (2009). Evolution of neo-sex chromosomes in *Silene dioica*. *Genetics*, 182(4), 1109-1115.

Ieda R, Hosoya S, Tajima S, Atsumi K, Kamiya T, Nozawa A, et al. (2018). Identification of the sex-determining locus in grass puffer (*Takifugu niphobles*) provides evidence for sex-chromosome turnover in a subset of *Takifugu* species. *PLoS One*, 13(1), e0190635.

Imarazene B, Du K, Beille S, Jouanno E, Feron R, Pan Q, et al. (2021). A supernumerary “B-sex” chromosome drives male sex determination in the Pachón cave fish, *Astyanax mexicanus*. *Current Biology*, 31(21), 4800-4809.

Jay P, Tezenas E, Véber A, Giraud T. (2022). Sheltering of deleterious mutations explains the step wise extension of recombination suppression on sex chromosomes and other supergenes. *PLoS Biology*, 20(7), e3001698.

Jeffries DL, Lavanchy G, Sermier R, Sredl MJ, Miura I, Borzée A, et al. (2018). A rapid rate of sex-chromosome turnover and non-random transitions in true frogs. *Nature Communications*, 9(1), 1-11.

Jeffries DL, Gerchen JF, Scharmann M, Pannell J. (2021). A neutral model for the loss of recombination on sex chromosomes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 376, 20200096.

Jones RN, González-Sánchez M, González-García MBMJ P, Vega JM. (2008). Chromosomes with a life of their own. *Cytogenetic and Genome Research*, 120, 265–280.

Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, et al. (2012). A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics*, 8(7), 815–826.

Kappas I, Vittas S, Pantzartzi CN, Drosopoulou E, Scouras ZG. (2016). A time-calibrated mitogenome phylogeny of catfish (Teleostei: Siluriformes). *PLoS One*, 11(12), e0166988.

King M. (1993): *Species Evolution: The Role of Chromosome Change*. Cambridge University Press: Cambridge, UK 1993. ISBN: 0521353084.

Kitano J, Ross JA, Mori S, Kume M, Jones FC, Chan YF, et al. (2009): A role for a neo-sex chromosome in stickleback speciation. *Nature* 461: 1079–1083.

Knytl M, Kalous L, Symonová R, Rylková K, Ráb P. (2013). Chromosome studies of European cyprinid fishes: cross-species painting reveals natural allotetraploid origin of a *Carassius* female with 206 chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 139(4), 276-283.

Kochakpour N, Moens PB. (2008). Sex-specific crossover patterns in Zebrafish (*Danio rerio*). *Heredity*, 100(5), 489-495.

Kondo M, Nanda I, Schmid M, Scharl M. (2009). Sex determination and sex chromosome evolution: insights from medaka. *Sexual Development*, 3(2-3), 88-98.

Kratochvíl L, Stöck M, Rovatsos M, Bullejos M, Herpin A, Jeffries DL, et al. (2021). Expanding the classical paradigm: what we have learnt from vertebrates about sex chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1833), 20200097.

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, 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.

Lenormand T, Roze D. (2022). Y recombination arrest and degeneration in the absence of sexual dimorphism. *Science* 2022;375: 663–666.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA. (1964): Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.

Li SF, Su T, Cheng GQ, Wang BX, Li X, Deng CL, Gao WJ. (2017). Chromosome evolution in connection with repetitive sequences and epigenetics in plants. *Genes*, 8(10), 290.

Lisachov AP, Zadesenets KS, Rubtsov NB, Borodin PM. (2015). Sex chromosome synapsis and recombination in male guppies. *Zebrafish*, 12(2), 174–180.

Liu Z, Roesti M, Marques D, Hiltbrunner M, Saladin V, Peichel CL. (2022). Chromosomal fusions facilitate adaptation to divergent environments in threespine stickleback. *Molecular biology and evolution*, 39(2), msab358.

Luckenbach JA, Borski RJ, Daniels HV, Godwin J. (2009). Sex determination in flatfishes: Mechanisms and environmental influences. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 256–263.

Luize BG, Silva TS, Wittmann F, Assis RL, Venticinque EM. (2015). Effects of the flooding gradient on tree community diversity in várzea forests of the Purus River, Central Amazon, Brazil. *Biotropica*, 47(2), 137–142.

Lukšíková K. (2021). Analýza diferenciace karyotypů a pohlavních chromozómů u afrických anuálních halančků rodu *Nothobranchius* (Teleostei: Nothobranchiidae). Vedoucí práce Mgr. Alexandr Sember, PhD.

Lysak MA. (2022). Celebrating Mendel, McClintock, and Darlington: On end-to-end chromosome fusions and nested chromosome fusions. *The Plant Cell*.

Machado AS, Kowalski S, Paiz LM, Margarido VP, Blanco DR, Venere PC, et al. (2021). Comparative cytogenetic analysis between species of Auchenipterus and Entomocorus (Siluriformes, Auchenipteridae). *Caryologia*, 74(2), 89–101.

Mank JE, Avise JC. (2009). Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. *Sexual Development*, 3(2–3), 60–67.

Marques DF, Santos FAD, Silva SSD, Sampaio I, Rodrigues LRR. (2013). Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. *Neotropical Ichthyology*, 11, 459-466.

Marshall Graves JA. (2006). Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* 124, 901–914.

Marta A, Dedukh D, Bartoš O, Majtánová Z, Janko K. (2020). Cytogenetic characterization of seven novel satDNA markers in two species of spined loaches (Cobitis) and their clonal hybrids. *Genes*, 11(6), 617.

Martins C, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Mazzuchelli J, Oliveira SG. (2011). Cytogenetic mapping and contribution to the knowledge of animal genomes. *Advances in genetics research*, 4, 1-81.

Martins-Santos IC, Cristina I, De Brito Portela-Castro AL, Julio Jr HF. (2005). Chromosomal polymorphism and speciation in *Laetacara cf. dorsigera* (Teleostei, Perciformes, Cichlidae) from the river Parana PR Brazil. *Caryologia*, 58(2), 95-101.

Meaburn KJ, Misteli T, Soutoglou E. (2007, February). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 17, No. 1, pp. 80-90). Academic Press.

Meisel RP, Olafson PU, Adhikari K, Guerrero FD, Konganti K, Benoit JB. (2020). Sex chromosome evolution in muscid flies. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(4), 1341-1352.

Milhomem SS, Pieczarka JC, Crampton WG, Silva DS, De Souza AC, Carvalho JR, Nagamachi CY. (2008). Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC genetics*, 9(1), 1-10.

Miura I, Shams F, Lin SM, de Bello Cioffi M, Liehr T, Al-Rikabi A, et al. (2021). Evolution of a multiple sex-chromosome system by three-sequential translocations among potential sex-chromosomes in the taiwanese frog *odorrana swinhoana*. *Cells*, 10(3), 661.

Miura I, Shams F, Jeffries DL, Katsura Y, Mawaribuchi S, Perrin N, et al. (2022). Identification of ancestral sex chromosomes in the frog *Glandirana rugosa* bearing XX-XY and ZZ-ZW sex-determining systems. *Molecular Ecology*, 31(14), 3859-3870.

Moens PB. (2006). Zebrafish: chiasmata and interference. *Genome*, 49 (3), 205-208.

Moore EC, Roberts RB. (2013). Polygenic sex determination. *Current Biology*, 23(12), 510–512.

Moore EC, Ciccotto PJ, Peterson EN, Lamm MS, Albertson RC, Roberts RB. (2022). Polygenic sex determination produces modular sex polymorphism in an African cichlid fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(14), e2118574119.

Moreira-Filho O, Bertollo LA, Galetti Jr PM. (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*, 46(2-3), 115-125.

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.

Myosho T, Takehana Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M. (2015). Turnover of sex chromosomes in celebensis group medaka fishes. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5(12), 2685-2691.

Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, Batista JA, O'brien PCM, Ferguson-Smith MA. (2013). Chromosome painting reveals multiple rearrangements between *Gymnotus capanema* and *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 141(2-3), 163-168.

Nanda I, Schories S, Simeonov I, Adolphi MC, Du K, Steinlein C, et al (2022). Evolution of the Degenerated Y-Chromosome of the Swamp Guppy, *Micropoecilia picta*. *Cells*, 11(7), 1118.

Noronha RCR, de Almeida BRR, da Costa MJR, Nagamachi CY, Martins C, Pieczarka JC (2020). Meiotic analyses show adaptations to maintenance of fertility in X1Y1X2Y2X3Y3X4Y4X5Y5 system of amazon frog *Leptodactylus pentadactylus* (Laurenti, 1768). *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.

Nath S, Welch LA, Flanagan MK, White MA. (2022). Meiotic pairing and double-strand break formation along the heteromorphic threespine stickleback sex chromosomes. *Chromosome Research*, 1-14.

Navrátilová A, Koblížková A, Macas J. (2008). Survey of extrachromosomal circular DNA derived from plant satellite repeats. *BMC plant biology*, 8(1), 1-13.

Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH. (2016): *Fishes of the World*, 5th ed.; John Wiley&Sons: Hoboken, NJ, USA.

Nguyen P, Sýkorová M, Šichová J, Kůta V, Dalíková M, Čapková Frydrychová R, et al. (2013). Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 6931-6936.

- 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.
- Ocalewicz K.** (2013): Telomeres in Fishes. *Cytogenet. Genome Res.* 141: 114–125.
- Ogata M, Suzuki K, Yuasa Y, Miura I.** (2021). Sex chromosome evolution from a heteromorphic to a homomorphic system by inter-population hybridization in a frog. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1833), 20200105.
- Ohno S.** (1967): Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes; *Springer-Verlag*: New York, NY, USA; p. 185. ISBN978-3-642-88180-0.
- Oliveira C, Gosztanyi AE.** (2000). A cytogenetic study of *Diplotnystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriforms. *Caryologia*, 53(1), 31-37.
- Oliveira EAD, Perez MF, Bertollo LAC, Gestich CC, Ráb P, Ezaz T, et al.** (2020). Historical demography and climate driven distributional changes in a widespread Neotropical freshwater species with high economic importance. *Ecography*, 43(9), 1291-1304.
- Oliveira IA, Argolo LA, Bitencourt JDA, Diniz D, Vicari MR, Affonso PRADM.** (2016). Cryptic chromosomal diversity in the complex “*Geophagus*” *brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). *Zebrafish*, 13(1), 33-44.
- Ospina-Álvarez N, Piferrer F.** (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: Prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS ONE*, 3(7), 1–11.
- Oudelaar AM, Higgs DR.** (2021). The relationship between genome structure and function. *Nature Reviews Genetics*, 22(3), 154-168.
- Palmer DH, Rogers TF, Dean R, Wright AE.** (2019). How to identify sex chromosomes and their turnover. *Molecular ecology*, 28(21), 4709-4724.
- Pan Q, Feron R, Jouanno E, Darras H, Herpin A, Koop B, et al.** (2021): The rise and fall of the ancient northern pike master sex determining gene. *eLife* 1–26.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Utsunomia R, Camacho JPM, Costa Silva GJD, Vicari MR, et al.** (2014). Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. *PLoS One*, 9(9), e107169.
- Pazza R, Kavalco KF, Bertollo LAC.** (2006). Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*, 112(3-4), 313-319.

Peichel CL, McCann SR, Ross JA, Naftaly AF, Urton JR, Cech JN, et al. (2020). Assembly of the threespine stickleback Y chromosome reveals convergent signatures of sex chromosome evolution. *Genome biology*, 21(1), 1-31.

Pennell MW, Kirkpatrick M, Otto SP, Vamosi JC, Peichel CL, Valenzuela N, Kitano J. (2015). Y fuse? Sex chromosome fusions in fishes and reptiles. *PLoS genetics*, 11(5), e1005237.

Peona V, Blom MP, Xu L, Burri R, Sullivan S, Bunikis I, et al. (2021). Identifying the causes and consequences of assembly gaps using a multiplatform genome assembly of a bird-of-paradise. *Molecular ecology resources*, 21(1), 263-286.

Pereira LH, Hanner R, Foresti F, Oliveira C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC genetics*, 14(1), 1-14.

Perrin N. (2021) Sex-chromosome evolution in frogs: what role for sex-antagonistic genes? *Phil.Trans. R. Soc. B* 376, 20200094.

Phillips R, Rab P. (2001). Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update. *Biological Reviews*, 76(1), 1-25.

Phillips RB. (2013). Evolution of the sex chromosomes in salmonid fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, 141(2-3), 177-185.

Pires AA, Ramirez JL, Galetti PM, Troy WP, Freitas PD. (2017). Molecular analysis reveals hidden diversity in Zungaro (Siluriformes: Pimelodidae): a genus of giant South American catfish. *Genetica*, 145(3), 335-340.

Pla S, Benvenuto C, Capellini I, Piferrer F. (2022). Switches, stability and reversals in the evolutionary history of sexual systems in fish. *Nature Communications*, 13(1), 1-13.

Platzer M, Englert C. (2016). *Nothobranchius furzeri*: a model for aging research and more. *Trends in Genetics*, 32(9), 543-552.

Pokorná MJ, Kratochvíl L. (2014). What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates?. *Biological Reviews*, 91(1), 1-12.

Pokorná MJ, Reifová R. (2021). Evolution of B chromosomes: from dispensable parasitic chromosomes to essential genomic players. *Frontiers in Genetics*, 12.

Porto FE, de Rossi Vieira MM, Barbosa LM, Borin-Carvalho LA, Vicari MR, de Brito Portela-Castro AL, Martins-Santos IC. (2014). Chromosomal polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of fusions and their consequences in the population. *Zebrafish*, 11(4), 318-324.

Potapova TA, Gerton JL. (2019): Ribosomal DNA and the nucleolus in the context of genome organization. *Chromosom. Res.* 27: 109–127.

Prazdnikov DV, Vasil'ev VP, Vasil'eva ED. (2013). Polymorphism and interpopulation variability of the karyotype in the Caspian bighead goby *Neogobius gorlap* (Gobiidae, Perciformes). *Journal of Ichthyology*, 53(6), 425-430.

Primo CC, Glugoski L, Almeida MC, Zawadzki CH, Moreira-Filho O, Vicari MR, Nogaroto V. (2017). Mechanisms of chromosomal diversification in species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish*, 14(2), 161-168.

Ráb P, Slavík O. (1996). Diploid-triploid-tetraploid complex of the spined loach, genus *Cobitis* in Psovka Creek: the first evidence of the new species of *Cobitis* in the ichthyofauna of the Czech Republic. *Acta Univ Carol (Biol)*, 39, 201-214.

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.

Ramirez JL, Birindell JL, Carvalho DC, Affonso PR, Venere PC, Ortega H, et al. (2017). Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Frontiers in Genetics*, 8, 149.

Raudsepp T, Chowdhary BP. (2016). Chromosome aberrations and fertility disorders in domestic animals. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 15-43.

Reichwald K, Petzold A, Koch P, Downie BR, Hartmann N, Pietsch S, et al. (2015) Insights into sex chromosome evolution and aging from the genome of a short-lived fish. *Cell* 163:1527–1538.

Reis RE, Albert JS, Di Dario F, Mincarone MM, Petry P, Rocha LA. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of fish biology*, 89(1), 12-47.

Rifkin JL, Beaudry FE, Humphries Z, Choudhury BI, Barrett SC, Wright SI. (2021). Widespread recombination suppression facilitates plant sex chromosome evolution. *Molecular biology and evolution*, 38(3), 1018-1030.

Roberts NB, Juntti SA, Coyle KP, Dumont BL, Stanley MK, Ryan AQ, et al. (2016). Polygenic sex determination in the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *BMC Genomics*, 17(1), 1–13.

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.

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/>

Sardell JM, Cheng C, Dagilis AJ, Ishikawa A, Kitano J, Peichel CL, Kirkpatrick M. (2018). Sex differences in recombination in sticklebacks. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(6), 1971-1983.

Sardell JM, Kirkpatrick M. (2020). Sex differences in the recombination landscape. *The American Naturalist*, 195(2), 361-379.

Sassi FM, Deon GA, Moreira-Filho O, Vicari VR, Bertollo LAC, Liehr T, et al. (2020). Multiple sex chromosomes and evolutionary relationships in Amazonian catfishes: the outstanding model of the genus *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae). *Genes* 11, 1179.

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.

Schartl M, Schmid M, Nanda I. (2016): Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equalsize to giants and dwarfs. *Chromosoma* 125: 553–571.

Schöfer C, Weipoltshammer K. (2018): Nucleolus and chromatin. *Histochem. Cell Biol.* 150: 209–225.

Schubert I, Lysak MA. (2011). Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, 27(6), 207-216.

Scribner KT, Page KS, Bartron ML. (2000). Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(3), 293-323.

Sember A, Bohlen J, Šlechtová V, Altmanova M, Pelikánová Š, Ráb P. (2018a). Dynamics of tandemly repeated DNA sequences during evolution of diploid and tetraploid botiid loaches (Teleostei: Cobitoidea: Botiidae). *PLoS One*, 13(3), e0195054.

Sember A, Bertollo LAC, Ráb P, Yano CF, Hatanaka T, de Oliveira EA, Cioffi M de B. (2018b). Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Frontiers in Genetics*, 9(MAR).

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, Oliveira EA, Ráb P, Bertollo LAC, Freitas NL, Viana PF, et al. (2020): Centric Fusions behind the Karyotype Evolution of Neotropical *Nannostomus* Pencilfishes (Characiforme, Lebiasinidae): First Insights from a Molecular Cytogenetic Perspective. *Genes* 11: 91.

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.

Serrano-Freitas ÉA, Silva DM, Ruiz-Ruano FJ, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Oliveira C, et al. (2020). Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(1), 195-207.

Shao C, Li Q, Chen S, Zhang P, Lian J, Hu Q, et al. (2014). Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish. *Genome Research* 24:604–615

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.

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.

Simakov O, Bredeson J, Berkoff K, Marletaz F, Mitros T, Schultz DT, et al. (2022). Deeply conserved synteny and the evolution of metazoan chromosomes. *Science advances*, 8(5), eabi5884.

Slijepcevic P. (1998): Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107, 136–140.

Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH. (2009). The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461(7261), 267–271.

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(1), 141-150.

Souza FHD, Sassi FDM, Ferreira PH, Bertollo LA, Ezaz T, Liehr T, et al. (2022). Integrating Cytogenetics and Population Genomics: Allopatry and Neo-Sex Chromosomes May Have Shaped the Genetic Divergence in the *Erythrinus erythrinus* Species Complex (Teleostei, Characiformes). *Biology*, 11(2), 315

Steinberg ER, Nieves M, Mudry MD. (2014). Multiple sex chromosome systems in howler monkeys (Platyrrhini, Alouatta). *Comparative Cytogenetics*, 8(1), 43.

Štundlová J, Kreklova M, Luksikova K, Volenikova A, Pavlica T, Altmanova M, et al. (2022). Sex chromosome differentiation via changes in the Y chromosome repeat landscape in African annual killifishes *Nothobranchius furzeri* and *N. kadleci*. *bioRxiv*. In review
Chromosome Research

Sullivan JP, Lundberg JG, Hardman M. (2006). A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 41(3), 636-662.

Sullivan JP, Peng Z, Lundberg JG, Peng J, He S. (2008). Molecular evidence for diphyly of the Asian catfish family Amblycipitidae (Teleostei: Siluriformes) and exclusion of the South American Aspredinidae from Sisoroidea. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 157(1), 51-65.

Sutherland BJ, Rico C, Audet C, Bernatchez L. (2017). Sex chromosome evolution, heterochiasmy, and physiological QTL in the salmonid brook charr *Salvelinus fontinalis*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(8), 2749-2762.

Strüssmann CA, Takashima F, Toda K. (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, 139(1-2), 31-45.

Symonová R, Sember A, Majtánová Z, Ráb P. (2015). Characterization of fish genomes by GISH and CGH. *Fish Cytogenetic Techniques*; Ozouf-Costaz, C., Pisano, E., Foresti, F., de Almeida, L., Eds, 118-131.

Takagui FH, Moura LFD, Ferreira DC, Centofante L, Vitorino CDA, Bueno V, et al. (2017). Karyotype diversity in Doradidae (Siluriformes, Doradoidea) and presence of the heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in the family. *Zebrafish*, 14(3), 236-243.

Takagui FH, Baumgaertner L, Baldissera JN, Laridondo Lui R, Margarido VP, Fonteles SBA, et al. (2019). Chromosomal diversity of thorny catfishes (Siluriformes-Doradidae): a case of allopatric speciation among Wertheimerinae species of São Francisco and Brazilian eastern coastal drainages. *Zebrafish*, 16(5), 477-485.

Takagui FH, Viana P, Baumgärtner L, Bitencourt JA, Margarido VP, Lui RL, et al. (2021). Reconstruction of the Doradinae (Siluriformes-Doradidae) ancestral diploid number and NOR pattern reveals new insights about the karyotypic diversification of the Neotropical thorny catfishes. *Genetics and Molecular Biology*, 44.

Torgasheva AA, Malinovskaya LP, Zadesenets KS, Karamysheva TV, Kizilova EA, Akberdina EA, et al. (2019). Germline-restricted chromosome (GRC) is widespread among songbirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(24), 11845-11850.

Torgasheva A, Malinovskaya L, Zadesenets KS, Slobodchikova A, Shnaider E, Rubtsov N, Borodin P. (2021). Highly conservative pattern of sex chromosome synapsis and recombination in neognathae birds. *Genes*, 12(9), 1358.

Toups MA, Rodrigues N, Perrin N, Kirkpatrick M. (2019). A reciprocal translocation radically reshapes sex-linked inheritance in the common frog. *Molecular ecology*, 28(8), 1877-1889.

Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F. (1999). Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma*, 108(3), 173-180.

Traut W, Winking H. (2001). Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: Zebrafish, platyfish and guppy. *Chromosome Research*, 9(8), 659–672.

Utsunomia R, Pansonato Alves JC, Paiva LRS, Costa Silva GJ, Oliveira C, Bertollo LAC, Foresti F. (2014). Genetic differentiation among distinct karyomorphs of the wolf fish *Hoplias malabaricus* species complex (Characiformes, Erythrinidae) and report of unusual hybridization with natural triploidy. *Journal of Fish Biology*, 85(5), 1682-1692.

Utsunomia R, de Andrade Silva DMZ, Ruiz-Ruano FJ, Goes CAG, Melo S, Ramos LP, et al. (2019). Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.

Valenzano DR, Benayoun BA, Singh PP, Zhang E, Etter PD, Hu CK, Clément-Ziza M, Willemsen D, Cui R, Harel I, et al. (2015) The African turquoise killifish genome provides insights into evolution and genetic architecture of lifespan. *Cell* 163:1539–1554.

Valenzuela N, Literman R, Neuwald JL, Mizoguchi B, Iverson JB, Riley JL, Litzgus JD. (2019). Extreme thermal fluctuations from climate change unexpectedly accelerate demographic collapse of vertebrates with temperature-dependent sex determination. *ScientificReports*, 9(1), 1–11.

Van der Merwe PDW, Cotterill FPD, Kandziora M, Watters BR, Nagy B, Genade T, Flügel TJ, Svendsen DS, Bellstedt DU. (2021): Genomic fingerprints of palaeo geographic 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.

Vicari MR, de Mello Pistune HF, Castro JP, de Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, et al. (2011). New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. *Genetica*, 139(8), 1073-1081.

Vítková M, Fuková I, Kubičková S, Marec F. (2007). Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Research*, 15(7), 917-930.

Volff J, Schartl M. (2001). Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica*, 111, 101–110.

Wang S, Nalley MJ, Chatla K, Aldaimalani R, MacPherson A, Wei KHC, et al. (2022). Neo-sex chromosome evolution shapes sex-dependent asymmetrical introgression barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(19), e2119382119.

Warmerdam DO, Wolthuis RMF. (2019): Keeping ribosomal DNA intact: a repeating challenge. *Chromosome Res.* 27: 57–72.

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.

Wellenreuther M, Bernatchez L. (2018). Eco-evolutionary genomics of chromosomal inversions. *Trends in ecology & evolution*, 33(6), 427-440.

Willemsen D, Cui R, Reichard M, Valenzano DR. (2020). Intra-species differences in population size shape life history and genome evolution. *Elife*, 9, e55794.

Wilson CA, High SK, McCluskey BM, Amores A, Yan YL, Titus TA, et al. (2014). Wild sex in zebrafish: Loss of the natural sex determinant in domesticated strains. *Genetics*, 198, 1291–1308.

Yamamoto Y, Zhang Y, Sarida M, Hattori RS, Strüssmann CA. (2014). Coexistence of genotypic and temperature-dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *PLoS ONE*, 9(7), 1–8.

Yang F, Trifonov V, Ng BL, Kosyakova N, Carter N.P. (2017). Generation of paint probes from flow-sorted and microdissected chromosomes. In *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)* (pp. 63-79). Springer, Berlin, Heidelberg.

Yano A, Guyomard R, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Klopp C, Cabau C, Bouchez O, Fostier A, Guiguen Y. (2012). An immune-related gene evolved in to the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Current Biology*, 22(15), 1423–1428.

Yano A, Nicol B, Jouanno E, Quillet E, Fostier A, Guyomard R, Guiguen Y. (2013). The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications*, 6(3), 486–496.

Yano CF, Bertollo LAC, Liehr T, Troy WP, Cioffi MDB. (2016). W chromosome dynamics in *Triportheus* species (Characiformes, Triporthidae): an ongoing process narrated by repetitive sequences. *Journal of Heredity*, 107(4), 342-348.

Yano CF, Bertollo LAC, Ezaz T, Trifonov V, Sember A, Liehr T, Cioffi M. (2017). Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae). *Heredity*, 118(3), 276-283.

Yano CF, Sember A, Kretschmer R, Bertollo LAC, Ezaz T, Hatanaka T, et al. (2021). Against the mainstream: exceptional evolutionary stability of ZW sex chromosomes across the fish families Triporthidae and Gasteropelecidae (Teleostei: Characiformes). *Chromosome Research*, 29(3), 391-416.

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 5SrDNA FISH. *BMC Genet.* 16: 140.

