



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Felipe Faix Barby

“Evolução cromossômica em Osteoglossiformes (Teleostei, Osteoglossomorpha). Uma abordagem intercontinental na família Notopteridae”

Dissertação de Mestrado

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi**

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

SÃO CARLOS, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Felipe Faix Barby

“Evolução cromossômica em Osteoglossiformes (Teleostei, Osteoglossomorpha). Uma abordagem intercontinental na família Notopteridae”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Ciências Biológicas). Área de Concentração: Genética e Evolução

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi**

Coorientador: **Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni**

SÃO CARLOS, 2018

Faix Barby, Felipe

Evolução cromossômica em Osteoglossiformes (Teleostei, Osteoglossomorpha). Uma abordagem intercontinental na família Notopteridae / Felipe Faix Barby. -- 2018.

130 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Marcelo de Bello Cioffi

Banca examinadora: Marcelo de Bello Cioffi, Roberto Ferreira Artoni, Luiz Antonio Carlos Bertollo, Claudio Oliveira

Bibliografia

1. Evolução cromossômica. 2. Notopteridae. 3. DARtseq. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Felipe Faix Barby, realizada em 23/02/2018:

Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi
UFSCar

Prof. Dr. Roberto Ferreira Antoni
UEPG

Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo
UFSCar

Prof. Dr. Cláudio Oliveira
UNESP

Identificação Bibliográfica

Nome e sobrenome: **Felipe Faix Barby**

Título da Tese: **Evolução cromossômica em Osteoglossiformes (Teleostei, Osteoglossomorpha). Uma abordagem intercontinental na família Notopteridae**

Título da tese em Inglês: **Chromosomal evolution in Osteoglossiformes (Teleostei, Osteoglossomorpha). An intercontinental approach in the Notopteridae family**

Programa de estudo: Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Ano de início: 2016

Ano da defesa: 2018

Palavras-chave: Evolução cariotípica, Teleósteos, Biogeografia, DArTseq, FISH

Keywords: Karyotype evolution, Teleostei, Biogeography, DArTseq, FISH

*Dedico este trabalho a todos que
participaram da minha formação acadêmica
e que me capacitaram para chegar até aqui.*

*“Não há problema em não saber todas as respostas. É melhor admitir
nossa ignorância do que acreditar em respostas que podem estar
erradas. Fingir que sabe tudo fecha a porta para a descoberta do que
realmente estava lá”*

Neil deGrasse Tyson

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que participaram e possibilitaram a realização deste trabalho. Em particular gostaria de agradecer:

Primeiramente a minha nona Cecília Canteri Faix, pois sem sombra de dúvidas sem ela zelando por mim eu não seria a pessoa que sou hoje e nem estaria onde estou. À minha mãe, por ter me sugerido seguir a área da Biologia. Também agradeço a todos os meus familiares que estiveram em minha torcida.

Ao professor Doutor Roberto Ferreira Artoni, o qual me acolheu em seu laboratório quando eu era um simples calouro e que teve grande impacto na minha capacitação permitindo assim a realização deste trabalho. Também agradeço a ele pelos seus conselhos tanto profissionais como pessoais. É uma pessoa a qual nutro um grande carinho.

À Universidade de Ponta Grossa (UEPG) onde me graduei e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) juntamente com o Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv), que cederam toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi, que foi meu principal parceiro para a execução deste projeto. Sempre dinâmico e organizado, depositou em mim uma confiança total tanto para o desenvolvimento do trabalho de bancada como na escrita; atitude que teve impacto inestimável em meu crescimento pessoal. Também aproveito para agradecer aos Profs. Drs. Luiz Antônio Carlos Bertollo e Orlando Moreira-Filho, foi um prazer pertencer ao mesmo grupo de trabalho que os senhores!

Aos meus colegas e amigos de laboratório, os quais tornaram minha vida aqui em São Carlos muito mais fácil. À Terumi, uma das pessoas mais doce e bondosa com qual tive prazer em conviver, sempre me ajudou em tudo que precisei. Não é à toa que nos demos a ela o apelido carinhoso de nossa mãezona! À Cássia, pelas nossas conversas serias (desabafos e conselhos) assim como as descontraídas tanto dentro como fora do laboratório, além das nossas memoráveis partidas de Uno com duração eterna. Ao Ezequiel, outra pessoa a qual sempre confiei para pedir conselhos e também desabafei quando precisei, assim como pelas nossas conversas descontraídas que deixou o ambiente do laboratório muito mais agradável; além de nossos papos de boteco e nossas viagens memoráveis. À Renata, uma pessoa que independentemente se o dia estava bem

ou não sempre me recebia e cumprimentava com um grande sorriso no rosto, e que ria até das minhas piores piadas. Ao Sasã, que mesmo em sua passagem curta pelo Brasil conquistou minha amizade e me garantiu boas memórias que carregarei por toda a minha vida. Afinal, “We are the champions”, não é mesmo? Também agradeço a todos os demais colegas que me estiveram em algum momento presentes comigo nesta jornada: Natália, Ahmed (com o qual aprendi muito sobre pintura cromossômica), Joe, Pedro, Carla e Giovana.

Também não posso esquecer do povo do meu antigo laboratório em Ponta Grossa, em especial ao Jonathan, grande amigo o qual me acompanhou e viu de perto meu crescimento e aperfeiçoamento na área.

Agradeço a todos os pesquisadores dos demais grupos de pesquisa espalhados pelo mundo que participaram do desenvolvimento do trabalho. Afinal, a ciência é feita de conexões e não de isolamentos.

E por último, mas não menos importante, agradeço às instituições fomentadoras que nos auxiliaram financeiramente no desenvolvimento e execução do projeto: CAPES, FAPESP e CNPq.

Deixo aqui meu sincero obrigado a todos!

RESUMO

A ordem Osteoglossiformes representam um dos grupos mais basal dentre os Teleósteos. São peixes exclusivamente de água-doce caracterizados pela presença de uma língua óssea. O grupo é um bom modelo para estudos evolutivos devido a presença de seus representantes vivos em todos as massas continentais do hemisfério sul (exceto Antártica) mesmo possuindo uma origem gondwanica (permitindo assim realizar inferências sobre eventos vicariantes/dispersão). Os membros da família Notopteridae encontram-se distribuídos pelos continentes africano e asiático (na região tropical). Para explicar a distribuição da biota asiática que possui relações próximas às espécies presentes na África, foi proposta a hipótese “*Out-of-India*”, que diz que as linhagens presentes antes no Gondwana chegaram até a Ásia por meio da deriva continental do subcontinente indiano. Esta ideia foi considerada a mais adequada para explicar a distribuição dos notopterídeos por um bom tempo, porém dados moleculares recentes demonstram discordâncias entre os tempos geológicos de deriva tectônica e a divergência molecular. No contexto desta problemática, realizamos abordagens cromossômicas e moleculares para inferir sobre a diversidade do grupo em relação a sua biogeografia. As abordagens cromossômicas envolveram as técnicas de bandeamento clássicas assim como ensaios de FISH utilizando sondas de DNA repetitivos, pintura cromossômica e CGH; enquanto que a abordagem molecular foi realizada através da análise de sequências alélicas contendo polimorfismos SNP obtidas pela técnica de genotipagem DArTseq, que envolve técnicas de sequenciamento de nova geração. Os resultados dos dados citogenéticos apontaram uma variação do número diploide em duas das sete espécies estudadas, assim como foram verificadas variações para a distribuição dos marcadores rDNA 18S e 5S em três espécies. Esta variação na estrutura cariotípica na família fica melhor evidenciada com os resultados de CGH, no qual poucos segmentos cromossômicos são compartilhados para os cruzamentos intergêneros. Estas variações são esperadas dado aos tempos de divergências na escala de dezenas de milhões de anos apresentados entre estas linhagens. O resultado de pintura cromossômica aponta o compartilhamento de um segmento entre todas as espécies, indicando um possível sítio de ligação presente no ancestral comum. A análise dos polimorfismos obtidos através de DArTseq por PCA agrupou as espécies de acordo com a distribuição geográfica, resultado também verificado por uma análise Bayesiana casando os marcadores cromossômicos e moleculares. Assim, baseados nos nossos dados aqui obtidos juntamente com os dados moleculares obtidos na literatura, inferimos sobre a possibilidade da ocorrência de um fluxo gênico mesmo após a separação das massas continentais Africanas e Indiana através da existência de pontes temporárias ligando a África ao subcontinente indiano compostas pelas ilhas de Madagascar e do arquipélago de Seychelles. De fato, a existência de fluxo gênico através de pontes temporárias ligando a África às ilhas presentes no oceano ao leste da costa africana é discutido em diversos grupos de dispersão limitada, o que deu origem a uma hipótese alternativa a “*Out-of-India*”, chamada de “*Lemurian-step-stones*”. Esta abordagem sob o ponto de vista da “*Lemurian-step-stones*” é a primeira realizada em peixes de água-doce.

ABSTRACT

The order Osteoglossiformes represent one of the most basal groups among the Teleosteos. These fishes live exclusively on freshwater environments and are characterized by the presence of a bonytongue. The group is a good model for evolutive studies due the presence of alive representatives in all continental lands localized on south hemisphere (except the Antarctic continent) even with a gondwanica origin (allowing to perform inferences about vicariant/dispersal events). The members of the Notopteridae family are distributed throughout the African and Asian (in tropical region) continents. In order to explain the distribution of the Asian biota that has close relations with the species present in Africa, the hypothesis "Out-of-India" was proposed. The idea in this hypothesis is that the lineages previously present in Gondwana reached Asia through the continental drift of the Indian subcontinent. This idea was considered the better explanation for the distribution of notopterids during a long time, but recent molecular data disclose disagreements between the geological times of tectonic drift and molecular divergence. In this context, we perform chromosomal and molecular approaches to infer about the group's diversity in relation to its biogeography. Chromosomal approaches involved classical banding techniques as well as FISH assays using repetitive DNA probes, chromosome painting and CGH; while the molecular approach was performed through the analysis of allelic sequences containing SNP polymorphisms obtained by the DArTseq genotyping technique, which involves next generation sequencing technology. The results of cytogenetic data pointed a diploid number variation in two of the seven species here studied, and also was verified variations for the distribution of the rDNA 18S and rDNA 5S markers for three species. This variation for the karyotype structure in the family was better evidenced by the CGH results, in which few chromosomal segments were shared between the intergeneric crossings assays. Indeed, these chromosomal variations was expected due the ancient divergent time in scale of tens of millions years ago between the lineages. The chromosome painting results showed a shared segment in all the seven species, pointing a possible linkage site that was also in the ancestor of the group. The PCA analysis of the polymorphisms obtained by DArTseq grouped the species according to their geographic distribution, result that was also verified by a Bayesian analysis when both chromosomal and molecular markers was combined. Thus, based on our data here obtained together with the molecular data obtained in the literature, we infer about the possibility of a gene flow occurring even after the separation of the African and Indian continental masses, discussing possibilities of the existence of temporary bridges linking Africa to the subcontinent Indian Ocean through the island of Madagascar and the Seychelles archipelago. Indeed, the existence of gene flow through temporary bridges in some moment linking the Africa to islands present in the sea localized on the African east coast is discussed in several groups of limited dispersion, which gave rise to an alternative hypothesis to "Out-of-India", called "Lemurian-step-stones". This approach from the point of view of "Lemurian-step-stones" is the first one carried out on freshwater fish.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1.** Hipóteses propostas quanto às relações filogenéticas em Teleostei. (A) Elopomorpha e Osteoglossomorpha como grupos irmãos, ambos igualmente ancestrais em relação a Clupeocephala (Bien et al. 2016); (B) Elopomorpha ocupando posição basal em relação aos demais teleósteos (Near et al. 2012) e (C) Osteoglossomorpha como grupo ancestral de Teleostei (Mirande, 2017) 06
- Figura 2.** Em detalhe a estrutura bucal dos Osteoglossiformes, evidenciando a ocorrência de língua óssea (A e B). Em (C), destaque para o cuidado parental, evidenciado pela manutenção da ninhada na boca. Imagens públicas extraídas do Google..... 08
- Figura 3.** Representação esquemática da distribuição atual das espécies da ordem Osteoglossiformes (em vermelho), a partir da fragmentação da antiga Gondwana (em preto) 08
- Figura 4.** Representação da morfologia externa de um peixe Notopteridae. Em destaque sua nadadeira dorsal pequena e estreita (1) e sua longa nadadeira anal fundida com a caudal (2), que se estende por quase todo a região ventral, dando um aspecto de “lâmina” que justifica o nome popular “peixe-faca”, designado para os membros da família. Imagem modificada de Roberts (1992) 09
- Figura 5.** Distribuição atual dos peixes notopterídeos. Em vermelho, as linhagens africanas (subfamília Xenomystinae). Em azul, as linhagens asiáticas (subfamília Notopterinae). Modificado de Inoue et al. (2009) 10
- Figura 6.** A hipótese “Out-of-India”: a biota de origem Gondwanica, presente atualmente na região asiática, teria sido transportada, via subcontinente indiano, a partir da sua separação total na massa continental africana, ficando completamente isolada durante sua deriva até o contato com a placa da Laurásia, há aproximadamente 50 milhões de anos. A partir de então, essa biota se distribuiu pela região Sul e Sudeste da Ásia. Modificado de Inoue et al. (2009) 11
- Figura 7.** Metáfase de *Papyrocranus afer* com $2n=34$ cromossomos, segundo Uyeno (1973) 14
- Figura 8.** Pintura cromossômica (indicadas pelas setas em branco) realizada por Scherthan et al. (1994) utilizando sondas do cromossomo X humano em diferentes grupos de mamíferos: (a) metáfase do rato doméstico (*Mus musculus*); (b) cervo chinês (*Muntiacus reevesi*); (c) baleia-comum (*Balaenoptera physalus*) e (d) cervo indiano (*Muntiacus muntjak vaginalis*). Os resultados apontam uma origem em comum para o sistema de cromossomos sexuais nos mamíferos placentados 21

- Figura 9.** Resultado dos testes realizados por Kallioniemi et al. (1992). Em (A) evidencia-se o resultado do primeiro ensaio de CGH, onde o genoma de uma linhagem celular 45, X0 (em verde) e o genoma de uma mulher normal foram hibridizados em uma metáfase de um homem normal. Os cromossomos apontados pelas setas correspondem aos cromossomos sexuais. O cromossomo X (indicado no canto superior esquerdo) apresenta-se hibridizado com tom vermelho, diferenciando-se dos demais que estão em amarelo (resultado da sobreposição das fluorescências verdes e vermelhas), indicando que o genoma marcado em vermelho possui mais cópias das sequências presentes no cromossomo X do que o genoma marcado em verde. A figura (B) refere-se ao gráfico de correlação do aumento de cópias do cromossomo X com a intensidade da emissão de fluorescência 24
- Figura 10.** Metáfase de híbrido de *Ambystoma jeffersonianum* x *A. laterale*. Os cromossomos marcados em vermelho correspondem à espécie *A. jeffersonianum* e em verde à espécie *A. laterale*. Os cromossomos indicados pelas setas brancas e também os destacados à direita são heterólogos envolvidos em rearranjos. (Conforme Bi & Bogart, 2006) 26
- Figura 11.** Esquematisação da metodologia de redução do genoma em frações representativas, utilizadas para a construção da biblioteca genômica. Somente as sequências com adaptadores em ambas as extremidades são amplificadas e posteriormente clonadas. Imagem retirada de Killian et al. (2012) 27

Material e Métodos

- Figura 1.** Mapa ilustrativo dos locais de origem dos espécimes estudados 33
- Figura 2.** Combinação dos experimentos realizados para a CGH. Nos quadros em azul, estão indicadas as espécies a partir das quais foram utilizadas preparações cromossômicas. Os quadros em branco representam as espécies a partir das quais foram utilizados os genomas como sondas... 39

Capítulo 1

- Figura 1.** **Map showing the origins of the specimens of seven notopterid species examined in this study.** Localities 1 and 2 in Nigeria, 3 in India and 4 to 7 in Thailand. The geographic distribution of the living species of Notopteridae is shown in red..... 71
- Figura 2.** **Karyotypes of four *Chitala* species analyzed after conventional Giemsa staining and C-banding procedures.** The Ag-NOR pairs are highlighted in boxes. Scale bar = 5 μ m 72

Figura 3.	Karyotypes of <i>Notopterus notopterus</i>, <i>Xenomystus nigri</i> and <i>Papyrocranus afer</i> analyzed after conventional Giemsa staining and C-banding procedures. The Ag-NOR pairs are highlighted in the boxes. Scale bar = 5 μm	73
Figura 4.	Karyotypes of seven species of Notopteridae analyzed after double FISH experiments with 18S (green) and 5S rDNAs (red) as probes. The chromosomes evidencing GC-rich regions after Cromomycin A ₃ staining are highlighted in boxes. Scale bar = 5 μm	74
Figura 5.	Metaphase plate of <i>Chitala lopis</i> hybridized with telomeric (TTAGGG)_n probe. Arrows indicate interstitial telomeric site (ITS) in four chromosomes. Scale bar = 5 μm	75
Figura 6.	Idiograms representing chromosomes numbers and characteristics for each notopterid species examined in this study. On the chromosomes, the distribution sites of 18S rDNA are highlighted in green, 5S rDNA in red and (TTAGGG) _n in blue.	76
Figura 7.	Metaphase chromosomes of four <i>Chitala</i> species hybridized with different labeled microsatellite-containing oligonucleotides. Scale bar = 5 μm	77
Figura 8.	Metaphase chromosomes of <i>Notopterus notopterus</i>, <i>Xenomystus nigri</i> and <i>Papyrocranus afer</i> hybridized with different labeled microsatellite-containing oligonucleotides. Bar = 5 μm	78
Figura 9.	Principal component analyses of SNP data in DArT-seq alleles found in the seven Notopteridae species. A) Individuals factor map using 2,908 alleles (reference and alternative alleles). The notopterid specimens and presence/absence SNP were structured as observations (individual) and variable, respectively, as input matrix data. Note: Briefly, principal component analysis is used to extract the important information from a multivariate data table and to express this information as a set of new variables called principal components. The information in a given data set corresponds to the total variation it contains. The goal of PCA is to identify directions along which the variation in the data is maximal. These directions (called also principal components) can be used to visualize data graphically.	79
Figura 10.	Dendrogram generated by Bayesian combined molecular and chromosomal data from the Notopterid family. Red branches represent species from Africa. Numbers in the nodes represents the Bayesian posterior probabilities	80
Figura 11.	Venn diagram of BLAST hits for 1537 DArT-seq allele sequences against three RefSeq fish collections. Details for sequence collections can be viewed in Table 2. NUC: Osteoglossiformes genomic sequences. PTN: Osteoglossiformes protein sequences. mRNA: Teleostei mRNA sequences	81

- Figura 12. Functional annotation of 868 DArT-Seq allele sequences through BLAST hit description, calculated from Supplemental Table 3.** Allele sequences were compared to three collections of Teleostei sequences from RefSeq/NCBI database, Teleostei mRNA (373,153 mRNA sequences from six species), Osteoglossiformes Nucleotide (48,195 genomic/mRNA sequences from 23 species) and Osteoglossiformes Protein (41,731 protein sequences from 239 species). BLAST searches used a cut-off E-value (Expected value) lower than 0.1. Functional classification of allele sequences was manually curated based on description of best matches against the three RefSeq collections above.. 82
- Figura 13. Illustration of key steps for Notopteridae biogeography:** A) Split of India from the Gondwana continent; B) Geographic distribution of Seychelles-India - Madagascar- Africa; C) Arrival of India subcontinent to Eastern Asia; D) Actual location of Sechelles, India and Madascar..... 83

Capítulo 2

- Figura 1. Map showing the area of distribution and the chromosomal characteristic of the sevennotopterid species examined in this study.** The geographic distribution of the living species of Notopteridae is shown in red (Africa) and blue (Asia)..... 101
- Figura 2. The experimental design in this study.** Three different experimental designs were used in this study. In the first one, gDNA of *P. afer* and *X. nigri* were used for hybridization against chromosomal background of *N. notopterus*. In the second set of experiments, gDNA of *X. nigri* was used for hybridization against chromosomal background of *P. afer* and the in the third set of experiments, gDNA of all Notopteridae species were used for hybridization against chromosomal background of *C. lopis*..... 102
- Figura 3. Zoo-FISH results after the use of Xn-1 probe.** (A) XN-1 probe applied in the metaphase plate of *X. nigri* and (B)The XN-1 probe hybridization in the other six notopterid species. Bar = 5 µm. 103
- Figura4. Comparative genomic hybridization (CGH) using the gDNA of *C. blanci* (A), *C. chitala* (B) and *C. ornata* (C) against chromosomal background of *C. lopis*.** First column: DAPI images (blue); Second column: hybridization pattern with *C. lopis* (Clo) gDNA probe; Third column: Hybridization patterns with *C. blanci* (Cbl) gDNA, *C. chitala* (Cch) gDNA and *C. ornata* (Cor) gDNA. Fourth column: merged images of each genomic probes and DAPI staining. The common genomic regions are depicted in yellow. Bar = 5 µm. 104

- Figura 5. Comparative genomic hybridization (CGH) using the gDNA of *N. notopterus* (A), *X. nigri* (B) and *P. afer* (C) against chromosomal background of *C. lopis*.** First column: DAPI images (blue); Second column: hybridization pattern with *C. lopis* (Clo) gDNA probe; Third column: Hybridization patterns with *N. notopterus* (Not) gDNA, *X. nigri* (Xen) gDNA and *P. afer* (Paf) gDNA. Fourth column: merged images of each genomic probes and DAPI staining. The common genomic regions are depicted in yellow. Bar = 5 μ m 105
- Figura 6. Comparative genomic hybridization (CGH) using the gDNA of *P. afer* against chromosomal background of *X. nigri* (A) and using the gDNA of *X. nigri* (B) and *P. afer* (C) against chromosomal background of *N. notopterus*.** First column: DAPI images (blue); Second column: hybridization pattern with *X. nigri* (Xen) and *N. notopterus* (Not) gDNA probe; Third column: Hybridization patterns with *X. nigri* (Xen) gDNA and *P. afer* (Paf) gDNA. Fourth column: merged images of each genomic probes and DAPI staining. The common genomic regions are depicted in yellow. Bar = 5 μ m..... 106
- Figura 7. Similarity cytogenetic indexes in Notopterids clades from phylogenetic and temporal perspectives.** Matrix traits: Diploid numbers - 1. 2n=38; 2. 2n=42; 3. 2n=50. 18S rDNA sites: 4. unique; 5. multiple. 5S rDNA sites - 6. non synteny with 18S rDNA; 7. synteny. (TTAGGG)_n sites: 8. terminal; 9. ectopic. Biarmed elements: 10. absence; 11. presence. CGH homology: 12. high genomic similarity intraclade; 13. reduced similarity..... 107

LISTA DE TABELAS

Material e Métodos

Tabela 1. Localidade de captura das espécies estudadas.	33
---	----

Capítulo 1

Tabela 1. Review of available data on 2n, karyotypes and Fundamental Number (NF) in the Notopteridae family. (m) metacentric; (sm) submetacentric; (st) subtelocentric and (a) acrocentric chromosomes.....	67
Tabela 2. Collection sites of the Notopteridae species and number of individuals analyzed in this study.....	68
Tabela 3. General characteristics of SNP data for 1537 alternative alleles found in six Notopteridae species.....	69
Tabela 4. BLAST searches of DArT-seq allele sequences against collections of fish sequences from RefSeq/NCBI database.....	70

Capítulo 2

Tabela 1. Collection sites of the Notopteridae species and number of individuals analyzed in this study.....	100
---	-----

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	viii
1. Introdução	01
1.1. Peixes: diversidade e importância em estudos evolutivos e genéticos.....	02
1.2. A ordem Osteoglossiformes.....	04
1.3. A família Notopteridae	09
1.4. Estudos citogenéticos na ordem Osteoglossiformes.....	12
1.5. Fração repetitiva do genoma de eucariotos	15
1.6. Marcadores cromossômicos	16
1.6.1 <i>DNAs ribossomais</i>	16
1.6.2 <i>Simple Sequence Repeats (SSRs)</i>	17
1.6.3 <i>Sondas de DNA telomérico</i>	18
1.7. Pintura cromossômica	19
1.8. Comparative Genomic Hybridization (CGH)	23
1.9. DArTseq e uso de SNPs para estudos de diversidade	26
2. Justificativa e Objetivos	29
2.1. Justificativa e objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	31
3. Material e Métodos	32
3.1. Obtenção amostral.....	33
3.2. Obtenção de cromossomos mitóticos in vivo Bertollo et al., (2015)	34
3.3. Preparação das lâminas – “air drying”.....	34
3.4. Detecção da heterocromatina C-positiva (bandamento C) Sumner (1972).....	35
3.5. Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) por nitrato de Prata (Ag-NORs) (Howell & Black, 1980).....	35
3.6. Detecção de bandas cromossômicas GC-ricas (Schmid, 1980)	36
3.7. Obtenção, marcação e precipitação das sondas para FISH	36
3.7.1. <i>Sondas de sequências de DNA repetitivas</i>	36
3.7.2. <i>Sonda para pintura cromossômica</i>	37

3.7.3. Sondas para o experimento de Hibridização Genômica Comparativa (CGH).....	39
3.8. Hibridação in situ fluorescente (FISH).....	40
3.8.1. FISH para sondas de DNA repetitivos.....	40
3.8.2. FISH para pintura cromossômica.....	41
3.8.3. FISH para CGH	41
3.9. Análises cariotípica	42
3.10. Metodologia DArTseq e análise dos dados.....	43
3.10.1 Extração de DNA e genotipagem	43
3.10.2 Análise de diversidade	43
3.10.3 Anotação das características dos alelos	44
4. Resultados e Discussão	45
Capítulo 4.1. From chromosomes to genome: insights into the evolution of Old World knifefishes (Notopteridae; Osteoglossiformes).....	47
Capítulo 2. Emerging patterns of genome organization in Notopteridae species as revealed by Zoo-FISH and Comparative Genomic Hybridization (CGH).....	84
5. Considerações Finais	108
6. Referências Bibliográficas	112

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Peixes: diversidade e importância em estudos evolutivos e genéticos

Os peixes apresentam uma enorme diversidade morfológica e de habitats, assim como na sua biologia. Atualmente o termo “peixes” designa um agrupamento que é parafilético, onde o ancestral comum mais recente está incluído, mas nem todos os seus descendentes. Assim, este termo é utilizado por uma questão de conveniência, essencialmente descrevendo os vertebrados aquáticos que possuem brânquias ao longo de toda a vida e membros, se presentes, na forma de nadadeiras. Nelson et al. (2016), sugeriu a presença de mais de 32 mil espécies de peixes entre as quase 60 mil espécies reconhecidas de vertebrados, sendo que cerca de 30 mil (96%) são teleósteos.

Os peixes de água doce constituem um modelo importante para estudos biogeográficos, pois sua evolução pode ser intimamente associada à evolução geológica da Terra (Lundberg, 1993). Conseqüentemente, cada continente apresenta uma fauna particular de peixes de água doce, onde os padrões distintos de distribuição são decorrentes de barreiras físicas que interromperam a dispersão de muitas espécies antepassadas. A maioria das espécies de peixes ocorre nas regiões tropicais e subtropicais, com uma redução global na diversidade em regiões temperadas e polares (Berra, 2001). Ocorrem principalmente na África tropical, no sudeste asiático e na bacia do rio Amazonas (Lévêque et al. 2008, Nelson et al. 2016). A região da América Central é relativamente pobre em diversidade de peixes de água doce considerando que se trata de uma região tropical, em decorrência de sua história geológica.

O continente africano, que corresponde a região biogeográfica Etíópica com exceção da região do Mediterrâneo que corresponde a região Paleártica, possui cerca de três mil espécies de peixes de água doce distribuídos entre suas distintas bacias. Entre elas, destacam-se as dos rios Congo, Nilo e Níger além de diversos lagos em toda a sua extensão continental. Notoriamente,

quase metade da biodiversidade da ictiofauna africana (1.450 espécies) encontra-se presente nos lagos Victória, Malawi e Tanganyika, sendo o primeiro o maior lago de água doce tropical existente, conhecido por apresentar um enorme endemismo de espécies de ciclídeos (Myers, 1997). Diferentemente da América do Sul, a África apresenta a maior diversidade de peixes não-Ostariophysi, incluindo famílias ancestrais endêmicas que datam da era Mesozóica, como Pantodontidae, Gymnarchidae, Mormyridae, Denticipitidae, entre outras (Briggs, 1979; Nelson et al. 2016).

O Sul e o Sudeste asiáticos correspondem à região biogeográfica Oriental e contemplam mais de seis mil espécies de peixes de água doce (Kottelat e Whitten 1996). O continente asiático possui muitos rios de grande porte como o Mekong, Yangtze, Ganges, Brahmaputra, Indus, Irrawaddy, Kapuas e vermelho, os quais se estendem por diferentes países. A maioria desses rios flui através das regiões subtropical e tropical, aumentando assim o potencial de diversidade da ictiofauna (Oberdorff et al. 1995). Dos rios asiáticos, o Mekong é o que possui maior riqueza na ictiofauna, contemplando 37 famílias e 450 espécies catalogadas (Kottelat e Whitten, 1996). Entretanto, considerando sua bacia de drenagem, esse número chega a mais de mil (Rainboth, 1996). Trata-se, portanto, de uma das bacias biologicamente mais diversificadas do planeta, suportando mais espécies de peixes de água doce por unidade de área do que o rio Amazonas (WWF, 2008). Considerando o fato de estar localizada em regiões tropical e subtropical, variações no nível do mar durante o Pleistoceno, que resultaram em isolamentos e reconexões repetidas entre ecossistemas e populações, podem ter influenciado o processo de especiação (Mittermeier et al. 1999).

Os peixes constituem um grupo extremamente interessante para abordagens evolutivas, considerando a gama de diversidade que apresentam. Tem sido sugerido que tal diversidade possa ser resultante de modificações genômicas mais rápidas do que aquelas que ocorrem em outros grupos de vertebrados (Venkatesh, 2003). Além de poliploidizações, vários outros

eventos, como duplicações gênicas independentes, ocorreram entre os peixes. De fato, há evidências substanciais de que um evento antigo de duplicação do genoma (tetraploidização) esteja relacionado com a diversificação de funções dos genes e especiação em várias linhagens (Zhang et al. 2002). O amplo espectro de sistemas de determinação do sexo encontrado nos peixes também ilustra a plasticidade de seus genomas, associado ao fato de que muitas espécies apresentam hermafroditismo, incluindo até mesmo mudança de sexo em um estágio específico de seu ciclo de vida (Ohno, 1967; Devlin & Nagahama, 2002).

Considerando que os peixes ocupam posição basal na filogenia dos vertebrados, estudos em espécies modelos contribuem para esclarecer diversas questões relacionadas com a organização do genoma e evolução dos vertebrados como um todo. No entanto, essa enorme biodiversidade ainda permanece em grande parte inexplorada. Neste cenário, os estudos citogenéticos vêm fornecendo contribuições importantes para o conhecimento do genoma dos peixes. Nas últimas duas décadas, uma quantidade significativa de dados tem sido gerada, incluindo o mapeamento de seqüências repetitivas de DNA nos cromossomos de diversas espécies de peixes (Cioffi & Bertollo, 2012). Tais seqüências tem revelado desempenhar um papel importante na organização estrutural e funcional dos genomas (Schueler et al. 2001; Biémont & Vieira, 2006), além de proporcionar novos conhecimentos sobre processos evolutivos em muitas espécies de vertebrados.

1.2 A ordem Osteoglossiformes

Como citado anteriormente, os peixes teleósteos representam o maior grupo de vertebrados com cerca de 32.000 espécies, subdividas em mais de 450 famílias. Dominam os rios, lagos e oceanos de todo o planeta e representam mais da metade de todos os vertebrados e ao redor de 96% de todos os peixes existentes (Nelson et al. 2016). O mais antigo fóssil de teleósteo data de aproximadamente 240 milhões de anos (Maisey, 1996) e

evidências paleontológicas sugerem que esse grupo passou por uma rápida radiação, inigualável em relação a outros vertebrados (Venkatesh, 2003).

Trata-se de um grupo ancestral dentre os teleósteos, contudo sua posição filogenética exata é ainda controversa. Bian et al. (2016), analisando o genoma de nove espécies incluindo representantes de Osteoglossiformes, Elopomorpha, Clupeocephala e dois grupos externos, e Chen et al. (2015), utilizando mais de 4000 genes de 58 espécies de vertebrados mandibulados, colocam Osteoglossomorpha e Elopomorpha como grupos irmãos dentre um clado próprio, ambos basais dentre os Teleostei. Por sua vez, Near et al. (2012), utilizando nove genes nucleares amostrados de 232 espécies de Teleósteos e espécies pertencentes a grupos externos, e Betancour-R et al. (2017), utilizando de dados moleculares juntamente com caracteres morfológicos, colocam Elopomorpha como o grupo basal dos Teleostei, seguido sequencialmente por Osteoglossomorpha como um clado intermediário e Clupeocephala representando os demais teleósteos existentes. Ainda uma terceira alternativa é levantada por Mirande (2017), também utilizando dados moleculares em conjunto com dados morfológicos, e Peng et al. (2006), utilizando dados moleculares mitocondriais, os quais consideram Osteoglossomorpha como o grupo irmão de todos os demais teleósteos ocupando posição basal, vindo Elopomorpha em posição intermediária e Clupeocephala por último representando os grupos teleósteos mais recentes.

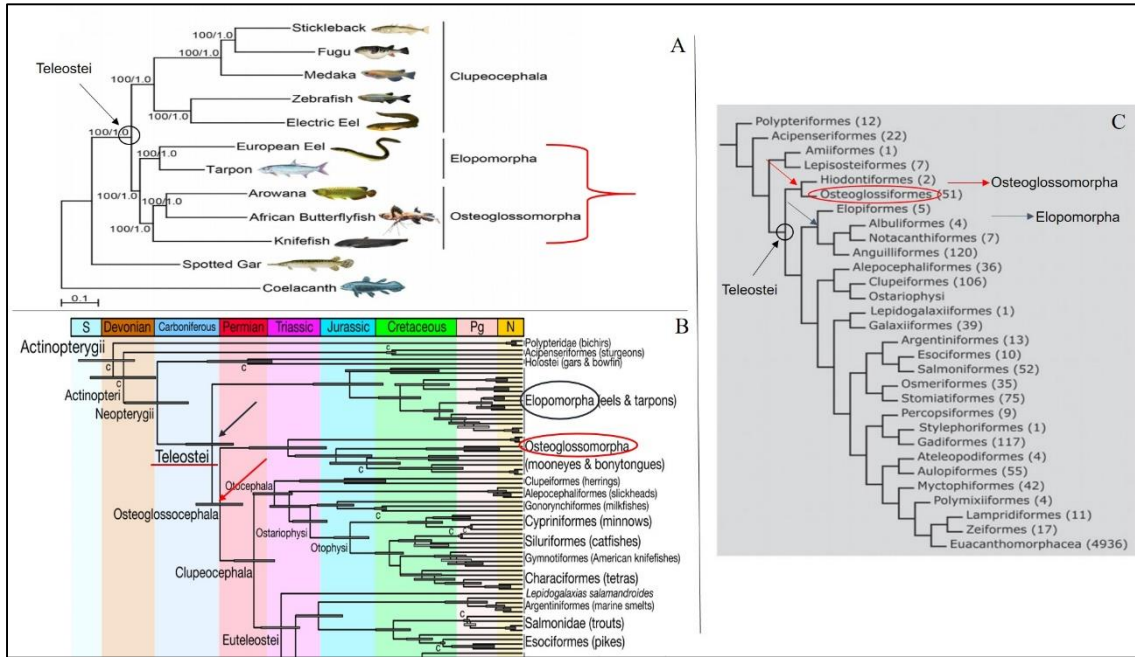


Figura 1 Hipóteses propostas quanto às relações filogenéticas em Teleostei. (A) Elopomorpha e Osteoglossomorpha como grupos irmãos, ambos igualmente ancestrais em relação a Clupeocephala (Bien et al. 2016); (B) Elopomorpha ocupando posição basal em relação aos demais teleósteos (Near et al. 2012) e (C) Osteoglossomorpha como grupo ancestral de Teleostei (Mirande, 2017).

A ordem Osteoglossiformes possui 244 espécies válidas, distribuídas em 31 gêneros. Seus representantes vivos encontram-se restritos à água doce, com a exceção de alguns notopterídeos que toleram até um certo nível de salinidade, como, por exemplo, *Notopterus notopterus* que pode, ocasionalmente, ser encontrado em águas salobras (Roberts, 1992; Lundberg, 1993; Nelson et al. 2016). Preservam características anatômicas primitivas, como língua dentada ou óssea (**Figuras 2 A e B**), ao lado de especializações peculiares na morfologia (nadadeiras dorsais e anais alongadas), fisiologia (função de respiração aérea da bexiga natatória) e no comportamento (proteção/manutenção da ninhada na boca) (**Figura 2C**) (Greenwood & Wilson, 1998). Essa ordem possui pelo menos um representante presente em cada um dos continentes do hemisfério sul, com exceção da Antártica, sendo um importante modelo para estudos biogeográficos (Kumazawa & Nishida, 2000). Sua ampla distribuição geográfica sugere origem gondwânica, sendo o continente africano o centro da dispersão (**Figura 3**). A atual distribuição teria

sido atingida por efeitos vicariantes, decorrente da divisão da antiga Gondwana em América do Sul, África, Índia, Austrália e Antártida (Darlington, 1957; Kumazawa & Nishida, 2000).

De acordo com a taxonomia atualmente aceita, a ordem Osteoglossiformes engloba as subordens Osteoglossoidei e Notopteroidei (Li & Wilson, 1996). A subordem Osteoglossoidei possui três famílias reconhecidas, Osteoglossidae, Pantodontidae e Arapaimidae, enquanto que a subordem Notopteroidei engloba outras três famílias, Gymnarchidae, Mormyridae e Notopteridae (Nelson, 2006). Dentre essas seis famílias, Mormyridae é a mais especiosa contendo mais de 200 espécies descritas, distribuídas em 21 gêneros e englobando cerca de 90% dos representantes vivos da ordem (Lavoué and Sullivan, 2004; Nelson et al. 2016), com ocorrência exclusiva na África. As famílias Pantodontidae e Gymnarchidae são monoespecíficas representadas, respectivamente, por *Pantodon buchholzi* e *Gymnarchus niloticus*. Assim como os mormyrideos, também são grupos exclusivos ao continente africano. A família Arapaimidae engloba 7 espécies em dois gêneros (*Arapaima* e *Heterotis*), sendo representantes as espécies *Arapaima gigas*, *A. arapaima*, *A. agassizii*, *A. leptosoma*, *A. mapae* (conhecidas como pirarucu, um dos maiores peixes de água doce existente, encontrado na América do Sul) e *Heterotis niloticus* (exclusivamente africano). Os únicos Osteoglossiformes que não ocorrem no continente africano são os membros da família Osteoglossidae. *Osteoglossum bicirrhosum* e *O. ferreirai* encontram-se presentes na América do Sul e o gênero *Scleropages* na Oceania (Nelson et al. 2016). A família Notopteridae será enfocada no próximo sub-tópico.

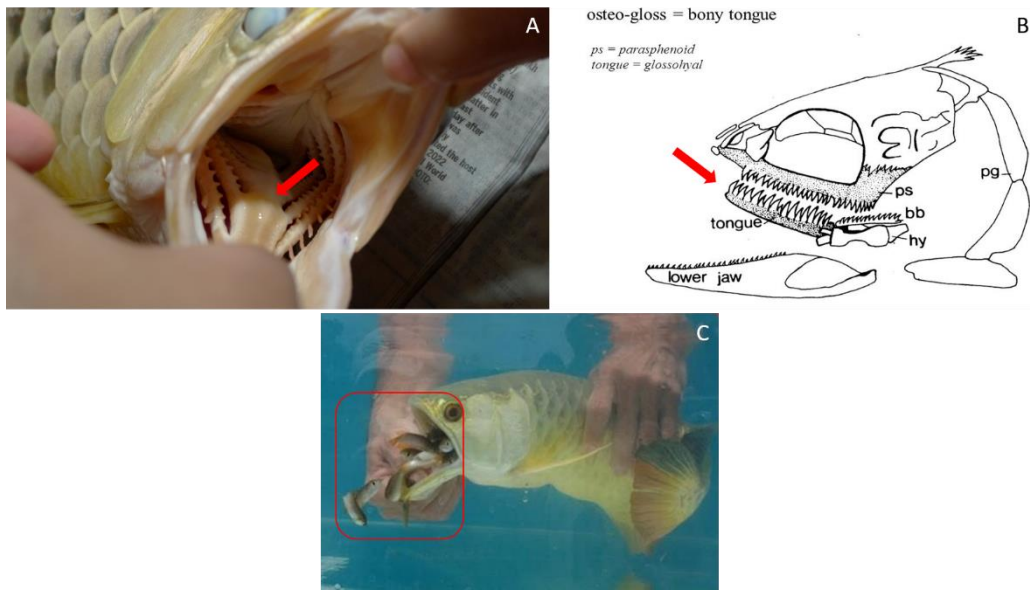


Figura 2: Detalhe a estrutura bucal dos Osteoglossiformes, evidenciando a ocorrência de língua óssea (A e B). Em (C), destaque para o cuidado parental, evidenciado pela manutenção da ninhada na boca. Imagens públicas extraídas do Google.

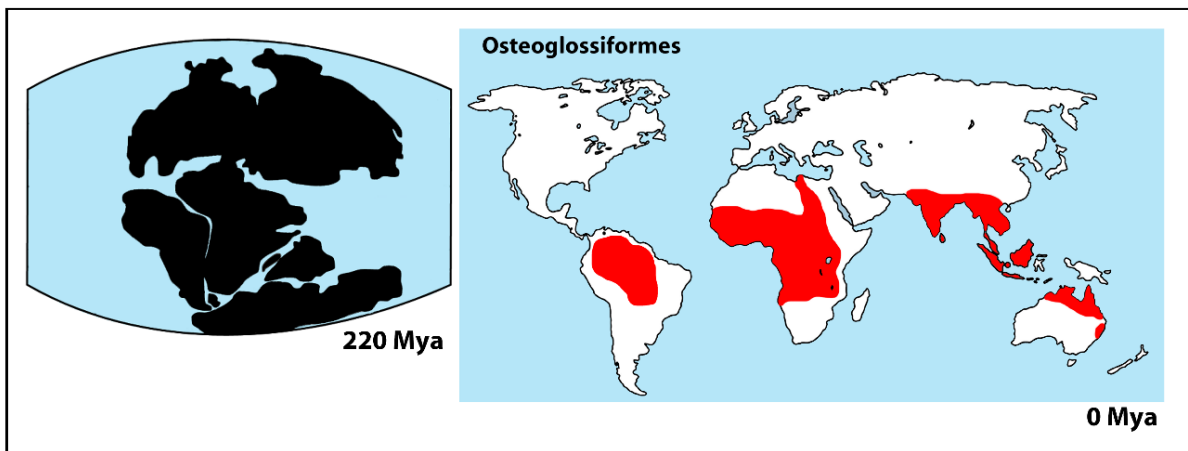


Figura 3: Representação esquemática da distribuição atual das espécies da ordem Osteoglossiformes (em vermelho), a partir da fragmentação da antiga Gondwana (em preto).

1.3 A família Notopteridae

A família Notopteridae contém dez espécies popularmente conhecidas como “peixes faca”, distribuídas em duas subfamílias, Notopterinae e Xenomystinae, e quatro gêneros, *Chitala*, *Notopterus*, *Xenomystus* e *Papyrocranus*. A subfamília Notopterinae corresponde aos gêneros asiáticos, *Chitala* e *Notopterus* e Xenomystinae aos gêneros africanos, *Xenomystus* e *Papyrocranus* (Roberts, 1992; Nelson et al. 2016). São, em sua maioria, peixes de pequeno porte, com nadadeira caudal pequena e fundida com a anal, acompanhando quase toda a extensão do comprimento do corpo. Quando presente, a nadadeira dorsal é pequena e estreita (**Figura 4**). Todas as espécies habitam ambientes de água-doce, sendo *Notopterus notopterus* ocasionalmente encontrado em água salobra (Roberts, 1992).

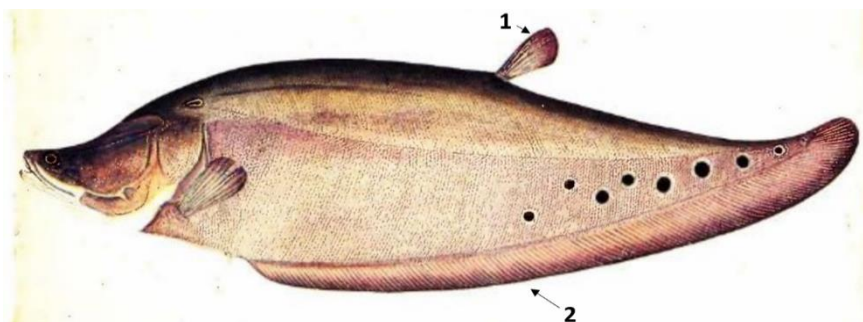


Figura 4: Representação da morfologia externa de um peixe Notopteridae. Em destaque sua nadadeira dorsal pequena e estreita (1) e sua longa nadadeira anal fundida com a caudal (2), que se estende por quase toda a região ventral, dando um aspecto de “lâmina” que justifica o nome popular “peixe-faca”, designado para os membros da família. Imagem modificada de Roberts (1992).

Chitala é o gênero mais especioso com seis espécies válidas (*C. lopis*, *C. chitala*, *C. blanci*, *C. ornata*, *C. hypselonotus*, *C. borneensis*) algumas delas importantes para a aquicultura e o aquarismo, como *C. chitala* e *C. ornata*, chamados de clown knifefishes ou clown-featherback, espécies muito apreciadas por aquaristas de todo o mundo. O maior peixe do gênero, e também da família, é *C. lopis* que pode apresentar até 1,5m de comprimento (Roberts, 2012). *Xenomystus* é representado por uma única espécie, *X. nigri*, Além de olhos grandes em relação ao tamanho do corpo, propiciando uma excelente visão noturna, a linha lateral é o aparato sensorial mais importante

dessa espécie, auxiliando na locomoção em águas sem luz (Axelrod et al. 1996). Também se diferencia das demais espécies pela ausência da nadadeira dorsal (Roberts, 1992). O gênero *Papyrocranus* engloba duas espécies, *P. afer* e *P. congoensis*, presentes em muitas regiões da África, especialmente na bacia do rio Congo. *Notopterus* possui também apenas uma espécie representativa, *N. notopterus*, com coloração amarelada característica, podendo atingir cerca de 60 cm (Nelson, 2006). Enquanto que os gêneros *Chitala* e *Notopterus* são endêmicos do sudoeste asiático, *Papyrocranus* e *Xenomystus* são encontradas exclusivamente no continente africano (**Figura 5**). Na realidade, vários outros grupos de peixes de água doce, como os Bagridae, Schilbeidae, Clariidae, Aplocheilidae, Mastacembelidae, Anabantidae e Channidae, também apresentam distribuição afro-asiática, o que representa um grande paradoxo dentro da zoogeografia de peixes (Berra, 2001).

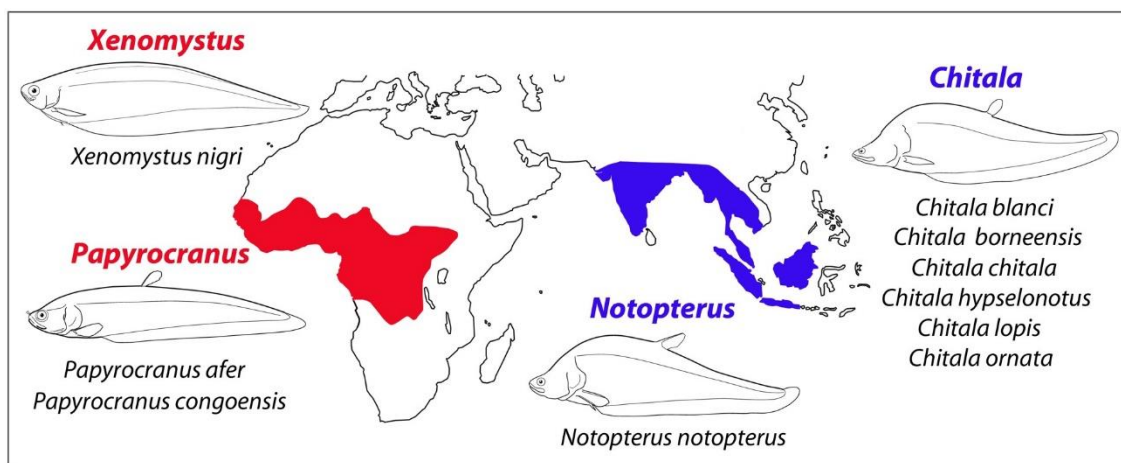


Figura 5: Distribuição atual dos peixes notopterídeos. Em vermelho, as linhagens africanas (subfamília Xenomystinae). Em azul, as linhagens asiáticas (subfamília Notopterinae). Modificado de Inoue et al. (2009).

Entretanto, estudos filogenéticos suportam a monofiletismo da família Notopteridae. Segundo Inoue et al. (2009), a separação entre os gêneros africanos e asiáticos teria ocorrido há 133 milhões de anos, enquanto a divisão entre os gêneros *Chitala* e *Notopterus* há cerca de 47 milhões de anos. Por sua vez, Lavoué (2016), aponta para uma separação mais recente entre as linhagens africanas e asiáticas, no intervalo de 120-80 milhões de anos. Adicionalmente, os Notopteridae asiáticos foram alocados dentro de um clado composto por espécies africanas (notopterídeos, gymnarchídeos e

mormyrídeos), favorecendo a hipótese de origem africana desta família e posterior migração para a Ásia (Inoue et al. 2009).

Até o presente momento, a hipótese mais aceita para explicar a atual distribuição dos Notopteridae é a denominada “*Out-of-India*” (Figura 6). Esta hipótese explica a distribuição de grupos de origem gondwanica na região tropical da Ásia (Sul e Sudeste) por intermédio da deriva do subcontinente indiano, que anteriormente compunha o supercontinente Gondwana, até a sua colisão com a placa da Laurásia, carregando assim a biota gondwanica para esta região (para mais informações ver Karanth, 2006). Segundo Lavoué (2016), a data estimada para a segregação completa entre as massas continentais da África e da Índia-Madagascar ocorreu a cerca de 135 milhões de anos atrás. Assim, temos aqui uma discordância entre os marcadores moleculares e a proposta da hipótese “*Out-of-India*” no que concerne à distribuição geográfica dos Notopteridae.

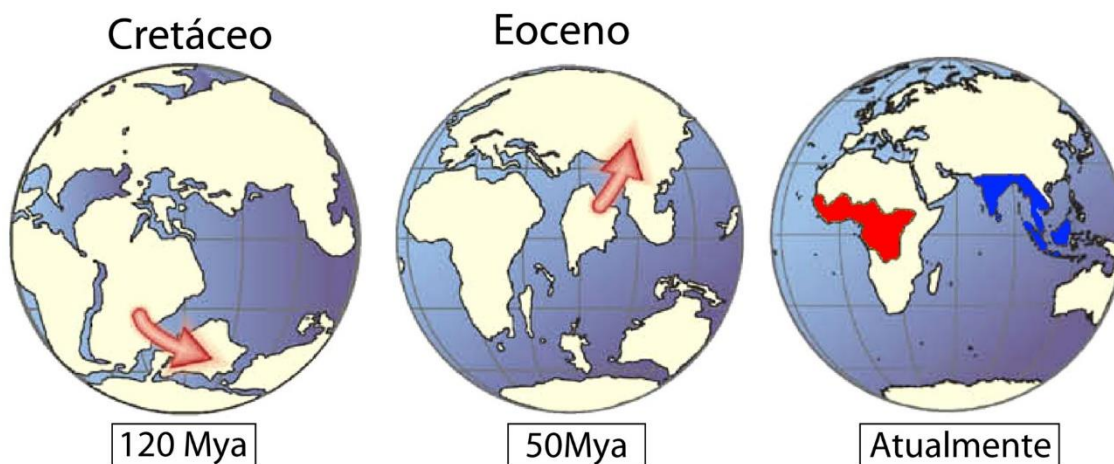


Figura 6: A hipótese “*Out-of-India*”: a biota de origem Gondwanica, presente atualmente na região asiática, teria sido transportada, via subcontinente indiano, a partir da sua separação total na massa continental africana, ficando completamente isolada durante sua deriva até o contato com a placa da Laurásia, há aproximadamente 50 milhões de anos. A partir de então, essa biota se distribuiu pela região Sul e Sudeste da Ásia. Modificado de Inoue et al. (2009).

1.4 Estudos citogenéticos na ordem Osteoglossiformes

Os estudos cromossômicos na ordem Osteoglossiformes são ainda escassos e, com poucas exceções, basicamente restritos à descrição do número diplóide e de alguns marcadores clássicos, como o padrão de distribuição da heterocromatina C-positiva e das Ag-RONs. O estudo mais abrangente foi realizado por Uyeno (1973), onde sete espécies de quatro famílias distintas foram analisadas por coloração cromossômica convencional. Entretanto, embora reduzidos, esses dados já vêm evidenciando a ocorrência de diversidade cariotípica entre diferentes grupos, assim como a ausência de cromossomos sexuais heteromórficos (Revisado em Rab et al. 2016).

Na família Pantodontidae, o peixe-borboleta africano *Pantodon buchholzi*, sua única espécie representativa, foi objeto de estudos recentes mais detalhados (Ráb et al. 2016). Exemplares oriundos da bacia do rio Níger (Nigéria) evidenciaram, de forma inequívoca, a ocorrência de $2n=46$ cromossomos, com cariótipo composto por $10m+10sm+26a$, diferindo assim do relatado por Uyeno (1973), $12m + 12sm / st + 24a$ cromossomos. Entretanto, considerando que a localização dos espécimes examinados por Uyeno não foi especificada, não é possível excluir a possibilidade de que essas diferenças sejam também devidas à variações populacionais. Marcadores moleculares evidenciaram a presença de apenas um par cromossômico portador de sítios de DNAr 18S e 5S, em condição não sintênica, bem como a múltiplos sítios CMA3+, um deles associado ao DNAr 18S, fazendo seu genoma uma exceção notável a partir do padrão geral encontrado entre os peixes. Classes distintas de microssatélites e retrotransposons se mostraram dispersas nos cromossomos, com alguns acúmulos/amplificações perto das regiões teloméricas (Ráb et al. 2016).

Na família Mormyridae oito espécies (*Gnathonemus petersii*, *Brienomyrus brachyistius*, *Marcusenius moorii*, *Ivindomyrus opdenboshi*, *Paramormyrops sp.7*, *Stomatorhinus walkeri*, *Petrocephalus microphthalmus*, *Pollimyrus cf. nigricans* e *Campylomormyrus compressirostris*) já foram analisadas. O número diplóide varia de 40 cromossomos em *Pollimyrus cf. nigricans*, a 48 cromossomos em *G. petersii*, *B. brachyistius* e *C. compressirostris*, e 50 cromossomos nas demais espécies. Por sua vez, a estrutura cariotípica também varia, mesmo entre as espécies com números $2n$ iguais. Assim, por

exemplo, entre as espécies com 48 cromossomos, a fórmula cariotípica é diferenciada, ou seja, $18m+2sm+28a$ em *G. petersii* (Ozouf-Costaz et al. 2015), $1m+4sm+2st+41a$ em *B. brachyistius* (Uyeno, 1973), e $26m+4sm+18a$ em *C. compressirostris* (Canitz et al. 2017).

No que se refere à família Osteoglossidae, cinco espécies tiveram o número diplóide investigado. Segundo Urushido et al. (1975), o aruanã-asiático, *Scleropages formosus*, é caracterizado por $2n=50$ cromossomos. Entretanto, dois trabalhos posteriores contestaram este dado, evidenciando $2n=48$ e o cariótipo formado por $18sm/30a$, com sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW (Magtoon e Donsakul, 2004; Shen et al. 2014, Bien et al. 2016). Hirata e Urushido (2000), descreveram o número diplóide de outras duas espécies de desse mesmo gênero, *S. jardinni* com 48 cromossomos ($16m+6sm+26a$) e *S. leichardt* com $2n=44$ ($16m+8sm+6st+14a$). Por sua vez, *Osteoglossus ferreirai* apresenta $2n=54$ cromossomos e cariótipo formado por $6m-sm/48a$ (Suzuki et al. 1982), enquanto que *O. bicirrhosum* apresenta $2n=56$ e cariótipo formado por $4st/52a$, representando o maior número cromossômico relatado para os Osteoglossiformes até o presente momento (Urushido et al. 1975; Suzuki et al. 1982).

Na família Notopteridae, adicionalmente à descrição do cariótipo convencional, encontram-se também alguns dados relativos ao padrão de distribuição das Ag-RONs nas espécies *Chitala blanci*, *C. ornata*, *Notopterus notopterus* e *Xenomystus nigri*. Essas quatro espécies apresentam $2n=42$ cromossomos, com cariótipo composto apenas por cromossomos acrocêntricos (Uyeno, 1973; Donsakul e Magtoon, 1990; Supiwong et al. 2012; Silawong et al. 2012). A única exceção reportada foi *Papyrocranus afer*, que possui $2n=34$ cromossomos e um cariótipo formado por $4sm/30a$ (Uyeno, 1973) (**Figura 7**). No que diz respeito às Ag-RONs, apenas um par portador dessas sequências foi evidenciado em *C. ornata* e *N. notopterus*, representando as únicas espécies analisadas quanto a esta característica (Supiwong et al. 2012; Silawong et al. 2012).



Figura 7: Metáfase de *Papyrocranus afer* com $2n=34$ cromossomos, segundo Uyeno (1973).

Na família Arapaimidae, apenas dois trabalhos foram conduzidos na espécie *Arapaima gigas*. Marques et al. (2006), analisaram uma população do rio Araguaia (MT, Brasil), com $2n = 56$ cromossomos em ambos os sexos, a presença de Ag-RONs simples localizadas no par cromossômico nº 3, confirmadas com a hibridização com sondas do DNAr. Adicionalmente, pequenos blocos de heterocromatina C-positiva foram observados na região centromérica de alguns pares cromossômicos. Em um segundo estudo, agora analisando espécimes da bacia hidrográfica do rio Jamari (RO, Brasil), Rosa et al. (2009), encontraram o mesmo número cromossômico e o mesmo padrão de distribuição dos sítios de DNAr 18S e Ag-RONs. Análises adicionais com os fluorocromos base específicos DAPI e Cromomicina A₃ evidenciaram um par cromossômico apresentando heterocromatina CG-rica e dois outros pares evidenciando regiões AT-ricas. Entretanto, o gênero *Arapaima*, previamente suposto com uma única espécie, *A. gigas*, vem se mostrando mais diversificado do que se imaginava, com uma nova espécie sendo descritas nos últimos anos (Stewart, 2013). Portanto, coloca-se em dúvida se os dados cariotípicos acima mencionados correspondem de fato a *A. gigas*, ou a alguma outra espécie ainda não descrita para este gênero.

1.5 Fração repetitiva do genoma de eucariotos

Apesar da complexidade e de sua diversidade, o genoma dos eucariotos pode ser subdividido em duas grandes frações: a primeira delas é composta por sequências de cópia única, correspondendo a uma grande porção do DNA codificante; e a segunda composta por sequências repetitivas, apresentando pelo menos duas até milhares de cópias, constituindo uma fração considerável do genoma de muitos eucariotos (López-Flores & Garrido-Ramos, 2012). Nos últimos anos, grande parte de projetos de sequenciamento genômico vem mostrando que a fração repetitiva é maior do que se supunha, podendo representar mais de 80% do seu conteúdo e caracterizada por uma alta variabilidade (Charlesworth et al. 1994, Gregory 2005, Plohl et al. 2008). O genoma dos peixes não foge a esse padrão, sendo constituídos, de forma geral, por uma grande quantidade de sequências repetitivas, possuindo, na maioria das espécies, praticamente todas as classes de DNA repetitivo já identificadas (Martins, 2007).

As sequências repetitivas de DNA, assim como as sequências de cópias únicas, variam entre grupos distintos. Contudo, esta variação não apresenta uma relação explícita com a complexidade dos organismos, nível de ploidia ou quantidade de genes. As diferentes classes de DNAs repetitivos podem estar dispostas *in tandem* ou dispersas no genoma. As sequências dispersas são representadas pelos elementos transponíveis (TEs), geralmente amplamente dispersos ao longo do genoma, enquanto que as sequências *in tandem* incluem as famílias multigênicas, tais como os genes ribossômicos e as histonas, assim como os satélites (satDNAs), micro e minissatélites. As sequências satélites são constituídas de unidades de aproximadamente 200 pb, repetidas entre centenas a milhares de vezes, enquanto que as sequências minissatélites geralmente possuem número igual ou maior a 9 pb e os microssatélites apresentam tamanho de 1-8 pb para suas unidades de repetição (Gregory, 2005; López-Flores & Garrido-Ramos, 2012).

Por muito tempo, por desconhecimento de suas funções no genoma, as sequências de DNA repetitivo foram classificadas como “junk DNA” (DNA lixo). Contudo, os avanços das investigações nesta área vêm sugerindo que diversas classes de DNAs repetitivos participam da organização estrutural e funcional dos cromossomos (Biémont & Vieira, 2006). De fato, os DNAs repetitivos são

componentes naturais da heterocromatina e cada espécie tem um conjunto específico de famílias de elementos repetitivos que estão preferencialmente localizadas nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos (Charlesworth, 1994; Plohl et al. 2008). Tanto o centrômero como os telômeros possuem função vital na organização do genoma. O primeiro constitui a constrição primária dos cromossomos, e responsável pela segregação correta dos mesmos durante a divisão celular, enquanto que os telômeros são responsáveis pela estabilidade cromossômica, evidenciando assim o papel vital dessas sequências repetitivas no genoma eucarioto (López-Flores & Garrido-Ramos, 2012). Assim, estudos focando na organização genômica e cromossômica de sequências de DNA repetitivo podem de fato contribuir para o conhecimento da organização do genoma eucarioto,

1.6 Marcadores cromossômicos

1.6.1 DNAs ribossomais

Os genes de RNAs ribossomais constituem marcadores viáveis para elucidar muitos dos processos relacionados à evolução cromossômica de diferentes grupos de peixes (Gornung, 2013; Rebordinos et al. 2013). O RNA ribossômico (RNAr) é expresso por duas famílias multigênicas, o DNAr 45S e o DNAr 5S, constituídas por centenas até milhares de unidades repetitivas. O DNAr 45S está situado junto a NOR, e é composto por três genes distintos que codificam os RNAr 18S, 5,8S e 28S, assim como dois espaçadores transcritos externos, ETS1 e ETS2, e dois espaçadores transcritos internos, ITS1 e ITS2, além de um espaçador não-transcrito, NTS. Por sua vez, o DNAr 5S é composto por unidades de aproximadamente 120 pares de base, intercaladas por um NTS (López-Flores & Garrido-Ramos, 2012). Além da estrutura, ambas as famílias se diferenciam também no tocante à transcrição. Os genes de RNAr 45S são transcritos pela enzima nucleolar RNA polimerase I, enquanto os genes RNAr 5S são transcritos fora do nucléolo pela enzima RNA polimerase III. Foi sugerido que esta divergência funcional possa ser favorecida pela localização física diferente dos clusters de DNAr 45S e 5S nos cromossomos (Martins & Galetti, 1999).

Aproximadamente 72% de 330 espécies de peixes já analisadas, compreendendo 22 ordens, apresentam apenas um par cromossômico portador de sítios de DNAr 45S, em 87% dos casos localizados em região terminal (Gornung, 2013). Entretanto, em relação ao DNAr 5S ocorre o oposto, uma vez que na maioria das espécies estudadas estas sequências estão localizadas na região intersticial dos cromossomos, ocorrendo mais comumente em um par cromossômico distinto daquele portador do DNAr 45S (Martins & Wasko, 2004, Martins & Galetti, 2001). Todavia, vem sendo evidenciado que tanto o número quanto a localização dos sítios de DNAr 18S e 5S podem ser variáveis, apresentando também configuração sintênica em diversas espécies (Diniz et al. 2009; Calado et al. 2014; Cioffi et al. 2015; Barros et al. 2016; Getlekha et al. 2016; Maneechot et al. 2016, de Moraes et al. 2017).

1.6.2 Simple Sequence Repeats (SSRs)

Os microssatélites, também conhecidos como Simple Sequence Repeats (SSRs) ou Short Tandem Repeats (STRs) são sequências repetitivas *in tandem* possuindo unidades de repetição de até 08 nucleotídeos, distribuídos no genoma de todos os eucariotos já estudados (López-Flores e Garrido-Ramos, 2012). São comumente encontrados tanto entre regiões codificantes, como também em regiões não-codificantes e regulatórias. Variam amplamente no número de repetições que apresentam, podendo atingir milhares de repetições, associadas à heterocromatina em várias espécies (Tautz & Renz, 1984, Martins, 2007). Estas sequências têm se mostrado fonte de variabilidade genotípica entre as espécies, facilitando o surgimento de variantes de genes e de DNAs não codificantes, favorecendo assim a diferenciação genética de muitos organismos (Gemayel et al. 2010, Brower et al. 2009). De fato, as taxas de mutação das regiões microssatélites são de 10 até 100.000 vezes maior que a encontrada em outras regiões expressas do genoma

Esta taxa é devida não somente a mutações pontuais, mas também ao número de repetições causadas por deslizamentos (*slippages*) durante a replicação do DNA e também por crossing-over desigual, podendo gerar duplicações/deleções nestas regiões, possibilitando que os loci microssatélites sejam altamente polimórficos (Gemayel et al. 2010, López-Flores e Garrido-

Ramos, 2012). Diferentes classes de microssatélites têm se mostrado elementos importantes para a caracterização estrutural e funcional dos cromossomos (Plohl, 2008). Assim, nos últimos anos, diversas classes de microssatélites vêm sendo utilizadas como sondas em experimentos de FISH para mapeamento cromossômico em diversos grupos de peixes (Cioffi et al. 2015, Ráb et al. 2016, de Moraes et al. 2017).

1.6.3 Sondas de DNA telomérico

As sequências teloméricas foram originalmente isoladas de bibliotecas de DNA repetitivos humanos e consistem de repetições curtas ricas em guanina – (TTAGGG)_n, amplamente distribuídas e conservadas no genoma de vertebrados. A repetição desta sequência juntamente com a sua associação com proteínas especializadas, formam o complexo nucleoproteico conhecido como telômero, o qual possui funções vitais como conferir estabilidade cromossômica e permitir a replicação completa das suas extremidades (Blackburn, 1994). A inativação ou a perda física dos telômeros pode levar a fusões cromossômicas e, se restos destas sequências ainda permanecerem nas extremidades fundidas, sítios teloméricos ectópicos intersticiais (ITS) poderão ser detectados no ponto de fusão. Assim sendo, sítios pericentroméricos e intersticiais são geralmente considerados como evidências de um rearranjo cromossômico ocorrido (Slijepcevic, 1998, Meyne et al. 1990). Assim, a utilização de sondas teloméricas tem sido uma ferramenta importante para análises de processos evolutivos, pois permitem fazer inferências a respeito sobre rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução cariotípica de muitos organismos (Ocalewicz, 2013). Contudo, muitos casos de fusões cromossômicas *in tandem* ou fusões cêntricas podem não apresentar ITS, como o esperado, devido ao fato da perda ou redução drástica do DNA telomérico durante esses rearranjos (Schubert et al. 1992).

O uso de sondas teloméricas vem sendo incrementada na citogenética de peixes, já tendo sido utilizada em aproximadamente 74 espécies de Actinopterygii, 01 espécie de Sarcopterygii e em 04 espécies de Chondrichthyes, com ocorrência de ITS em 33 espécies (Ocalewicz 2013). Sítios de DNA telomérico já foram também evidenciados em associação com as NORs em diversos grupos, como na truta, *Salmo trutta* e no salmão

Onchorhynchus kisutch (Abuín et al. 1996), tainhas (Gornung et al. 2004, Rossi et al. 2005), enguias (Salvadori et al. 1995) e *Nerophis ophidion* (Libertini et al. 2006), sugerindo a dispersão desses elementos ao longo da região organizadora de nucléolo. A presença de sítios teloméricos intersticiais em um par cromossômico de *Salmo salar*, bem como da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, foi considerada indicativa de eventos de fusão cromossômica durante a evolução cariotípica dessas espécies (Chew et al. 2002). Uma revisão mais pormenorizada sobre sequências teloméricas entre os peixes encontra-se em Ocalewicz (2013).

1.7 Pintura cromossômica

O termo “pintura cromossômica” refere-se à uma variação da metodologia FISH convencional, onde são utilizadas sondas construídas a partir de um cromossomo molde (whole chromosome paint – WCP) ou de um segmento cromossômico de interesse (partial chromosome paint – PCP). Desta forma, a sonda não representa somente um único sítio genômico – como nos ensaios de hibridizações convencionais – mas sim toda uma região com numerosos e diferentes sítios genômicos, de tal modo que todo o cromossomo ou o segmento cromossômico está representado, dando a impressão visual de que o mesmo foi “pintado”.

Adicionalmente, o termo *comparative chromosome painting* (pintura cromossômica comparativa), é aplicado quando sondas cromossômicas obtidas de uma espécie são utilizadas para pintura cromossômica em espécies filogeneticamente relacionadas (cross-FISH ou Zoo-FISH) (Yang et al. 2009), possibilitando assim a identificação de regiões compartilhadas entre elas (Chowdhary e Raudsepp, 2001).

As sondas para a pintura cromossômica podem ser obtidas tanto por citometria de fluxo como pela microdissecção cromossômica, utilizando agulhas de vidro ou a laser. Enquanto que no primeiro caso se consegue produzir uma sonda utilizando milhares de cópias de um mesmo cromossomo de interesse, no segundo caso se utiliza apenas poucos cromossomos isolados por microdissecção. Em ambos os procedimentos, o DNA presente nos cromossomos é amplificado em reações de PCR, utilizando *primers* degenerados (DOP-primers) (Yang et al. 2009).

Os estudos envolvendo pintura cromossômica se iniciaram com um enfoque clínico, para detectar rearranjos cromossômicos em humanos que poderiam estar envolvidos na formação de cânceres e de outras patologias (Blough et al. 1998 apud Going e Gusterson, 1999). Os estudos citogenéticos se intensificaram em alguns grupos animais, como por exemplo entre os peixes, a partir da década de 70, com a aplicação de técnicas convencionais já consolidadas como coloração Giemsa, tratamento Ag-NORs e bandeamento C. Posteriormente, com a aplicação da metodologia de FISH para mapeamento de marcadores cromossômicos também foi se intensificando (Almeida-Toledo, 1998). Contudo, até meados dos anos 90, estudos de pintura cromossômica em animais eram ainda restritos, surgindo em sua maioria após 1995, principalmente para investigações de anomalias cromossômicas em animais domésticos (ver Chowdhary e Raudsepp, 2001).

Os experimentos de pintura cromossômica entre espécies distintas (ZOO-FISH) teve seu início no começo dos anos 90, entre espécies relacionadas de homínídeos (e.g Wienberg et al. 1990, Jauch et al. 1992). Scherthan et al. (1994) revolucionaram esta técnica ao obterem sucesso na aplicação de diferentes ensaios de ZOO-FISH entre grupos com mais de 80 milhões de anos de divergência. Neste caso, foram empregadas sondas providas de uma biblioteca de cromossomos humanos a partir de citometria de fluxo, para ensaios de ZOO-FISH nos seguintes grupos de mamíferos: camundongo doméstico (*Mus musculus* - Rodentia), cervos muntjak indiano e chinês (*Muntiacus muntjak vaginalis* e *M. reevesi* - Ungulata) e na baleia comum (*Balaenoptera physalus* – Cetacea). As sondas utilizadas contemplavam tanto os cromossomos sexuais (cromossomo X humano) como os autossômicos (pares 1, 16 e 17 humanos e par 11 de *Mus musculus*, em uma ZOO-FISH bidirecional humano – camundongo). Os resultados utilizando a sonda do cromossomo X indicaram uma conservação do mesmo em Eutheria (mamíferos placentados), uma vez que o padrão de pintura se repetiu para todas as espécies (cromossomo X quase totalmente pintado, com exceção da região correspondente à heterocromatina constitutiva), diferenciando-se apenas no muntjak indiano, o qual apresentou este padrão de pintura quase total somente no braço menor (**Figura 8**). Contudo, vale notar que o cromossomo X nesta espécie é expressivamente maior em relação as demais espécies, o que já

levantava suspeitas sobre uma origem por meio de uma translocação com algum outro autossomo. Curiosamente, a hibridização com sondas construídas a partir do primeiro par cromossômico humano na mesma espécie, destacou segmentos homólogos em ambos os cromossomos sexuais (tanto no X como em seu homólogo Y).

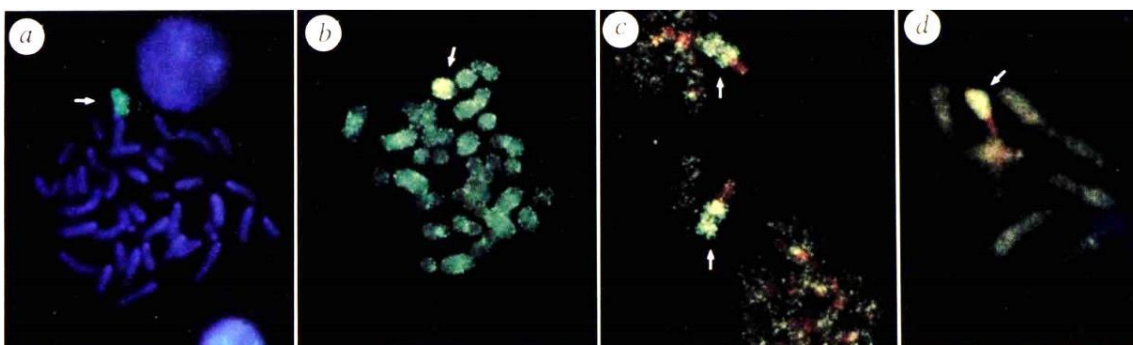


Figura 8: Pintura cromossômica (indicadas pelas setas em branco) realizada por Scherthan et al. (1994) utilizando sondas do cromossomo X humano em diferentes grupos de mamíferos: (a) metáfase do rato doméstico (*Mus musculus*); (b) cervo chinês (*Muntiacus reevesi*); (c) baleia-comum (*Balaenoptera physalus*) e (d) cervo indiano (*Muntiacus muntjak vaginalis*). Os resultados apontam uma origem em comum para o sistema de cromossomos sexuais nos mamíferos placentados.

Atualmente a técnica de pintura cromossômica vem sendo utilizada para diversos grupos, incluindo os peixes, com diferentes enfoques. Vicari et al. (2011) e Scudeler et al. (2015), utilizando-se de sondas cromossômicas totais a partir de microdissecções, fizeram inferências sobre a origem de cromossomos supranumerários (cromossomos Bs) em populações de *Astyanax scabripinnis* e *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae), respectivamente. Em *A. scabripinnis*, além da pintura cromossômica total no cromossomo B, conforme o esperado, sinais de hibridização puderam ser também evidenciados em regiões pericentroméricas de outros pares cromossômicos do complemento. Em células meióticas foi evidenciado auto pareamento em um único cromossomo durante o paquíteno, suportando assim, a hipótese de que o cromossomo B presente na população de *A. scabripinnis* analisada corresponde a um isocromossomo com origem intraespecífica, conforme proposto por Mestriner et al. (2000). Resultados semelhantes foram obtidos em três populações *M. sanctaefilomenae*, apresentando variações quanto ao número de microcromossomos B. Nas três populações foram verificados sinais

de hibridização em regiões pericentroméricas de alguns pares do complemento A. Contudo, somente foi verificada hibridização em um cromossomo B de uma das populações investigadas, presente em 17% dos indivíduos analisados. Os resultados obtidos indicaram que os cromossomos Bs nas populações de *M. sanctaefilomenae* possivelmente se originaram a partir da região heterocromática pericentromérica, dos cromossomos do complemento A. Adicionalmente, foi sugerido que os cromossomos B de *M. sanctaefilomenae* tenham origem independente entre si, considerando a variação observada no padrão de hibridização entre as populações e pelo fato de apenas um cromossomo B de uma única população apresentar resultado positivo para a pintura cromossômica.

Nagamashi et al. (2010), compararam dois citótipos diferentes ($2n=42$ e $2n=40$) de *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes), utilizando sondas cromossômicas totais obtidas por citometria de fluxo. Foram obtidos quatro grupos de sondas, cobrindo todo o genoma de cada espécie, as quais foram utilizadas para experimentos de cross-FISH. Os dados obtidos evidenciaram que somente sete pares cromossômicos do citótipo $2n=42$ apresentaram sintenia conservada no citótipo $2n=40$, indicando que os eventos de rearranjos cromossômicos foram muito mais frequentes do que o estimado somente pelas análises citogenéticas convencionais, revelando duas possíveis espécies crípticas no táxon analisado.

No que diz respeito à problemática da origem e evolução de cromossomos sexuais, há um volume significativo de estudos em diversos grupos de peixes, principalmente nos últimos 10 anos. Notadamente, análises realizadas nos gêneros *Triportheus* (Diniz et al. 2008; Yano et al. 2016), *Hoplías* (Cioffi et al. 2011a,b; 2013; Freitas et al. 2017; Oliveira & Sember, 2017) e no gênero *Eigenmania* (Henning et al. 2008) evidenciaram diferentes processos associados à diferenciação dos cromossomos sexuais, assim como sua origem comum ou independente em espécies filogeneticamente relacionadas, destacando a labilidade evolutiva desses cromossomos entre os peixes.

1.8 Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

A hibridização genômica comparativa (CGH) é um procedimento derivado da FISH usual, porém se diferenciando dela por utilizar todo o genoma do organismo de interesse como sonda. Por intermédio da CGH é possível comparar o DNA genômico (gDNA) de duas espécies/organismos distintos, hibridizando-os simultaneamente em preparações cromossômicas de interesse. Desta forma, é possível comparar regiões sintênicas, de ganho ou de perda de sequências de DNA entre genomas, tanto pela presença/ausência de sinais assim como por sua intensidade ao longo dos cromossomos. A metodologia CGH foi originalmente desenvolvida por Kallioniemi et al. (1992), com enfoque citogenético clínico para análise de tumores. Os autores compararam o gDNA provindo de células tumorais com o de células normais. Para testar a capacidade quantitativa do CGH, foram inicialmente realizados alguns testes com linhagens celulares apresentando variação quanto ao número de cromossomos X. Primeiro, foi hibridizado o DNA provindo de uma linhagem 45, X0 (marcada com streptavidina-FITC) com o DNA referência provindo de indivíduos normais, ensaio este que resultou em uma marcação verde-vermelha uniforme, onde o cromossomo X apresentou-se mais marcado que os demais cromossomos metafásicos. Novas hibridizações, utilizando o DNA provindo de linhagens contendo duas, três, quatro ou cinco cópias do cromossomo X, resultaram em um forte aumento de fluorescência neste cromossomo. Assim, foi constatado que com o aumento no número de cromossomos X, a intensidade de fluorescência aumentava linearmente [Coeficiente de correlação (r) = 0,978], evidenciando que a CGH pode distinguir quantitativamente alterações de sequências de um dado cromossomo (**Figura 9**).

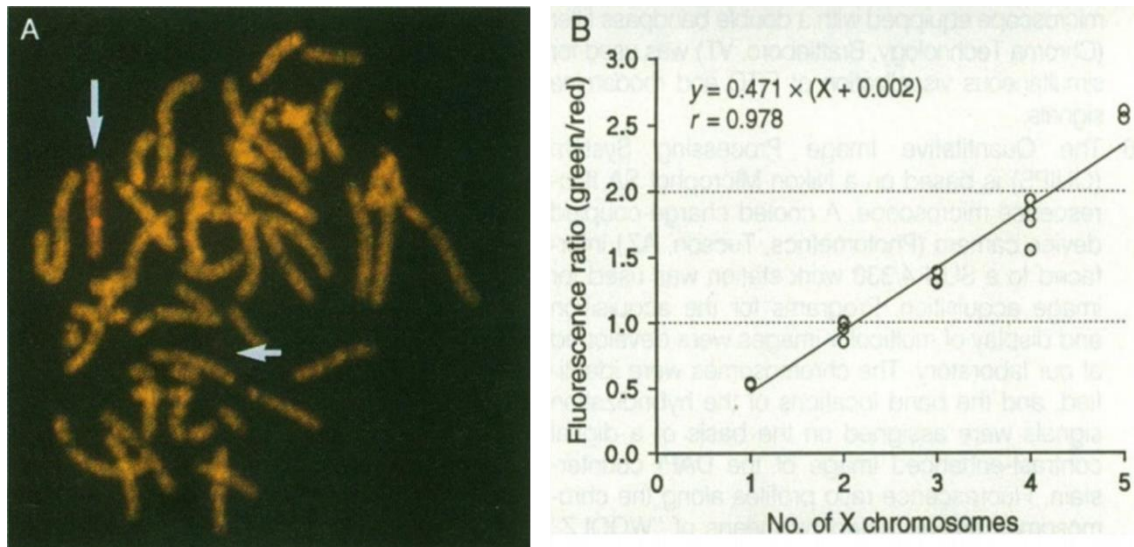


Figura 9: Resultado dos testes realizados por Kallioniemi et al. (1992). Em (A) evidencia-se o resultado do primeiro ensaio de CGH, onde o genoma de uma linhagem celular 45, X0 (em verde) e o genoma de uma mulher normal foram hibridizados em uma metáfase de um homem normal. Os cromossomos apontados pelas setas correspondem aos cromossomos sexuais. O cromossomo X (indicado no canto superior esquerdo) apresenta-se hibridizado com tom vermelho, diferenciando-se dos demais que estão em amarelo (resultado da sobreposição das fluorescências verdes e vermelhas), indicando que o genoma marcado em vermelho possui mais cópias das sequências presentes no cromossomo X do que o genoma marcado em verde. A figura (B) refere-se ao gráfico de correlação do aumento de cópias do cromossomo X com a intensidade da emissão de fluorescência.

Assim como na técnica de pintura cromossômica, a GCH foi expandida, com o passar do tempo, em estudos investigativos em diversos grupos, com diferentes enfoques. Assim, por exemplo, usando de sondas genômicas totais de duas espécies monóicas, Bi e Bogart (2006), identificaram combinações intergenômicas entre cromossomos heterólogos em poliplóides unissexuais de salamandras do gênero *Ambystoma*, refutando hipóteses anteriores que afirmavam uma evolução independente de seus genomas (**Figura 10**). Em virtude da CGH possibilitar a identificação de conjuntos cromossômicos distintos, esta metodologia vem sendo muito utilizada em estudos relacionados a poliplóides e híbridos, conforme revisão de Chester et al. (2010), em diferentes espécies vegetais. Doležálková et al. (2016), utilizaram a CGH para realizar estudos de hibridogênese (modo reprodutivo no qual um dos genomas parentais é excluído da linhagem germinativa) em *Pelophylax esculentus*, uma espécie híbrida de anuro resultante do cruzamento *P. ridibundus* x *P. lessonae*. Utilizando sondas do gDNA de ambos os táxons parentais, os autores conseguiram identificar dois eventos distintos durante a meiose. Em uma das

espécies, foi verificada a eliminação pré-meiótica do genoma de um dos parentais, enquanto que na segunda foram identificados ambos os genomas parentais na fase tardia da prófase I e na metáfase I. Assim, os autores propuseram que em *P. esculentus* a eliminação genômica de um dos parentais pode ocorrer também em estágios pós-meióticos ou ainda estar ausente. Fujiwara et al. (1997), utilizaram-se também desta ferramenta, juntamente com a pintura cromossômica, para identificar a eliminação preferencial de um dos genomas parentais em híbridos resultantes do cruzamento das espécies de peixes, *Oncorhynchus masou* e *O. mykiss*.

Em relação aos peixes, a hibridização genômica comparativa vem também crescendo nos últimos anos. Alguns exemplos recentes são os trabalhos de Oliveira & Sember et al. (2017) e Freitas et al. (2017), os quais investigaram a evolução de sistemas de cromossomos sexuais em *Hoplis malabaricus*, evidenciando a relação de um sistema XY em estágio inicial de diferenciação e sua relação com a origem de um sistema múltiplo do tipo XY1Y2. Yano et al. (2016), utilizaram a CGH para investigar homologias entre os cromossomos sexuais no gênero *Triportheus*, demonstrando a origem comum de um sistema ZZ/ZW entre suas espécies. Moraes et al. (2017), comparando o genoma de espécimes representativos do gênero *Pyrrhulina* (*P. australis* e *Pyrrhulina* aff. *australis*) demonstraram que ambos apresentam composição genômica distinta, justificando sua classificação em espécies distintas.

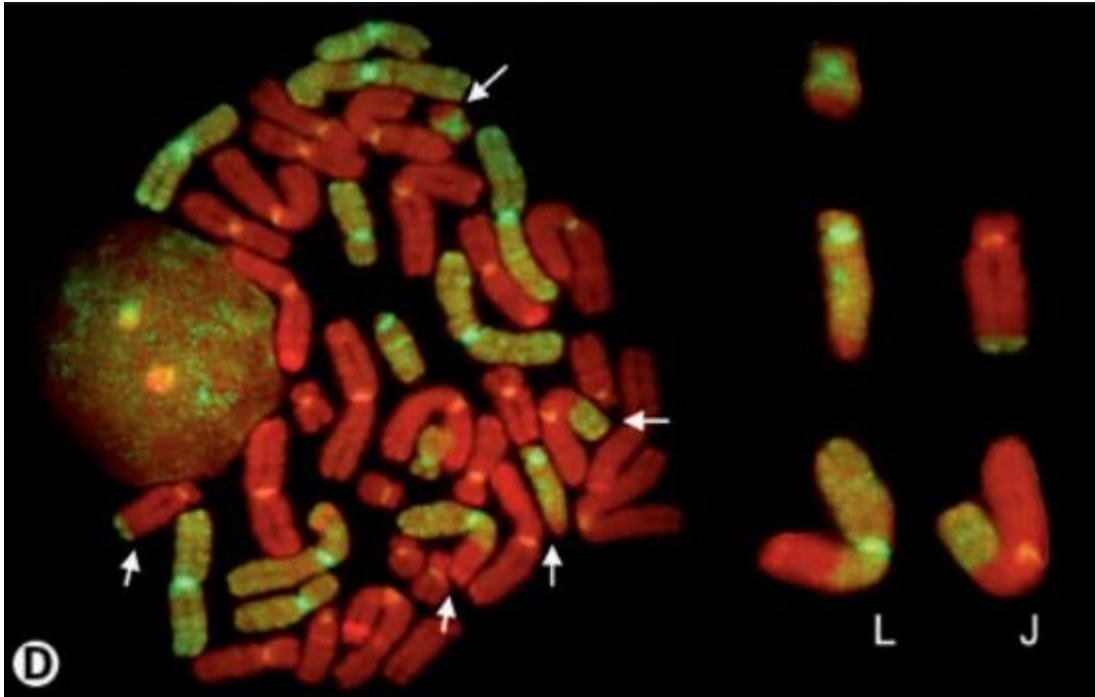


Figura 10: Metáfase de híbrido de *Ambystoma jeffersonianum* x *A. laterale*. Os cromossomos marcados em vermelho correspondem à espécie *A. jeffersonianum* e em verde à espécie *A. laterale*. Os cromossomos indicados pelas setas brancas e também os destacados à direita são heterólogos envolvidos em rearranjos. (Conforme Bi & Bogart, 2006).

1.9 A metodologia DArTseq e o uso de SNPs para estudos de diversidade

Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) são marcadores moleculares co-dominantes bi-alélicos (Vignal et al. 2002) e podem ser definidos como uma variação de uma base nucleotídica em qualquer sítio de DNA. São resultantes de uma mutação pontual que pode originar novos alelos, contendo bases alternativas, em uma determinada posição em um dado locus. A diferença entre os alelos contendo os SNPs é muito sucinta: seus tamanhos são os mesmos e a única diferença é uma única substituição de base, na maioria dos casos entre purinas ou entre pirimidinas, mas eventualmente também entre purinas e pirimidinas (Liu 2007, Vignal et al. 2002). Uma das principais aplicações dos SNPs é na análise da diversidade genética entre populações.

A tecnologia de genotipagem DArT (revisada por Killian et al. 2012) foi desenvolvida por Jaccoud et al. (2001), diferenciando-se das demais metodologias por sua análise ser independente do gel de eletroforese (como as técnicas de SSR e RAPD, por exemplo), podendo ser aplicada em qualquer organismo, mesmo sem se possuir conhecimento prévio sobre as sequências

do mesmo. É baseada no princípio de digestão do DNA genômico total utilizando enzimas de restrição, gerando frações representativas do genoma, preferencialmente de regiões hipometiladas, as quais são utilizadas para a construção de uma biblioteca genômica, processo chamado de “individualização” (**Figura 11**). Graças à redução do genoma a frações representativas do mesmo e à sua independência da análise em eletroforese, o DArT pode gerar milhares de marcadores em somente um único ensaio, possuindo um ótimo custo-benefício. A geração destes marcadores determina a diversidade alélica entre grupos através da verificação da presença/ausência de SNP entre os mesmos. Originalmente, a detecção dos polimorfismos era realizada através da hibridação do genoma de referência com a fração representativa de outro genoma em uma placa. O genoma de referência era marcado com um fluoróforo e o segundo genoma com um fluoróforo diferente e então, através de um *scan*, os picos de hibridização são verificados detectando assim a presença/ausência de SNPs. Atualmente, é possível detectar a presença/ausência dos SNPs diretamente da sequência dos alelos, utilizando-se do DArTseq, técnica que combina a metodologia de redução do genoma desenvolvida no DArT com a tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS).

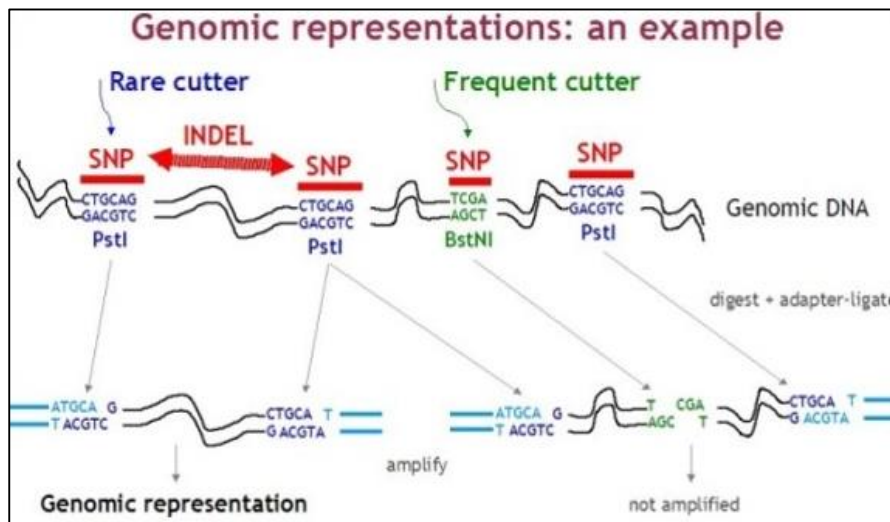


Figura 11: Esquemática da metodologia de redução do genoma em frações representativas, utilizadas para a construção da biblioteca genômica. Somente as sequências com adaptadores em ambas as extremidades são amplificadas e posteriormente clonadas. Imagem retirada de Killian et al. 2012.

De fato, a aplicação do DArTseq vem crescendo nos últimos anos, principalmente em estudos relacionados a espécies vegetais, com um enfoque voltado a agricultura (Amorim et al. 2009; Howard et al. 2011; Garavito et al. 2016; Baloch et al. 2017, entre outros). A aplicação desta metodologia em grupos animais ainda tem sido menos freqüente comparativamente aos vegetais, mas já existem alguns bons exemplos, como o de Melville et al. (2017), no qual os autores utilizaram de marcadores gerados por DArTseq para fazer inferências filogeográficas no lagarto *Ctenophorus caudicinctus* e em uma zona híbrida de sapos (*Litoria ewingi*x*Litoria paraewingi*). Lambert et al. (2016), identificaram marcadores ligados ao sexo no anuro *Rana clamitans*, evidenciando a presença de um sistema XX/XY de cromossomos sexuais. Entre os peixes, Grewe et al. (2015), utilizando essa metodologia, detectaram uma estrutura populacional heterogênea em populações de atum, *Thunnus albacares*, de três localidades do Oceano Pacífico.

Justificativa e Objetivos

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

A ordem Osteoglossiformes possui pelo menos um representante em cada um dos continentes do hemisfério sul, com a exceção da Antártica. Sua ampla distribuição geográfica e posição basal na filogenia dos teleósteos fazem deste grupo um importante modelo para estudos sistemáticos e evolutivos, como indicadores-chave da história biogeográfica das suas regiões continentais (Obermiller & Pfeiler, 2003). Dentre os Osteoglossiformes, a família Notopteridae se destaca considerando sua atual distribuição geográfica, uma vez que seus quatro gêneros estão distribuídos nos continentes africano e asiático, em isolamento decorrente da separação das grandes massas continentais, ocorrida há milhões de anos. Neste sentido, uma abordagem cromossômica informativa, à luz da citogenética clássica e molecular, pode propiciar importantes subsídios para nosso entendimento dos Osteoglossiformes como grupo primitivo dentre os teleósteos. Entretanto, apesar do interesse deste grupo como modelo evolutivo, os estudos citogenéticos são ainda bastante incipientes.

Tal escassez de dados está, em parte, associada à dificuldade de obtenção de boas preparações cromossômica nesse grupo, em adição à sua ampla distribuição por diferentes continentes, dificultando um estudo integrativo que possibilite uma visão globalizada do seu processo evolutivo. Assim sendo, o presente projeto objetivou vencer tais barreiras, propondo uma abordagem cromossômica informativa, à luz da citogenética clássica e molecular, propiciando importantes subsídios para nosso entendimento dos Osteoglossiformes como grupo basal entre os teleósteos. Particularmente, foi enfocada a investigação de características cromossômicas e genômicas de espécies de Notopteridae, buscando analisar sua biodiversidade em nível cariotípico, para levantando subsídios informativos quanto à sua atual biogeografia e relações interespecíficas.

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar a estrutura cariotípica geral quanto ao número diplóide e morfologia dos cromossomos das espécies *Chitala lopis*, *C. ornata*, *C. chitala*, *C. blanci*, *Notopterus notopterus*, *Xenomystus nigri* e *Papyrocranus afer*.
- Analisar a distribuição da heterocromatina C-positiva e de bandas CMA₃ positivas em seus cromossomos, assim como a detecção de regiões organizadoras de nucléolo (RON) por nitrato de prata.
- Mapear a distribuição cromossômica dos sítios de DNAr 18S e DNAr 5S e de sítios de DNAs microssatélites (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAA)₁₀ e CGG₁₀.
- Investigar possíveis rearranjos cromossômicos, utilizando sondas de DNA telomérico (TTAGGG)_n.
- Detectar compartilhamentos de sequências genômicas entre os cariótipos, por intermédio de pintura cromossômica (WCP) e hibridização genômica comparativa (CGH).
- Analisar a diversidade genética presente entre as espécies através de sequenciamento genômico pelo método de DArTseq.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção amostral

Representantes de sete espécies da família Notopteridae de diversas bacias hidrográficas africanas e do sudeste asiático foram amostrados, sendo obtidos a partir de parcerias estabelecidas com os grupos de pesquisa da Obafemi Awolowo University (Nigéria) e da Universidade de Khon Kaen (Tailândia) (**Figura 1 e Tabela 1**). Os indivíduos foram depositados na coleção de peixes do Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo (MZUSP, vouchers 20557, 20557 e 119845).

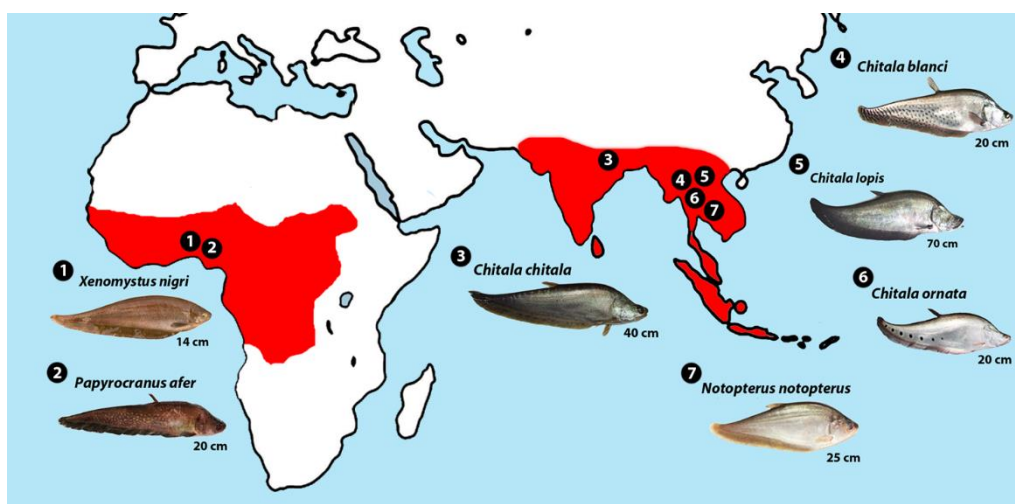


Figura 1: Mapa ilustrativo dos locais de origem dos espécimes estudados

Tabela 1: Localidade de captura das espécies estudadas

Espécies	Locais de coleta	n amostral
<i>Chitala blanci</i>	Bacia do Song Khram, Tailândia	(04♀; 04♂)
<i>Chitala chitala</i>	Bacia do Song Khram, Tailândia	(05♀; 04♂)
<i>Chitala lopsis</i>	Bacia do Song Khram, Tailândia	(12♀; 06♂)
<i>Chitala ornata</i>	Bacias do Chi e do Mekong, Tailândia	(09♀; 07♂)
<i>Notopterus notopterus</i>	Bacias do Chi e do Mekong, Tailândia	(06♀; 04♂)
<i>Papyrocranus afer</i>	Rio Oluwa, Nigéria	(19♀; 21♂)
<i>Xenomystus nigri</i>	Rio Oluwa, Nigéria	(13♀; 24♂)

3.2 Obtenção de cromossomos mitóticos in vivo - Bertollo et al. (2015)

Foi aplicado intra-peritonealmente uma solução de colchicina à 0,0025% (1 ml de solução de colchicina / 100 g de peso do animal), tratando os espécimes por um período entre 30 e 40 min. Decorrido esse tempo os indivíduos foram anestesiados com uma solução de benzocaína (1g/1000ml) e realizado um corte na região ventral, de modo a expor a cavidade visceral do animal. Foram então extraídos fragmentos da região anterior do rim, os quais foram transferidos para cubas de vidro contendo 10 ml de solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl) 0,075M. O material foi dissociado com uma seringa hipodérmica desprovida de agulha, seguiu-se a hipotonização celular por 30 minutos à 37°C. O material foi então transferido com uma pipeta Pasteur para um tubo de centrifugação tipo Falcon, adicionando-se algumas gotas de fixador Carnoy I recém-preparado (metanol + ácido acético glacial na proporção 3:1). O material foi então homogeneizado com uma pipeta Pasteur e centrifugado por 10 min a 1200 rpm, descartando o sobrenadante. Adicionou-se ao precipitado celular 5-10 ml de fixador, deixando-o escorrer pelas paredes do tubo, novamente homogeneizando o material com uma pipeta Pasteur. Este procedimento de fixação foi repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado aproximadamente 1 ml de solução fixadora ao precipitado celular, ressuspendendo-o. A suspensão celular foi então guardada em freezer, acondicionada em tubos Eppendorf de 1,5 ml. Os experimentos seguiram as condutas éticas em acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Processo número CEUA 1926260315).

3.3 Preparação das lâminas – “air drying”

Cerca de 10µl da suspensão celular foi pingado sobre uma lâmina aquecida a 60 °C em placa aquecedora. As preparações foram secas diretamente ao ar e coradas durante 8 minutos com uma solução de Giemsa/tampão fosfato (pH 6,8) a 10%. O excesso de corante foi retirado pela lavagem da lâmina com água destilada e posteriormente secada ao ar.

3.4 Detecção da heterocromatina C-positiva (bandamento C) - Sumner (1972)

Seguiu-se o protocolo descrito por Sumner (1972), com algumas modificações. As preparações cromossômicas foram previamente tratadas com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2N, à 42 °C, durante 12 min e lavadas com água destilada, deixando-se secar ao ar. A seguir, o material cromossômico foi tratado com uma solução de hidróxido de Bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) a 5% recém preparada e filtrada, aquecida a 42°C, durante 3min e 30seg. As lâminas foram então submersas rapidamente em solução de HCl 0,2 N e lavadas com água destilada. Posteriormente, o material foi tratado com uma em solução salina de citrato de Sódio concentrado 2x (2xSSC), aquecido à 60°C, durante 45 min. Decorrido esse tempo, as laminas foram lavadas em água destilada e secadas a temperatura ambiente. Os cromossomos foram então corados com 20 μl de solução de iodeto de Propídio/“antifading” (50mg/ml) e cobertos com uma lamínula. Após aguardar alguns minutos para estabilizar o corante, as laminas foram analisadas em um fotomicroscópio de epifluorescência Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan).

3.5 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) por nitrato de Prata (Ag-NORs) - (Howell & Black, 1980)

Foi utilizado o procedimento descrito por Howell & Black (1980) com algumas modificações. Os cromossomos foram tratados com uma solução de 0,5g de nitrato de Prata (AgNO_3) dissolvido em 2 ml de água destilada + gelatina comum, na proporção 1:2. Três gotas desta mistura foram adicionadas sobre cada lâmina, cobrindo-se o material com lamínula e permanecendo em estufa a 60°C durante 12 minutos. Posteriormente, o material foi lavado com água destilada, secado ao ar e analisado em microscópio óptico de campo claro.

3.6 Detecção de bandas cromossômicas GC-ricas - (Schmid, 1980)

Seguiu-se o protocolo descrito por Schmid (1980), com algumas modificações. Os cromossomos foram corados com o fluorocromo Cromomicina A₃ (CMA₃) e contra corados com Distamicina A. Foram adicionados 80µl de solução de Cromomicina A₃ sobre cada lâmina, cobrindo com uma lamínula e permanecendo por 1 hora no escuro. Após a lavagem em água corrente e secagem ao ar, foram adicionados cerca de 80µl de solução de Distamicina A sobre cada lâmina, cobrindo-se novamente com uma lamínula e permanecendo por 15 minutos no escuro. Após lavagem em água corrente e secagem rápida ao ar, foram adicionados cerca de 20µL de solução de DAPI/“antifading” sobre cada lâmina. As laminas foram analisadas em um fotomicroscópio de epifluorescência Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan).

3.7 Obtenção e marcação das sondas para FISH

3.7.1 Sondas de sequências de DNA repetitivo

- Família multigênica de DNAr 5S: As sequências foram isoladas diretamente do genoma de *Hoplias malabaricus* por PCR, incluindo 120 pares de bases do gene codificante do RNAr 5S e 200 pares de bases do espaçador não-transcrito (NTS) (Martins et al. 2006).
- Família multigênica de DNAr 18S: As sequências foram também isoladas diretamente do genoma *Hoplias malabaricus* por PCR, sendo compostas por um segmento de 1.400 pares de bases da sequência codificante (Cioffi et al. 2009).
- Oligonucleotídeos enriquecidos com sequências microssatélites: Os oligonucleotídeos enriquecidos com sequências microssatélites d(GA)₁₅, d(CA)₁₅, d(CAA)₁₀ e d(CGG)₁₀ foram marcadas diretamente com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese, por Sigma (St. Louis, MO, USA), segundo Kubat et al. (2008), com pequenas modificações.

- DNA telomérico: as sondas teloméricas foram geradas por PCR (PCR DIG-Probe Synthesis Kit, Roche), usando primers (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991).

3.7.2 Sonda para pintura cromossômica

a) Microdissecção cromossômica total: Seguiu-se a metodologia descrita por Yang et al. (2009), com pequenas modificações. As microagulhas para a raspagem cromossômica foram preparadas em um puller modelo PB-7 (Narishige, Japão), utilizando bastões de vidro de 2 mm (Schott Glas, Mainz, Alemanha), sendo expostas à luz ultravioleta, por 30 min, antes de sua utilização. As micropipetas foram também preparadas no mesmo aparelho, utilizando pipetas Pasteur de 250 mm (Assistent, Sondheim, Alemanha), as quais foram siliconizadas utilizando dimetildiclorosilano 1% em tetracloreto de Carbono, e incubadas a temperatura de 100 °C, por 30 min.

Três a quatro gotas das suspensões cromossômicas de *Xenomystus nigri* foram adicionadas sobre diferentes regiões de uma lamínula previamente tratada em solução 10 x SDS, e coradas com Giemsa 5% por 3 min. Posteriormente, a microdissecção de quinze cópias cromossômicas do primeiro par (considerando que o cromossomo 1 é o maior do cariótipo, e sua identificação é segura para realizar a microdissecção) foi realizada utilizando um microscópio invertido Axiovert 135 (Zeiss, Jena, Alemanha), com a agulha estéril acoplada a um micromanipulador mecânico (Zeiss, Jena, Alemanha). A agulha foi cuidadosamente deslocada até uma posição um pouco acima do cromossomo alvo, possibilitando que fragmentos do mesmo fossem progressivamente coletados até sua microdissecção completa. Os fragmentos cromossômicos foram transferidos para uma micropipeta contendo uma solução coletora (10 mM Tris- HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, SDS 0,1%, 1 mM EDTA pH 7,5 - 8,0, 1% Triton X- 100, 1.44 mg/ml de proteinase K e 30% de glicerol) e inserida em uma câmara úmida a 60 °C por 1 h. As micropipetas foram quebradas em um tubo do tipo Eppendorf contendo 100 mM de dNTPs, 5 mM de primer DOP GMW (5 '-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') e tampão de diluição Sequenase (24mM Tris HCl, pH 7.5, 12mM MgCl₂, 30mM NaCl).

b) Geração de sondas por DOP-PCR: O processo de amplificação foi realizado em um termociclador (Axygen Therm-1000). Os oito primeiros ciclos de amplificação foram realizados utilizando a DNA polimerase T7 (USB, Cleveland, EUA), com o seguinte programa: 90 °C/1 min; 25 °C/2 min; 34 °C/2 min. Um passo inicial de desnaturação a 92 °C, por 5 min, foi adicionado a cada ciclo para inativar a atividade da proteinase K. 0,3U de Sequenase foi adicionada a cada ciclo durante a etapa de reanelamento. Em seguida, foram adicionados 50 µl de um mix contendo 0.1 U Taq polymerase, 0.2 mM dNTPs, 20 µM DOP primer, 25 mM MgCl₂ and 34.23 µl of água para PCR, e 33 ciclos de amplificação foram realizados com o seguinte programa: 92 °C/1 min; 56°C/2 min; 72 °C/2 min, seguido por uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Tais procedimentos foram viabilizados por parceria estabelecida com o laboratório de Molekulare Zytogenetik (Universitätsklinikum Jena - Alemanha), chefiado pelo Prof. Dr. Thomas Liehr.

c) Marcação das sondas

As sondas de DNAr 18S foram marcadas com biotina-16-dUTP, utilizando o kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche) enquanto as sondas de DNAr 5S foram marcadas com DIG-11-dUTP, utilizando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche), conforme as instruções do fabricante. As sondas contendo sequências enriquecidas com DNA microssatélites e as sondas teloméricas foram marcadas diretamente conforme citado anteriormente.

A sonda cromossômica total do primeiro par cromossômico de *X.nigri* foi marcada com Spectrum-Orange dUTP (Vysis, Downers Grove,6 EUA), via PCR em 30 ciclos de DOP-PCR utilizando 1 µL dos produtos iniciais de amplificação por DOP-PCR (Yang et al. 2009). Os ciclos de amplificação foram realizados utilizando a AmpliTaq DNA Polymerase (Roche, Basel, Suíça), com o seguinte programa: 91°C/1 min; 56°C/1 min; 72°C/2min, com um passo inicial de desnaturação a 92°C por 3 min e uma etapa de extensão final de 5 min a 72°C.

3.7.3 Sondas para hibridização genômica comparativa (CGH)

Os experimentos de CGH foram realizados entre espécies dos quatro gêneros de Notopteridae e entre espécies do gênero *Chitala*, conforme ilustrado na **Figura 2**. As espécies utilizadas para as preparações cromossômicas tiveram seu DNA genômico total marcados com biotina-16-dUTP utilizando o kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche), enquanto o DNA das espécies a serem hibridizadas foi marcado com DIG-11-dUTP, utilizando o kit DIG-Nick Translation Mix (Roche), conforme as instruções do manual do fabricante. Para cada sonda, 500 ng de gDNA foi usado na marcação.

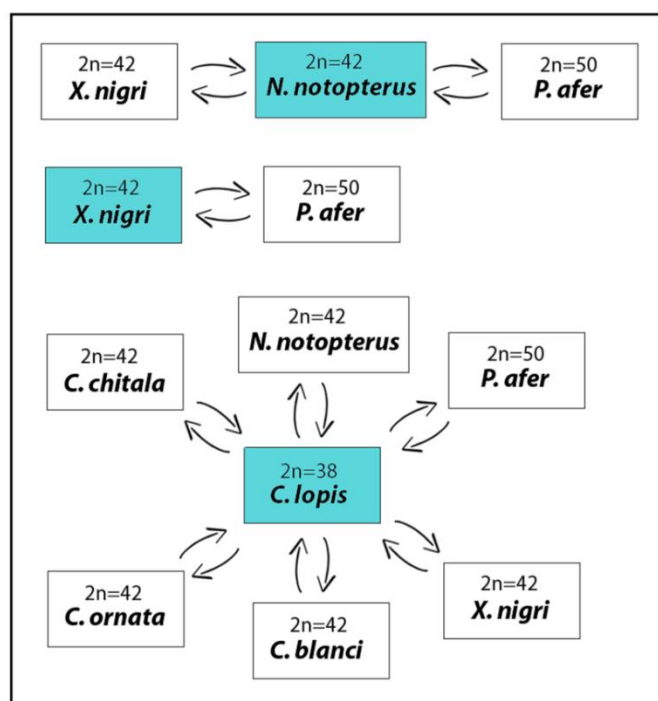


Figura 2: Combinação dos experimentos realizados para a CGH. Nos quadros em azul, estão indicadas as espécies à partir das quais foram utilizadas preparações cromossômicas. Os quadros em branco representam as espécies a partir das quais foram utilizados os genomas como sondas.

Precipitação das sondas

O produto destas reações foi precipitado com acetato de Potássio, tRNA e etanol 100% *overnight* à -20°C. Posteriormente, os materiais foram centrifugados por 30 minutos a 13.000 rpm descartando o sobrenadante. Para retirar o excesso de sais foi adicionado etanol 70% ao precipitado durante 10

min à -20°C, sendo então centrifugado novamente a 13.000 rpm descartando os sobrenadantes. As sondas precipitadas ficaram em estufa a 37° C a fim de secarem completamente.

3.8 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

3.8.1 FISH para sondas de DNA repetitivos - (Pinkel et al. 1986)

As preparações cromossômicas foram inicialmente desidratadas em uma série de etanol a 70, 85, e 100%, 3 min em cada banho, secadas ao e incubadas com uma solução de RNase (10 mg/ml), por 1 hora à 37°C, em câmara úmida. Em seguida, após lavagem em 1 x PBS por 5 min, as lâminas foram tratadas com uma solução de pepsina 0.005% em HCl 10 mM por 3 min, a 37 °C. As lâminas foram lavadas novamente em 1 x PBS por 5 min e o material fixado em paraformaldeído 1% em temperatura ambiente por 10 min. Após a lavagem, o material foi desidratado com 70%, 85%, e 100% por 3 min, seguindo-se a desnaturação do DNA cromossômico em formamida 70%/ 2 x SSC por 3 min e 15 seg à 72 °C, e a desidratação dos cromossomos em etanol gelado a 70%, 85% e 100% em temperatura ambiente por 3 min em cada banho. O mix de hibridização, contendo 100 ng de cada sonda desnaturada, 10 mg/ml de sulfato de dextrano, 2 x SSC e 50% de formamida, em um volume final de 20 µl, foi aquecido à 85°C, por 10 min, e então aplicado sobre as lâminas, sendo a hibridização realizada por um período de *overnight*, à 37 °C, em câmara úmida. As lavagens de estringência (pós-hibridização) foram realizadas em 2 x SSC e depois em 1 x SSC, por 5 min em cada banho, a 42 °C e posteriormente em uma solução de Tween/4 x SSCT à temperatura ambiente. As sondas, marcadas diretamente, passaram por mais uma última lavagem em 1 x PBS e posteriormente desidratadas e contra coradas. Já as sondas marcadas indiretamente foram submetidas a uma etapa de detecção com anti-biotina-FITC (Roche) ou anti-digoxigenina-rodamina (Roche) por 1 h. Depois da detecção, as lâminas foram lavadas três vezes em Tween/4 x SSC à temperatura ambiente por 5 min cada lavagem. Subsequentemente, as lâminas foram desidratadas em etanol (70%, 85%, e 100%), por 3 min em cada banho. Os cromossomos foram contra corados com DAPI (1,2 µg/ml) e as preparações montadas em solução antifading (Vector, Burlingame, CA, EUA).

3.8.2 FISH para pintura cromossômica – Yano et al. (2017)

Os passos iniciais do processo de FISH (tratamento em RNase, tratamento em solução de pepsina, fixação dos cromossomos em paraformaldeído e desnaturação em formamida), foram realizados basicamente da mesma maneira como nos procedimentos de FISH para sondas de DNAs repetitivos, descritos anteriormente. As poucas modificações referem-se à adição de duas etapas de lavagens em 2 x SSC durante 5 minutos, após o tratamento em RNase. Adicionalmente, foi também usado Cot-1 DNA, diretamente isolado de *X. nigri*, preparado de acordo com Zwick et al. (1997). 50 µg de Cot-1 DNA foi dissolvido juntamente com o mix de hibridização, contendo 500 ng de sonda do primeiro par cromossômico de *X. nigri*, 10 mg/ml de sulfato de dextrano e 2 x SSC e 50% de formamida. A desnaturação difere-se da realizada para as sondas de DNA repetitivo, pois envolve um ciclo. A sonda, juntamente com o Cot-1, foi aquecida à 75 °C por 5 min, 4 °C por 2 min e 37 °C por 30 – 60min. Esta etapa garante a hibridização das sequências repetitivas da sonda com o Cot-1, evitando assim sinais inespecíficos na revelação da FISH. A hibridização ocorreu durante 6 dias em câmara úmida escura, a 37 °C. As lavagens pós-hibridização foram realizadas em 1 x SSC por 5 min à 60 °C, em 2 x SSC à 42°C por 5 min e em Tween/4 x SSCT a temperatura ambiente, seguida de uma lavagem rápida em 1 x PBS. As lâminas foram então desidratadas (etanol 70%,85% e 100%) e os cromossomos foram contra corados com DAPI (1,2 µg/ml) e montados em solução antifading (Vector, Burlingame, CA, EUA).

3.8.3 FISH para CGH - Symonová et al. (2015),

As preparações cromossômicas foram submetidas a uma série alcoólica (etanol 70%, 85% e 100%), por 3 min em cada banho e mantidas no freezer por 24h. Após esse período, as lâminas foram colocadas diretamente em etanol 70% à -20 °C e depois em etanol a 85% e 100%, em temperatura ambiente. Após lavagem em 2 x SSC por 5 min, seguiram-se os pré-tratamentos com RNase e pepsina, conforme descritos anteriormente. O DNA cromossômico foi desnaturado em formamida 75%/ 2 x SSC por 3 min a 74 °C.

Após a desnaturação, seguiu-se a desidratação em etanol 70% gelado, e 85 e 100% à temperatura ambiente, por 3 min em cada banho. O mix de hibridização (500 ng de cada DNAg marcado + 13 µg de Cot-1 de cada espécie, formamida 50%, 10 mg/ml de sulfato de dextrano e 2 x SSC) foi desnaturado a 86 °C por 6 min e aplicado sobre as lâminas. A hibridização foi realizada por um período de 72h à 37 °C, em câmara úmida. Depois da hibridização, as lâminas foram lavadas uma vez em formamida 50% /2 x SSC a 42 °C por 5 min, por três vezes em 1 x SSC a 42 °C por 7 min e em 2x SSC por 20 seg a temperatura ambiente. Os sinais de hibridização foram detectados usando uma solução composta por anti-digoxigenina-FITC (Roche), diluída em albumina sérica bovina 0.5% /PBS, e estreptavidina- CY3 (Invitrogen Life Technologies, San Diego, Calif., USA) diluída em PBS contendo soro de cabra normal a 10%. As lâminas foram lavadas quatro vezes em 4 x SSCT à 42 °C, por 7 min em cada lavagem. Os cromossomos foram contra corados com DAPI (1,2 µg/ml) e as lâminas foram montadas em solução anti-fading (Vector, Burlingame, CA, EUA).

3.9 Análises cariotípicas

As preparações cromossômicas foram analisadas em microscópio de campo claro, em média 30 metáfases de cada espécie, para a determinação do número diplóide modal de cada uma delas. As melhores preparações foram fotografadas utilizando o software CoolSNAP-pro, Image Pro Plus 4.1 (Media Cybernetic), em microscópio Olympus BX50 (para metáfases de análises de campo claro) ou o software ISIS digital FISH imaging system (MetaSystems, Altlussheim, Germany), com os filtros apropriados para imagens de fluorescência. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964) em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocentricos (st) ou acocentricos (a) com base na relação de braços apresentada (m: RB= 1,0-1,7; sm: RB=1,71 -3,0; st: RB=3,01 -7,0; a: RB>7,0).

3.10 Metodologia DArT-seq e análise dos dados

3.10.1 Extração de DNA e genotipagem

A extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Sambrook et al. (2001). A genotipagem por sequenciamento (DArTseq) foi realizada por Diversity Arrays Technology Pty Ltd, seguindo os protocolos descritos por Grewe et al. (2015). Uma combinação das enzimas de restrição PstI e SphI foi utilizada para construir as bibliotecas, de acordo com Kilian et al. (2012). O QCed e o sequenciamento foram realizados no Illumina HiSeq2500 next-generation. Duas bibliotecas foram construídas para cada amostra de DNA e todo o processo de geração de dados foi feita com replicação técnica total. Aproximadamente 2.5 milhões de sequências foram usadas por amostragem, para gerar os marcadores. Os marcadores foram extraídos usando o pipeline analítico proprietário DArT PL's, o qual, juntamente com a ligação alélica e o levantamento de dados de marcadores metadata, validaram a consistência da ligação alélica entre as replicatas técnicas. Os single-nucleotide polymorphisms (SNPs) e marcadores SilicoDArTs foram extraídos das sequências da fração representativa do genoma (as bibliotecas). Os SilicoDArTs, que representam a presença/ausência de fragmentos de restrição específicos na representação do genoma, foram marcados como "1" para a presença e "0" para ausência dos fragmentos. Os SNPs foram categorizados no formato "two-row" – cada linha representando um alelo específico para o locus SNP. A ausência do alelo foi representada por "0" e a presença por "1" (Lambert et al. 2016).

3.10.2 Análise da diversidade genética

Da matriz de dados SNP DArTseq filtrada, uma matriz de similaridade genética em par (baseada em Dice, 1945) foi computada e aplicada para a análise de diversidade genética usando os pacotes do programa R. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com o pacote FactorMineR (Le et al. 2008), enquanto que a clusterização hierárquica com p-values (AU, Approximately Unbiased p-value and BP, Bootstrap Probability value) foi realizada com o pacote pvclust (Suzuki et al. 2006) usando a distância

eucladiana. As relações entre as espécies de Notopteridae foram construídas usando os dados obtidos por DArTseq juntamente com as características cromossômicas. O status dos marcadores DArTseq foi codificado como “0”, quando nenhuma diferença na comparação de dados foi encontrada e como “1” quando verificada a presença de SNP. As análises foram realizadas no programa MrsBayes v. 3.2 (Ronquist et al. 2012), usando dois sets de dados separados (dados cromossômicos e DArTseq). Foi utilizado o modelo padrão, considerando a ausência de informações sobre a taxa de mutação das sequências. A cadeia de Markov Monte Carlo (mcmc) foi programada para 2 bilhões de gerações, com coleta de amostragem na frequência de 10.000 e 500.000 burn in. A análise foi processada duas vezes para alcançar o desvio padrão abaixo de 0,05 (0,02 no presente trabalho) e probabilidade posterior igual a 1,000810. O cladograma de relação foi gerado pelo programa FigTree v. 1.4.3 (Rambaut, A. & Drummond, 2010).

3.10.3 Anotação das características funcionais dos alelos

O arquivo Fasta contendo 1.537 sequências alélicas SNP (excluindo os alelos referência), todas elas contendo 69 nucleotídeos de tamanho, foram usadas para a procura de BLAST (Altschul et al. 1990) aplicando os algoritmos BLAST-NorBLAST-X implementados nos programas in-house escritos no Visual Basic (Ribeiro et al. 2006). As sequências alélicas foram comparadas a três coleções de Teleostei presentes na base de dados RefSeq/NCBI (O’Leary et al. 2016): mRNA Teleostei (373.153 sequências de mRNA referente a seis espécies), nucleotídeos Osteoglossiformes (48.195 sequências genômicas/mRNA de 23 espécies) e proteínas Osteoglossiformes (41.731 sequências proteicas retiradas de 239 espécies). Foi usada para as análises de BLAST um E-value (Expected value) abaixo de 0.1. A classificação funcional das sequências alélicas foram manualmente ajustadas, baseadas na descrição dos melhores “matches” contra as três coleções RefSeq. Todos os resultados dos BLAST foram plotados em hiperlinks, em planilha do Excel.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo e a sua discussão encontram-se subdivididos no formato de dois capítulos, os quais constituem artigos científicos a serem submetidos para publicação em periódicos especializados da área.

Capitulo 4.1

From chromosomes to genome: insights into the evolutionary relationships and biogeography of Old World knifefishes (Notopteridae; Osteoglossiformes)

Felipe Faix Barby¹ (felipe_barby@hotmail.com)

Petr Ráb² (rab@iapg.cas.cz)

Sébastien Lavoué³ (microceb@hotmail.com)

Tariq Ezaz⁴ (Tariq.Ezaz@canberra.edu.au)

Luiz Antônio Carlos Bertollo¹ (bertollo@ufscar.br)

Andrzej Kilian⁵ (zej@diversityarrays.com)

Sandra Regina Costa Maruyama¹ (srmaruyama@gmail.com)

Ezequiel Aguiar de Oliveira¹ (ezekbio@gmail.com)

Roberto Ferreira Artoni⁶ (rfartoni@gmail.com)

Mateus Henrique Santos⁶ (mhsantos@uepg.br)

Oladele Ilesanmi Jegede⁷ (jegadeio@yahoo.co.uk)

Alongklod Tanomtong⁸ (tanomtong@hotmail.com)

Marcelo de Bello Cioffi^{*1} (mbcioffi@ufscar.br)

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz Km. 235, C.P. 676, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

²Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, Liběchov 277 21, Czech Republic

³Institute of Oceanography, National Taiwan University, Roosevelt Road, Taipei 10617, Taiwan

⁴Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Australia

⁵Diversity Arrays Technology, University of Canberra, Bruce, Australian Capital Territory, Australia.

⁶Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

⁷Department of Fisheries and Aquaculture, Adamawa State University, Mubi. Adamawa State, Nigeria

⁸Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, KhonKaen University, Muang, KhonKaen 40002, Thailand.

^{*1}Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz Km. 235, C.P. 676, São Carlos, SP 13565-905, Brazil. E-mail: mbcioffi@ufscar.br

Abstract

In addition to its wide geographical distribution, osteoglossiform fishes represent one of the most ancient freshwater teleost lineages; making it an important group for systematic and evolutionary studies. However, the cytogenetics and genomics data are still scarce, making it difficult to track evolutionary trajectories within this order. With a Gondwanan origin, nowadays the Notopteridae family show an African-Asian distribution and the biogeography of this family is still debated. Here, we performed a detailed chromosomal analysis of seven Notopteridae species, using conventional and advanced molecular cytogenetic methods, and we also assessed by genotyping by sequencing technology (Dart-Seq) the genetic distances of examined species with the purpose to discuss the evolutionary history of this family. Our results demonstrate two major notopterids clades based on genomic and chromosomal features: The African and the south Asia species. Moreover, regarding the rDNA probes, the asian specie *Chitala chitala* showed more similarities with *Papyrocranus afer*, an african specie. Remarkably, *C. chitala* has the narrowest distribution inside the Asian continent, restrict to India only, indicating that India probably represented the migration route for notopterids to Asia. Here we discuss the impact of continental drift and split of Pangea on their recent diversity, as well as the contribution to biogeographical model that explain their distribution.

Introduction

The monophyletic order Osteoglossiformes is one of the most iconic and ancient (Early Triassic) groups of freshwater teleosts and it is nowadays restricted to tropical regions of South America, Africa, Asia and Australia (Bănărescu, 1990; Greenwood and Wilson, 1998; Hilton, 2003). The intercontinental distribution of the Osteoglossiformes, combined with their intolerance to salinity and rich fossil record, attracted a lot of attention in Biogeography to determine the contribution of tectonic-mediated vicariant events relative to marine or geo-dispersal events (Lavoué, 2016).

In particular, the geographical distribution of the osteoglossiform family Notopteridae ("Old World knifefishes"; Vidthayanon 2005) in Africa, India and Southeast Asia long represents one of the challenging problems of freshwater biogeography at the intercontinental scale (Wilson and Murray 2008). The Notopteridae includes four genera, namely *Chitala*, *Notopterus*, *Xenomystus* and *Papyrocranus*, and about ten species (Roberts 1992). While *Chitala* and *Notopterus* are endemic to the Indian region and Southeast Asia (i.e. Sundaland and Indochina), *Papyrocranus* and *Xenomystus* are endemic to West and Central Africa (Roberts, 1992). All species are restricted to freshwaters although Roberts (1992) reported that the bronze featherfish, *Notopterus notopterus*, might occasionally support low levels of salinity. *Chitala* currently comprises six valid species while *Papyrocranus* includes two species and *Xenomystus* and *Notopterus* are each monospecific (Roberts 1992, Nelson, 2016). Recent phylogenetic studies strongly support the monophyly of Notopteridae and divide it into two clades, one African clade comprising *Xenomystus* and *Papyrocranus* (subfamily Xenomystinae) and one Asian clade comprising *Notopterus* and *Chitala* (subfamily Notopterinae) (Lavoué and Sullivan 2004, Inoue et al. 2009, Nelson et al. 2016). None of the previous molecular studies, however, included the Indian *Chitala chitala*, the type species of the genus *Chitala* (Roberts 1992). Within the Osteoglossiformes, the Notopteridae is the sister group of the African weakly electric fishes, the superfamily Mormyroidea (Mormyridae plus Gymnarchidae). Together, they form the suborder Notopteroidei which is the sister group of the Osteoglossoidei (Osteoglossidae plus Arapaimidae). The earliest notopteroid fossil is

Palaeonotopterus greenwoodi from a Cenomanian outcrop in North Africa. The phylogenetic position of this fossil is still uncertain (Taverne and Maysen, 1999; Cavin and Forei 2001) but it conclusively marks the early presence of Notopteroidei in Africa.

Despite the higher-level phylogeny of the notopteridae is well resolved and well supported, the biogeography of this family is still debated mainly because of discrepancies in different molecular dating estimations. Depending on the inferred diversification timescale, there are two competing biogeographical hypotheses that have been suggested to explain the Africa-Asia distribution of Notopteridae. According to Inoue et al. 2009, we have two possibilities: 1) the vicariant hypothesis states that the divergence between Asian Notopterinae and African Xenomystinae was caused by the fragmentation between Africa and India/Madagascar and 2) the geodispersal hypothesis states that a land bridge between Africa and, either Eurasia or India, was used by the ancestors of Notopterinae to colonize Asia. This geodispersal event could have happened in two different moments: before the complete Pangea separation into Laurasia and Gondwana (approximately 160mya; Hay et al. 1999) or in a recent transcontinental migration when or after the connection between the African continents and Eurasia landmasses (as proposed by Bănărescu 1991) through closure of the Eastern Mediterranean seaway in the early Miocene (ca. 20 Mya) (Rögl, 1998). Once that the members of the Osteoglossomorpha are generally considered to be primary freshwater fishes (Myers, 1949), a transmarine dispersal hypothesis seems to be unlikely. The fossil record of Notopteridae in Asia (including the Indian region) is only partially informative. The oldest fossils assigned to the family Notopteridae are otoliths of Cretaceous/Paleogene age that were excavated from India. Their precise phylogenetic position is unresolved although they probably belong to stem species of Notopteridae. The oldest (and only) fossil assignable to the crown group Notopterinae is a fossil of *Notopterus* unearthed from Sumatra that is, possibly, as old as the Eocene (Sanders, 1934). The age of this fossil provides a corresponding minimum age for the presence of Notopterinae in Asia, a transmarine dispersal hypothesis seems to be unlikely

Therefore, these remaining questions should be (re)examined using multivariate approaches. In this line, karyotype investigations coupled with

analysis of genetic distance based on high-resolution sequencing data and biogeographic analyses may provide further powerful insight into such problems. It constitutes a particular model for biogeographic and evolutionary studies (e.g. Kumazawa & Nishida, 2000, Wilson and Murray 2008, Lavoué 2016).

The cytotaxonomy of the representatives of the order Osteoglossiformes is still insufficiently known with most of the available data predating the development of modern molecular cytogenetic approaches (reviewed in Ráb et al. 2016, Canitz et al. 2017). These traditional data are restricted to the determination of diploid chromosome numbers ($2n$) and the basic karyotype descriptions of several representatives of all main lineages of Osteoglossiformes. Despite their intrinsic limitation, such data have already demonstrated significant karyotype diversity among lineages, with an absence of heteromorphic sex chromosomes in most species (reviewed in Ráb et al. 2016). To date six notopterid species were studied using only conventional cytogenetic analyzes (**Table 1**).

Until recently, genome divergence among organisms was addressed with few molecular markers, but high-throughput sequencing (NGS) technologies represent powerful approaches that provide unprecedented access to a large part of the genome. DArTseq™ represents one of the genotyping by sequencing technologies that is gaining broad adoption in ecology and evolutionary biology (Grewe et al. 2015). The DArTseq technology evolved from DArT methodology using initially microarray platform to provide a whole genome profiling capability for uncharacterized genomes (Jaccoud et al. 2001). Both DArT and DArTseq are based on genome complexity reduction step through the digestion of the genomic DNA with a combination of restriction enzymes followed by amplification of a fraction of restriction fragments. The number of fragments selected for analysis is determined primarily by the intended application of the technology and the level of sequence diversity in the organism (Kilian et al. 2012). While DArT arrays were restricted to tens of thousands of fragments the DArTseq methodology, which adopted the NGS for the ‘read out’ allows scanning for variation in DNA sequence in hundreds of thousands of samples enabling even higher level of resolution in genomic analyses. DArTseq offers comprehensive genome profiling to analyse intra- and

inter-specific variability and relationships without any prior sequence information, with efficiency demonstrated for a variety of species (<http://www.diversityarrays.com/dart-resources-papers>).

Here, we first performed a detailed chromosomal analysis of seven Notopteridae species, including the Indian *Chitala chitala*, not examined in previous studies, using conventional and advanced molecular cytogenetic methods. Then, we compared our cytogenetic results in using a powerful genotyping by high-throughput sequencing technology. All these data, along with previous genetic results based on few molecular markers, highlight many aspects of the evolution of the Old-World knife-fishes. In particular, they help to characterize the genetic diversification between the African and Asian Notopteridae species and the consequence of their geographic distribution.

Methods

Animals, chromosome preparations and bandings

Representatives of seven species of Notopteridae were collected in various African and Southeastern Asian river basins (**Figure 1; Table 2**) and the individuals were deposited in the fish collection of the Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo (MZUSP, vouchers 20557, 20557 and 119845). The experiments followed ethical and anesthesia conducts, in accordance with the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Federal de São Carlos (Process number CEUA 1926260315).

Mitotic chromosomes were prepared directly from anterior kidney cells after *in vivo* colchicine treatment of the specimens, according to Bertollo et al. (2015). Constitutive heterochromatin (C-banding), Ag-NORs (NORs stained by silver nitrate) and counterstain enhanced fluorescence (Chromomycin A3 - CMA₃) were performed following protocols described in Sumner (1972), Howell and Black (1980) and Schmid 1980, respectively.

Probes and fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Two tandem-arrayed DNA sequences isolated from the genome of the species, *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae), were used as probes. The first probe contained a 5S rDNA repeat copy and included 120 base pairs (bp) of the

5S rRNA transcribed gene and 200 bp of the non-transcribed spacer (NTS) sequence [Martins et al. 2006]. The second probe corresponded to a 1,400 bp segment of the 18S rRNA gene obtained from nuclear DNA using PCR [Cioffi et al. 2009]. The 5S and 18S rDNA probes were cloned into plasmid vectors and propagated in DH5 α *Escherichia coli* competent cells (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

The 18S and 5S rDNA probes were labelled with Biotin-16-dUTP and Digoxigenin-11-dUTP, respectively using nick translation according to the manufacturer's recommendations (Roche, Mannheim, Germany). The microsatellite motifs (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAA)₁₀, and (CGG)₁₀, used as probes for analysis of repetitive elements organization, were synthesized as described by Kubát et al. (2008). These sequences were directly labeled with Cy3 at the 5' termini during synthesis by Sigma (St. Louis, MO, USA). The telomeric probe (TTAGGG)_n was generated by PCR (PCR DIG-Probe Synthesis Kit, Roche) in the absence of a template, using (TTAGGG)₅ and (CCCTAA)₅ as primers (Ijdo et al. 1991).

Fluorescence *in situ* hybridization was performed under high stringency conditions, as described in Pinkel et al. (1986). The chromosome slides were incubated with RNase (40 μ g/ml) for 1h at 37°C. After denaturation of chromosomal DNA in 70% formamide/2 \times SSC at 70°C for 3min, the hybridization mixtures containing 50 ng of denatured probe, 10 mg/ml dextran sulfate, 2 \times SSC, and 50% deionized formamide in a final volume of 20 μ l were dropped onto the slides, and hybridization was performed overnight at 37°C in a moist chamber containing dH₂O. The post-hybridization wash was carried out with 2 \times SSC and 1 \times SSC for 5 min in each at 42°C. Signal detection was performed using avidin-FITC for 18S rDNA probe, and anti-Digoxigenin-Rhodamine for 5S rDNA and (TTAGGG)_n probes. A final wash was performed at room temperature in 4 \times SSCT for 5 min. Finally, the chromosomes were counterstained with DAPI (1.2 μ g/ml) and mounted in antifade solution (Vector, Burlingame, Calif., USA).

Image Processing

At least 30 metaphase spreads per individual were analyzed to confirm the 2n, karyotype structure and results of FISH experiments. Images were captured using an Olympus BX50 epifluorescence microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan) with CoolSNAP and processed using Image Pro Plus 4.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, Md., USA). Chromosomes were classified metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st), or acrocentric (a) according to Levan et al. (1964).

DNA extraction and genotyping by sequencing

DNA extraction was performed according to Sambrook et al. (2001). Genotyping by sequencing (DARTseq) was performed at Diversity Arrays Technology Pty Ltd, following the protocols described by Grewe et al. 2015. A combination of PstI and SphI enzymes was used to construct the libraries using methods described by Kilian et al. 2012), QCed and sequenced on the Illumina HiSeq2500 next generation sequencer. Two libraries were constructed for each DNA sample and the whole process of data generation was done in full technical replication (from digestion/ligation step to marker calling). Approximately 2.5 million sequences were used per sample to produce marker data. Markers were extracted using DART PL's proprietary analytical pipeline which, in addition to allele calling and marker data metadata reporting, evaluates consistency of allele calling among the technical replicates.

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and SilicoDARTs markers were extracted from the sequences of genomic representations (libraries). SilicoDARTs, which represent presence/absence of specific restriction fragment in genomic representations were scored as "1" for the "present" allele and "0" for absence of the fragment/sequence. SNPs were scored in "two row" format – each row representing a specific allele at the SNP locus. The absence of the allele was scored '0' and '1' was reported for presence of the allele (Supplementary Table 1) (Lambert et al. 2016).

Analysis of genetic diversity between species

From the filtered SNP DArT-seq data matrix, a pair-wise genetic similarity matrix, based on Dice (1945), was computed and employed for genetic diversity analyses using R packages. Principal component analysis (PCA) was performed with FactorMineR (Le et al. 2008), while hierarchical clustering analysis with p -values (AU, Approximately Unbiased p -value and BP, Bootstrap Probability value) was performed with pvclust (Suzuki et al. 2006) using Euclidean distance.

We then reconstructed the relationships among notopterid species using the DArT-seq data associated with chromosomal characters. The states of DArT-seq characters were coded as zero, when no difference from the comparison data was found and one when SNP's had differences from this dataset. The chromosomal characters and states used in this work were showed in **Supplementary Table 2**. The analyses were performed at MrsBayes v. 3.2 program (Ronquist et al. 2012) using two separated datasets (chromosomal and DArT-seq). We used the standard model, one time we do not have information of the mutation rate from the dataset. The Markov Monte Carlo Chain (mcmc) was set to 2 billion generations with sample frequency of 10.000 and 500.000 burn-in. This analysis was performed two times to reach the standard deviation below 0,05 (0,02 from this work) and posterior probability 1,000810. The cladogram generated was edited in the FigTree v. 1.4.3 program (Rambaut, A. & Drummond, 2010).

Feature annotation of allele sequences

Fasta file containing 1.537 SNP allelic sequences (i.e., reference allele sequences were excluded), all of them presenting 69 nucleotides in length, were used for BLAST (Altschul et al. 1990) searches applying BLAST-NorBLAST-X algorithms implemented into in-house programs written in Visual Basic (Ribeiro et al. 2006). Allele sequences were compared to three collections of Teleostei sequences from RefSeq/NCBI database (O'Leary et al. 2016): Teleostei mRNA (373.153 mRNA sequences from six species), Osteoglossiformes Nucleotide (48.195 genomic/mRNA sequences from 23 species) and Osteoglossiformes Protein (41.731 protein sequences from 239 species). BLAST searches used a cut-off E-value (Expected value) lower than

0.1. Functional classification of allele sequences was manually curated based on description of best matches against the three RefSeq collections above. All BLAST results were plotted in a hyperlinked Excel spreadsheet (Supplemental Table 3, which is best visualized using Windows OS).

Results

Karyotypes and chromosome bandings

The results of cytogenetic investigation of seven notopterids species are summarized in **Table 1**. We did not observe any karyotype differences between male and female in all species. Briefly, five species (*Xenomystus nigri*, *Notopterus notopterus*, *Chitala chitala*, *C. ornata* and *C. blanci*) have $2n=42$ and karyotypes composed of only by acrocentric chromosomes and a NF=42. *C. lopis* has $2n=38$ and a karyotype composed of chromosomes exclusively by acrocentric chromosomes (NF=38) and *Papyrocranus afer* has $2n=50$ and a karyotype composed of $2m+2sm+46a$ chromosomes (NF=54). C-positive heterochromatic bands were observed in the centromeric region of all chromosomes, and terminal bands in the first pair in all *Chitala* species. The karyotypes of *C. blanci* and *C. lopis* possessed interstitial bands on the two largest chromosome pairs, in addition, that of *C. lopis* had interstitial bands on the third pair and telomeric bands on the sixth pair of chromosomes (**Figure 2**). The C-bands pattern in *N. notopterus* are similar to the *Chitala* species. *X. nigri* is the specie with more chromosomes with bands in both terminal regions, while the bands in *P. afer* are localized most in the centromeric regions. None of these species have any interstitial bands (**Figure 3**). A single Ag-NOR site in the pericentromeric region of chromosome pair No.12 was detected in karyotypes of all Asian species (i.e. species of *Chitala* and *Notopterus*) while in the African species, *Xenomystus nigri* and *Papyrocranus afer*, they were located on the *q*- and *p*-arms of chromosomes No. 4 and 2, respectively. Single CMA₃⁺ bands corresponded to the Ag-NOR sites in karyotypes of all species, except *C. ornata* where an additional interstitial band was observed on the first chromosome pair (**Figure 4**).

Telomere (TTAGGG)_n and rDNA (5S and 18S rDNA) sequences mapping

The (TTAGGG)_n repeats showed the expected hybridization signals on telomeres of all species (data not shown). The only exception was the karyotype of *C. lopis* which had interstitial telomeric sites (ITS) in the first and third chromosomal pairs (**Figure 5**).

The 18S rDNA positive signals corresponded to the NOR sites in the genomes of all species. The 5S rDNA sequences were located near the centromeric region in a medium-sized pair in all Asian species, except *Chitala chitala* in which 5S rDNA sites were observed on three different pairs, one co-localized with the 18S rDNA. In *X. nigri* 5S rDNA probes hybridized on two chromosome pairs, near to the centromeric region of a large chromosome and to the telomeric region of a medium-sized chromosome. In the karyotypes of *P. afer* and *C. chitala*, the 5S rDNA probes hybridized on three chromosome pairs, in one of them, the 5S probes were co-localized with the 18S rDNA sequences (**Figures 4 and 6**).

Chromosome mapping of microsatellite motif sequences

The genomes of all species showed the same hybridization pattern of microsatellites motifs: (CA)₁₅ had a dense accumulation on chromosomes, in contrast with (GA)₁₅ and (CAA)₁₀ that had faint hybridization signals, and CGG₁₀ that showed strong hybridization only near the 18S site. In particular, the genome of *C. lopis* showed a high accumulation of the microsatellites (CA)₁₅, (GA)₁₅ and (CAA)₁₀ on the chromosomal region harboring the ITS (**Figures 7 and 8**).

Feature annotation of DArT-seq markers

To extract genomic features from DArT-seq alleles, it was used BLAST searches against three collections of Teleostei sequences from RefSeq/NCBI databases, that is (1) "Osteoglossiformes RefSeq NUC" [which contains 48.195 nucleotide sequences references (41.432 mRNA and 6,763 genomic) from 23 species (41.173 of them belong to *Scleropages formosus*)], (2) "Osteoglossiformes RefSeq PTN" [which contains 41.731 protein sequences references from 239 species (41,445 of sequences belong to *Scleropages*

formosus]) and (3) “Teleostei RefSeq mRNA” (a customized Teleostei collection which contains 373.153 mRNA sequences references from six Teleostei fishes). Due to the large size of full Teleostei nucleotide collection at NCBI (over than 13,7 million sequences) a refined collection for Teleostei was built selecting six representative species from six different orders with the highest number of sequences at RefSeq mRNA NCBI database.

About 40% of the allele sequences presented BLASTn hits against the nucleotide databases (Osteoglossiformes RefSeq NUC and Teleostei RefSeq mRNA), whereas a small portion of them (15.5%) matched against the protein collection (Osteoglossiformes RefSeq PTN) (**Table 4**, calculated from **Supplemental Table 3**), suggesting that the majority of the allele sequences now described are novelties because no matches were found against over 450.000 available sequences. Most of allele sequences matched in at least two RefSeq collections and only 145 (9.4%) out of 1.537 sequences presented BLAST results for the three sequence collections, as showed in the Venn diagram (**Figure 11**). No function could be assigned for approximately 18.1% of the 868 allele sequences without any match, being signal transduction, transporter/storage, proteasome machinery and transcriptional factor the most prevalent functional classes (**Figure 12**).

Comparative analyses using DArT-seq data

The DArT-seq genotyping output (**Supplemental Table 2**) consists of a matrix of “absence/presence of allele” (0/1) for each notopterid species for a given allele ID (rows), in which SNP calling relies on different statistical measures. An overview of the genotyping data showed that from 1,537 SNP alleles found in six Notopteridae fishes, 57% of them showed transition type mutations, 88% presented only one SNP along the sequence and 19% was found in heterozygosity (**Table 3**, calculated from **Supplemental Table 2**).

Overall data quality was high as the consistency of average allele calling was above 99%, a very good result given the complexity of such task in case of such evolutionary distant material. This evolutionary distance resulted also in varying call rates among the samples tested: while the *Chitala lopis*, *C. ornata* and *Notopterus notopterus* were called for around 90% of loci the other species (especially *C. chitala*) were called less efficiently, almost certainly due to the

divergence at the restriction enzyme recognition sequences resulting in elimination of many fragments from genomic representations.

Principal component analyses using only the SNP alleles (**Figure 9**) or whole dataset (3074 alleles, reference and alternative sequences) showed that Notopteridae species clustered according to their geographical distribution. In fact, the same results were observed when the relationships among notopterid species were reconstructed using the DArT-seq data associated with chromosomal characters (**Figure 10**).

Discussion

Chromosomal evolution in Notopteridae

Our results corroborated with the Karyotype descriptions for six of the species under study, except *P. afer*, which had $2n=50$ ($2m+2sm+46a$), and not $2n=34$ ($4sm+30a$) described by Uyeno (1973). Actually, the three *P. afer* individuals examined by Uyeno (1973) were of unknown origin, which hampers conclusions about differences of data. Therefore, we cannot exclude the occurrence of chromosomal variation among *P. afer* populations. In fact, a similar inconsistency was also found for another osteoglossiform species, butterfly fish, *Pantodon buchholzi*, in which $2n = 46$ occurs in individuals from the lower Niger River basin (Ráb et al. 2016), compared to uncertain chromosome numbers ($2n = 46$ or 48) previously reported by Uyeno (1973) for individuals of unknown origin. Interestingly, the karyotype of *P. afer* possess $2n = 50$, i.e. chromosome number hypothesized as basal and/close to $2n$ for teleosts (Ohno and Atkin 1966) and as compared to karyotypes of all other notopterids also contains of bi-armed elements in karyotype. Three likely complementary scenarios might be responsible for such derived karyotype pattern. The recent molecular phylogenetic and paleontological data indicate that clade of African notopterids is more basal to their Asian sister clade (Lavoué 2016) and hence longer evolutionary timespan enabled karyotype differentiation. This however contradicts the karyotype pattern of *X. nigri* which is identical with majority of other species. Another possibility lies in the different trajectory in karyotype differentiation in *Papyrocranus*. While likely common ancestor of notopterids experienced reduction of $2n$ via tandem fusions to $2n =$

42 (and further in *C. lopis* to $2n = 38$), in *Papyrocranus* lineage $2n$ remained unchanged but associated with intrachromosomal rearrangement of two chromosomes pairs resulting in bi-armed elements. Examination of another species *P. congoensis* will thus answer this question, leaving three possibilities where karyotype and $2n$ will be i) the same as in *P. Afer*; ii) correspond to most of other notopterids or iii) *P. congoensis* is different to all the others. Karyotype of *C. lopis* with $2n=38$ represents another exception to uniform $2n=42$ and identical karyotypes within Notopteridae (**Figure 2**). The likely scenario indicates tandem fusions responsible for this reduction of $2n$. Actually, ITS were observed in the first and the third chromosomal pairs in karyotype of *C. lopis* (**Figure 5**), strongly supporting such fusions events explaining $2n=38$ from $2n=42$ found in the other *Chitala* species.

A considerable fraction of the eukaryotic genome consists of repetitive DNA sequences, which include multigene families, satellites, microsatellites, and transposable elements (TEs) (Lopez-Flores & Garrido-Ramos, 2012). Although the rDNA multigene families have been reported in a small number of teleosts, their distribution in only one chromosome pair represents the most frequent condition (Gornung 2013). In Osteoglossiformes, only genomes of *Arapaima gigas*, *P. buchholzi* and some Mormyridae species had these genes already mapped. In all cases, the major 18S rRNA genes were confined to only one chromosome pair, but evidently not homologous among these species (Marques et al. 2006; da Rosa et al. 2009; Ozouf-Costaz et al. 2015, Ráb et al. 2016). Our present data also revealed the same pattern, i.e., 18S rDNA sites located in a single chromosome pair, fully corresponding with Ag-NOR sites as well as with GC-rich heterochromatin. This correspondence between cytogenetically detectable GC-rich DNA and sites of major rDNA sites have been documented in all major clades of actinopterygian fishes (Majtanová et al. 2017, Symonová et al. 2017, Mayr et al. 1985; Amemiya and Gold, 1986; Schmid and Guttenbach, 1988) except Acipenseriformes (Fontana 2016) and this character appears likely evolutionary conserved. Our present results for notopterids confirm this pattern.

In contrast to 18 rDNA sites, the 5S rRNA genes had a more variable distribution pattern, showing differential distributions of number and location

among species, as well as their co-localization with 18S rDNAs in *C. chitala* and *P. afer* (**Figure 4**).

Microsatellites or simple sequence repeats are substantial and hypervariable components of the genome, made up of tandemly short DNA motifs (Kidwell, 2002). Such repeats are usually associated with the heterochromatic regions of fish genomes and particularly accumulated in the sex chromosomes (reviewed in Cioffi & Bertollo 2012). Among Notopteridae, the (CA)₁₅ and (GA)₁₅ dinucleotide sequences accumulated in the subtelomeric regions of all chromosomes, while the other microsatellites showed a dispersed distribution over chromosomes including euchromatic and heterochromatic regions, despite some accumulation of (GAA)₁₀ in the telomeric regions. Contrasting with the present data, only the (GAA)_n microsatellite produced a clear and abundant hybridization pattern in the pericentromeric/telomeric heterochromatin of some Mormyridae species [Ozouf-Costaz et al. 2015].

• Our results pointed an extreme genome organization in the Notopteridae, as about the karyotype structure as the chromosomal markers. Five out of seven examined species possessed the same 2n and karyotype structures, interestingly, both in representatives of African and Asian clades. The age of split of both clades was estimated in broad time span -133 Mya (Inoue et al. 2009) and 90 – 188 Mya (such large interval depends on dating of crown Teleostei) (Lavoué 2016) and geological separation of Africa and Madagascar + India to 135 Mya (Scotese 2014 a, b). In result, African and Asian notopterids are separated each from other around 100 Mya and they still retain the same and/or nearly the same (*C. lopsis*) karyotype pattern among some species, evidently as their common ancestor. Cytotaxonomy of recent notopterids thus provides another strong example of chromosomal stasis among teleostean fishes (e.g. Molina 2007). The evolutionary forces beyond such remarkable stasis in a number of teleostean groups are largely out of present paper.

Genetic variability among notopterids

The development and improvement of large-scale genotyping-by-sequencing techniques allowed high resolution analysis using SNP (Single

Nucleotide Polymorphism) for phylogenetic, genetic diversity and genomic selection in non-model organisms investigations (Steane et al. 2011, Resende et al. 2012, Sánchez-Sevilla et al. 2015, Brandolini et al. 2016). Our results demonstrate that DArT markers were very informative, as they provided high PIC (polymorphic information content) values, call rate and scoring reproducibility. They showed a robust efficiency in the analysis of genetic diversity among all Notopteridae species here analyzed. Results were highly consistent with the chromosomal, geographical and historical data, lighting the evolutionary diversification of Notopteridae. The principal component analysis (PCA) showed a pattern of genetic differentiation among the samples, which allowed their clusterization into two major groups according to their geographical distribution: i) the African species (*X. nigri* and *P. afer*); ii) and the Asian species (*N. notopterus* and all *Chitala* species) (**Figure 9**).

Functional annotation of DArT-seq alleles were categorized after BLAST searches against three collections of Teleostei sequences from RefSeq/NCBI databases, and grouped into 15 broad categories of biological functions (**Figure 12; Table 5**). They were assigned according to the involvement of a gene or a protein in a cellular process or pathway, as opposed to its participation in a specific binding or catalytic functions. Since there is not available sequenced genome for any Notopteridae species, a large proportion of DArT-seq alleles matched to “unknown proteins” or proteins with “unknown function”. The remaining alleles were associated with some broad categories, including signal transduction, transporter/storage, proteasome machinery, transcriptional factor and cellular communication/signal transduction.

Notably, all *Chitala* species presented a relatively higher number of rare alleles per accession as compared to other groups (**Supplementary Table 4**). May be the unique allelic diversity of *Chitala* species is associated with the selection of this species to the South Asian environment after their arrival in the Asian continent at ~55 Mya (Inoue et al. 2009). In this sense, comparative analyzes with the diversity profile of other Osteoglossiformes species inhabiting distinct geographical regions will probably generate useful information regarding the evolutionary history and adaptation of this ancient fish group.

Biogeographical history of Notopteridae in light of our data

Living osteoglossiform fishes are found in tropical freshwaters of South America, Africa, Asia and Australia. Such distribution pattern would be the result of vicariant events after the division of the old Gondwana continent (Darlington, 1957; Kumazawa & Nishida, 2000). Whereas it was assumed that the distribution of the Osteoglossiforms was the results of the fragmentation of Gondwana, the discovery of several extinct species in North America, Europe, Central Asia, China and India since the Eocene along with some recent molecules-based dating inference challenged the vicariant hypothesis (Li & Wilson, 1999, Kumar et al. 2005).

Representatives of the family Notopteridae are distributed in African and Asian continents. Nowadays, the most accepted hypothesis to explain their dispersal to the Asian continent is the "Out-of-India" hypothesis, where lineages would have directly diverged by the impact of the African continent and India subcontinent separation. Such event, dated to approximately 135 Mya (Ali & Aitchison 2008, Scoetese 2014), left the Indian region isolated for approximately 30 Mya, without any connection with other landmasses. However, recent molecular phylogenetic studies do not completely support this hypothesis. Lavoué (2016) using nuclear and mitogenomic markers and calibrating the analyses with fossil records, estimated that the time of divergence between these lineages occurred between a range of 80- 120 Mya. Therefore, a continuity of gene flow probably has occurred even after the split of the western part (Africa) from the eastern part (Madagascar + India) of Gondwana, suggesting that vicariant events did not have a direct impact on the divergence of Notopteridae clades, as previously hypothesized. In fact, Agnarsson and Kuntner (2012) depicted that more than 200 independent biogeographic clades with an African-Asia distribution can be explained by ancestral dispersal followed by diversification, in contrast to only 16 ones that are potentially old enough to be explained by diversification through Gondwanan vicariance. Besides, most of the Indian Ocean island's biota had a much more recent origin than the major tectonic events of the ancient Gondwana, indicating that the origin of these groups has to be explained *via*

Cenozoic dispersal rather than *via* Gondwanan vicariance (Vences et al. 2001; Yoder and Nowak 2006; Kuntner and Agnarsson 2011a-b).

For Notopteridae, the weakness of this hypothesis, i.e. maintenance of gene flow for at least 15 million years after the separation of the continental masses, is that notopterids are primarily freshwater fishes, with absence of marine fossils. With the exception of *N. notopterus* that can occasionally sail in brackish waters none of the other extant notopterids are able to tolerate salt water (Roberts, 1992). Indeed, recent studies pointed out alternatives probably allowing gene flow between populations after their separation from Gondwana, without the need for transmarine migration. Between 118-130 Mya, Madagascar had already reached its current geographic position relative to Africa, but fossil records support the occurrence of connections between India and Madagascar as late as 80 Mya (Yoder and Nowak 2006; Agnarsson and Kuntner, 2012), and the missing link for this scenario could be Seychelles and its particular geological history.

Seychelles is an archipelago formed by small 155 islands located in the Indian Ocean northeast off Madagascar. Despite considered Wallacean islands, they are biologically better characterized as Darwinian ones, as they have been submerged subsequent to their isolation, and thus, most of their current biota must have arrived there via overwater dispersion after the islands emergence (Agnarsson and Kuntner, 2012). Besides, Seychelles also harbors an intense volcanic activity that could have created temporary landmasses bridges allowing interconnections among Africa-Madagascar-India subcontinent until ~80 Mya (Yoder and Nowak, 2006; Ali & Aitchison, 2008). Additionally, several plateaus, banks, and fracture zones may have emerged periodically from the ocean facilitating biotic interchanges between these regions (Masters, de Wit, and Asher 2006). Such land bridges may have served as 'stepping stones' for biota exchanges between India and Madagascar, a hypothesis known as "Lemurian Stepping-stones" (Schatz 1996; Steenis 1962; Rage 2003), thus explaining the distribution of several taxa such as lemuriform primates, snakes, frogs, iguanid lizards, and plant groups (Agnarsson and Kuntner, 2012). Further, the complete separation of India subcontinent and Madagascar occurred around 85–90 Mya (Aitchison et al. 2007).

In fact, East Africa is an important source of Seychelles' colonizers, also for freshwater organisms, such as evidenced for freshwater crabs (Daniels 2011). Therefore, when the Madagascar-Seychelles-India continent rifted from Gondwana, it probably held a diversity of life forms, inclusive several Notopteridae lineages. In addition, during the Mesozoic and Cenozoic, Indian North and East Africa were flooded by shallow seas that suffered several retractions in the Eocene, enabling the migration possibility between these continental masses even after their separation of the Gondwana (Ali & Aitchison, 2008). These would have allowed gene flow until 85-90 Mya, which matches with the proposed divergence time between African and Asian notopterids, that occurred around 80-120 Mya (Lavoué, 2016).

However, the lack of marine fossils does not directly imply the absence of strains with transmarine dispersion capacity. Matschiner et al. (2016) discussed a pattern in the Cichlidae family very similar to that presented for Notopteridae: due to the occurrence of cichlid fishes in continental masses that previously composed the supercontinent Gondwana, their actual geographic distribution is traditionally considered as a product of vicarious events that had split the terrestrial masses in the present continents and islands (Chakrabarty 2004, Sparks and Smith 2005, Smith et al. 2008, Azuma et al. 2008). Thus, cichlids must have diverged prior to the separation of Gondwana, including those belonging to the subfamily Etroplinae (composed of two genera, one present in South India and Sri Lanka and another endemic to Madagascar). However; the fossil record is not compatible with the Gondwana hypothesis, generating doubts on vicarious event vs. transoceanic dispersion. In order to test the hypothesis of transoceanic dispersion, authors used 40 different mitogenomic and nuclear markers using the fossil record for calibration of the molecular clock, which indicated a recent divergence after the Gondwana break-up. There is, therefore, strong evidence to support dispersion events, not only for cichlids but also for other freshwater fish groups.

Our results demonstrate two major notopterid clades based on genomic and chromosomal features: the African and the South Asia species groups, where *C. chitala* presenting intermediate characteristics between them (**Figure 10**). Remarkably, *C. chitala* has the narrowest distribution inside the Asian continent, restricted to India only (Roberts 1992), indicating that India probably

represented the migration route for notopterids to Asia. Indeed, similarly to Notopteridae, several modern land vertebrate lineages may have been originated and then isolated in the drifting Indian subcontinent until they could colonize the other world regions after the India and Eurasia collision (Macey et al. 2000; Cooper et al. 2001; Bossuyt & Milinkovitch, 2001; Yoder and Nowak, 2006). The absence of other Notopteridae species in India is probably a consequence of the great extinction that occurred in its landmass after the collision with the Asian plateau, about ~ 55 Mya. With this event, part of the Indian landmass began to go beneath the Asian one, which promoted the emergence of the Himalaya Mountains, the loss of approximately 1/3 of the India subcontinent area, and the extinction of a significant amount of its biodiversity (Lee and Lawver, 1995; Najman, 2006; Ali and Aitchison, 2008).

As well as Notopteridae, several other primary freshwater fishes show an African-Asian distribution (e.g: Bagridae, Cichlidae, Schilbeidae, Clariidae, Aplocheilidae, Mastacembelidae, Cyprinids, Anabantidae, and Channidae) (Nelson 2016). Remarkably, most of them have conspicuous karyotype diversity, resulting from millions of years of restricted gene flow between African and Asian clades (Arai, 2011). Otherwise, despite the significant genetic diversity and the longtime of divergence, the majority of the notopterids retain the same karyotype features at the macrostructural level. Why the evolutionary relationships of the Notopteridae are so divergent at the chromosomal and genomic levels? What have shaped its particular mode of evolution? Up to now, there aren't convincing answers clarifying such intriguing questions.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Proc. nos 401962/2016-4 and 304992/2015-1) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (Proc. No 2016/22196-2).

Table 1. Review of available data on 2n, karyotypes and Fundamental Number (NF) in the Notopteridae family. (m) metacentric; (sm) submetacentric; (st) subtelocentric and (a) acrocentric chromosomes.

Species	2n	Karyotype	FN	Reference	Locality
<i>Chitala chitala</i>	42	42a	42	Present study	Song Khram basin, Thailand
<i>Chitala chitala</i>	48	12m+36a	60	Nayyar (1965)	India, Delhi, River Jumna
<i>Chitala chitala</i>	42	42a	42	Uyeno (1973)	Not known
<i>Chitala chitala</i>	42	42a	42	Takai and Ojima (1998)	Aquarium trade
<i>Notopterus notopterus</i>	42	42a	42	Present study	Chi and Mekong basins, Thailand
<i>Notopterus notopterus</i>	42	42a	42	Rishi and Singh (1983)	India, Kurukshetra
<i>Notopterus notopterus</i>	42	42a	42	Srivastava (1964)	Thailand
<i>Notopterus notopterus</i>	48	12m+36a	60	Nayyar (1965)	India, Delhi, River Jumna
<i>Notopterus notopterus</i>	42	42a	42	Urishido et al. (1975)	Not known
<i>Notopterus notopterus</i>	42	42a	42	Donsakul and Magtoon (1990)	Thailand
<i>Notopterus notopterus</i>	42	42a	42	Silawong et al. (2012)	Thailand, Chi Basin.
<i>Chitala ornata</i>	42	42a	42	Present Study	Chi and Mekong basins, Thailand
<i>Chitala ornata</i>	42	42a	42	Donsakul and Magtoon (1990)	Thailand, Chi Basin
<i>Chitala ornata</i>	42	42a	42	Supiwong et al. (2012)	Thailand, Chi Basin
<i>Chitala blanci</i>	42	42a	42	Present Study	Song Khram basin, Thailand
<i>Chitala blanci</i>	42	42a	42	Donsakul and Magtoon (1990)	Thailand, Chi Basin
<i>Chitala lopis</i>	38	38a	38	Present study	Song Khram basin, Thailand
<i>Papyrocranus afer</i>	34	4sm+30a	38	Uyeno (1973)	Africa
<i>Papyrocranus afer</i>	50	2m+2sm+36a	54	Present study	Oluwa River, Nigeria
<i>Xenomystus nigri</i>	42	42a	42	Uyeno (1973)	Africa
<i>Xenomystus nigri</i>	42	42a	42	Present Study	Oluwa River, Nigeria

Table 2. Collection sites of the Notopteridae species and number of individuals analyzed in this study

Species	Sampling Site	N
<i>Chitala blanci</i>	Song Khram basin, Thailand	(04 ♀ ; 04 ♂)
<i>Chitala chitala</i>	Ganges river, India	(05 ♀ ; 04 ♂)
<i>Chitala lopis</i>	Song Khram basin, Thailand	(12 ♀ ; 06 ♂)
<i>Chitala ornata</i>	Chi and Mekong basins, Thailand	(09 ♀ ; 07 ♂)
<i>Notopterus notopterus</i>	Chi and Mekong basins, Thailand	(06 ♀ ; 04 ♂)
<i>Papyrocranus afer</i>	Oluwa River, Nigeria	(19 ♀ ; 21 ♂)
<i>Xenomystus nigri</i>	Oluwa River, Nigeria	(13 ♀ ; 24 ♂)

Table 3. General characteristics of SNP data for 1537 alternative alleles found in six Notopteridae species.

Type of mutation	Count	Percentage
Transition	882	57%
Transversion	655	42%
Unique SNP in an allele sequence	1201	88%
Multiple SNP in an allele sequence		
2 SNP	143	10.50%
3 SNP	10	0.70%
4 SNP	1	0.07%
5 SNP	1	0.07%
11 SNP	1	0.07%
Alleles found in Heterozigosity	287	19%

Table 4. BLAST searches of DArT-seq allele sequences against collections of fish sequences from RefSeq/NCBI database.

Sequence collections retrieved from NCBI		Number of representative species	Number of sequences	Number of DArT-seq alleles with BLAST hits ^a
Teleostei	RefSeq mRNA	6 ^b	373,153	619 (40%)
Osteoglossiformes	RefSeq Nucleotide ^c	23 ^d	48,195	625 (41%)
Osteoglossiformes	RefSeq Protein	239 ^e	41,731	238 (16%)

a. Percentage in parenthesis referring to 1537 allele sequences searched against each collection. b. *Salmo salar*, *Sinocyclocheilus rhinoceros*, *Oreochromis niloticus*, *Esox lucius*, *Poecilia formosa* and *Ictalurus punctatus*
c. collection comprised by genomic and mRNA sequences.
d. Most sequences (48,173) from *Scleropages formosus*.
e. Most sequences (41,445) from *Scleropages formosus*.

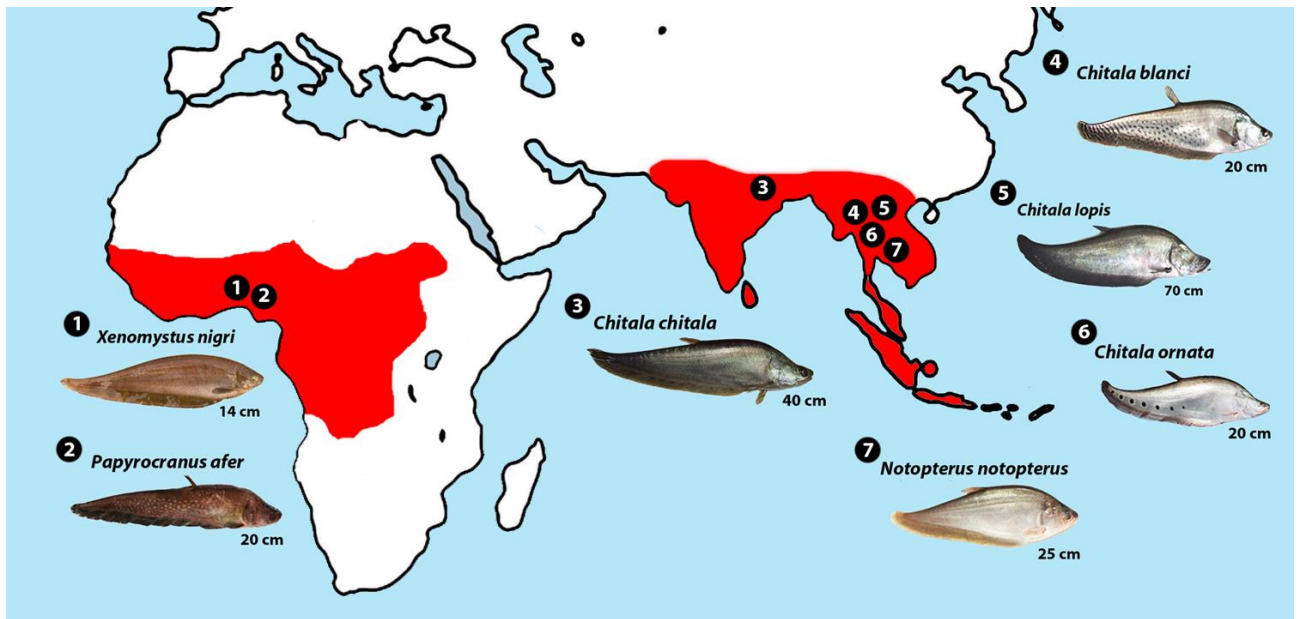


Figure 1. Map showing the origins of the specimens of seven notopterid species examined in this study. Localities 1 and 2 in Nigeria, 3 in India and 4 to 7 in Thailand. The geographic distribution of the living species of Notopteridae is shown in red.

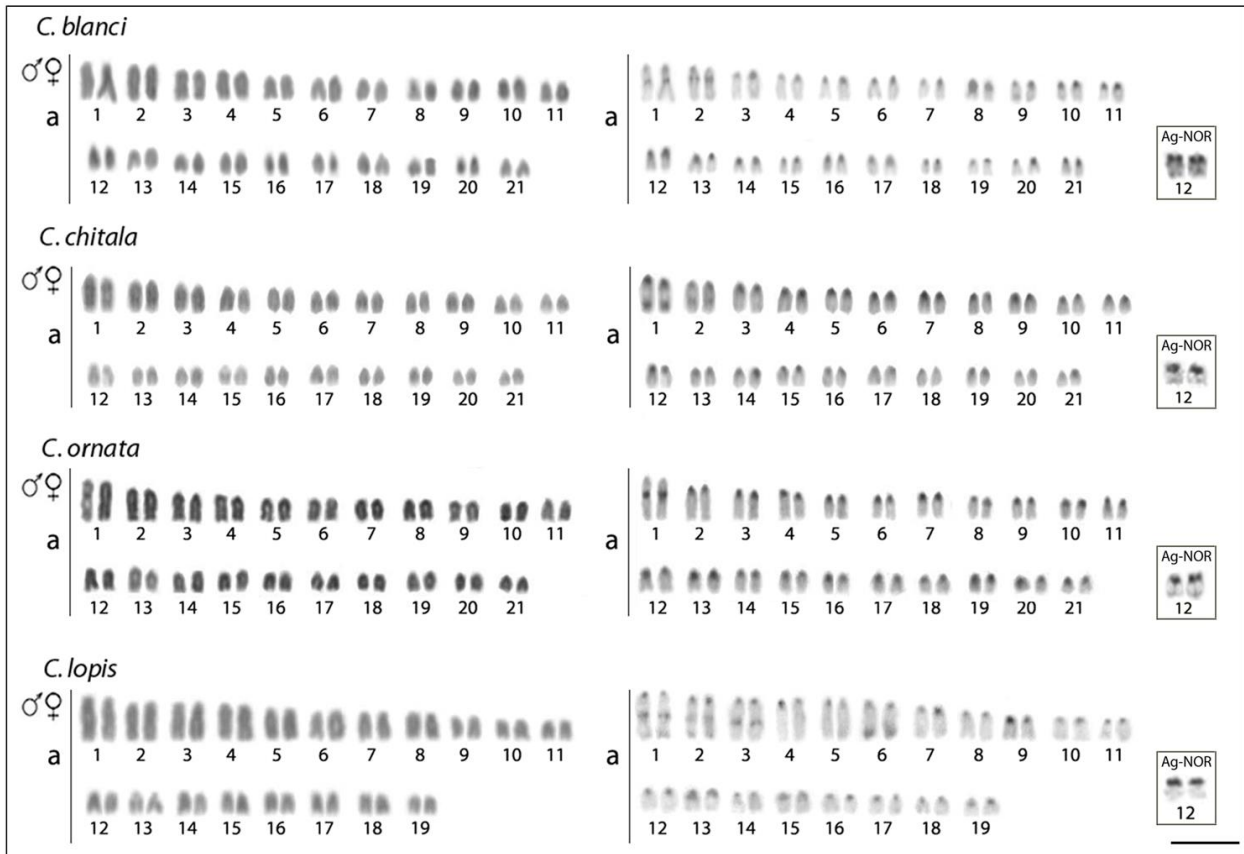


Figure 2. Karyotypes of four *Chitala* species analyzed after conventional Giemsa staining and C-banding procedures. The Ag-NOR pairs are highlighted in boxes. Scale bar = 5 μm.

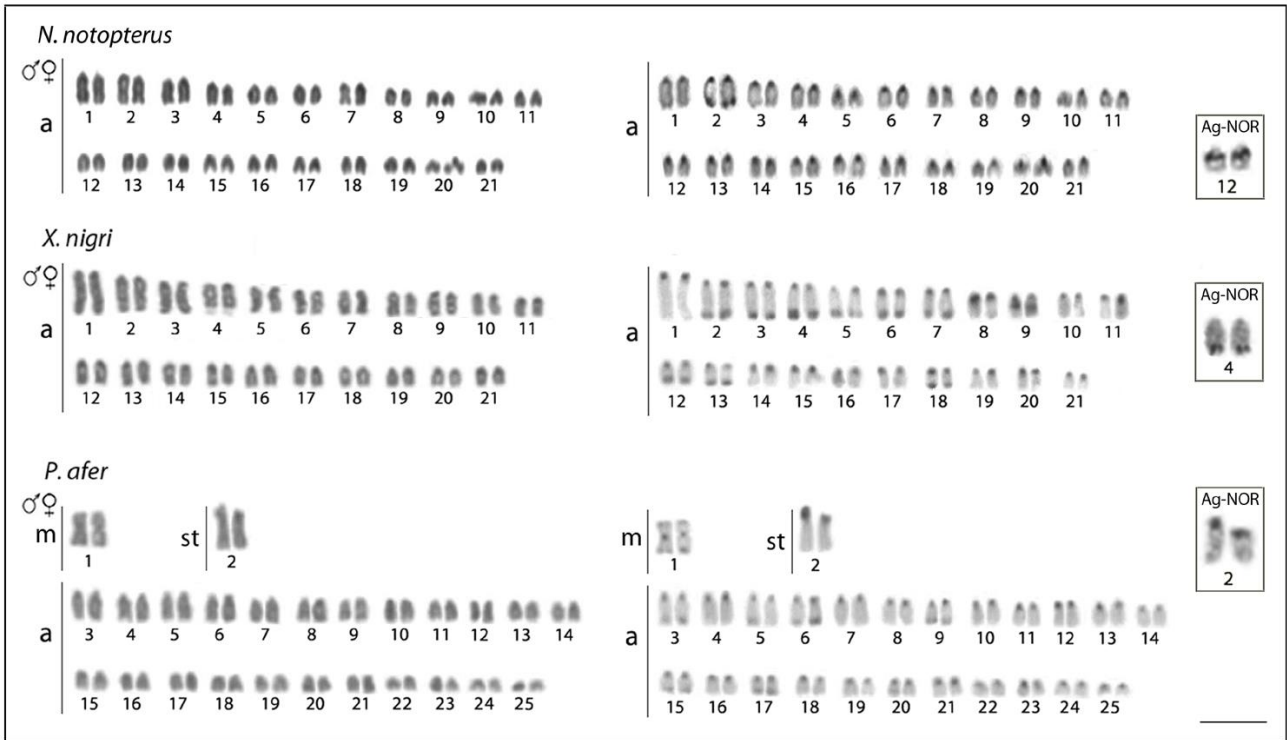


Figure 3. Karyotypes of *Notopterus notopterus*, *Xenomystus nigri* and *Papyrocranus afer* analyzed after conventional Giemsa staining and C-banding procedures. The Ag-NOR pairs are highlighted in the boxes. Scale bar = 5 μ m.

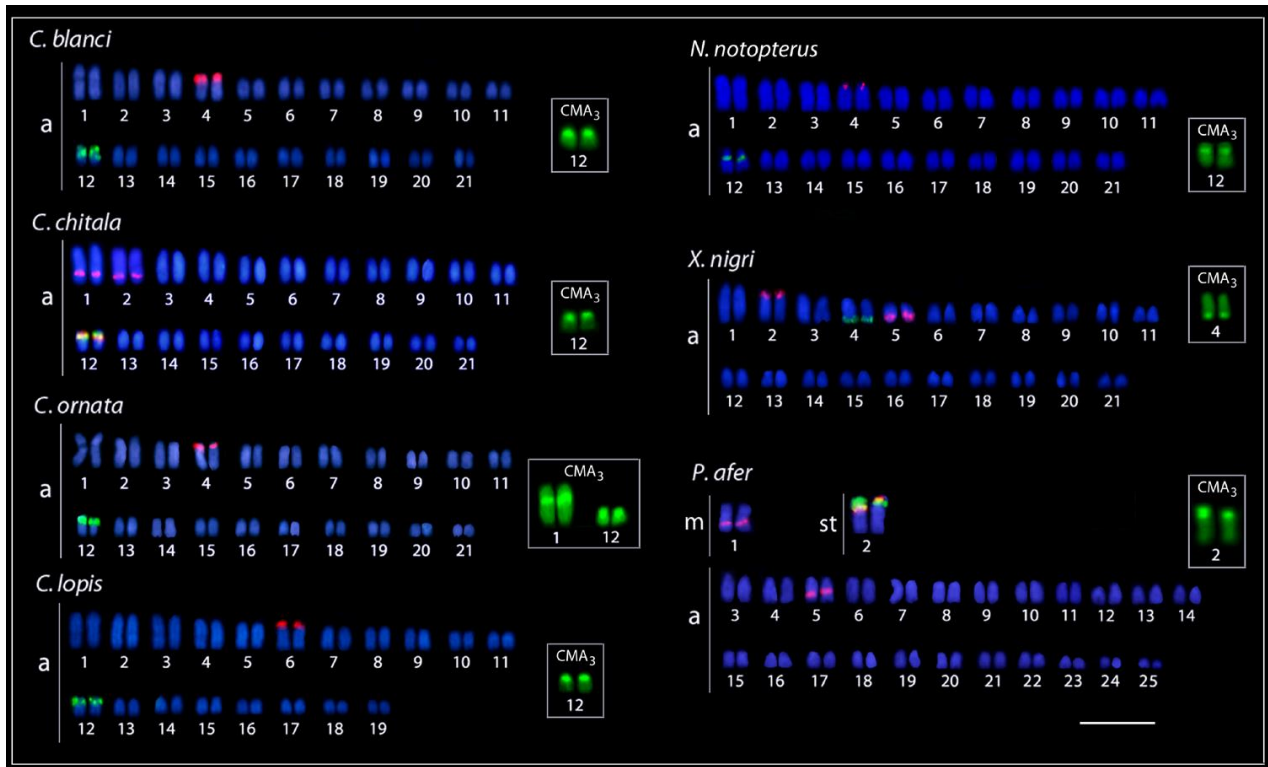


Figure 4. Karyotypes of seven species of Notopteridae analyzed after double FISH experiments with 18S (green) and 5S rDNAs (red) as probes. The chromosomes evidencing GC-rich regions after Cromomycin A₃ staining are highlighted in boxes. Scale bar = 5 μm.

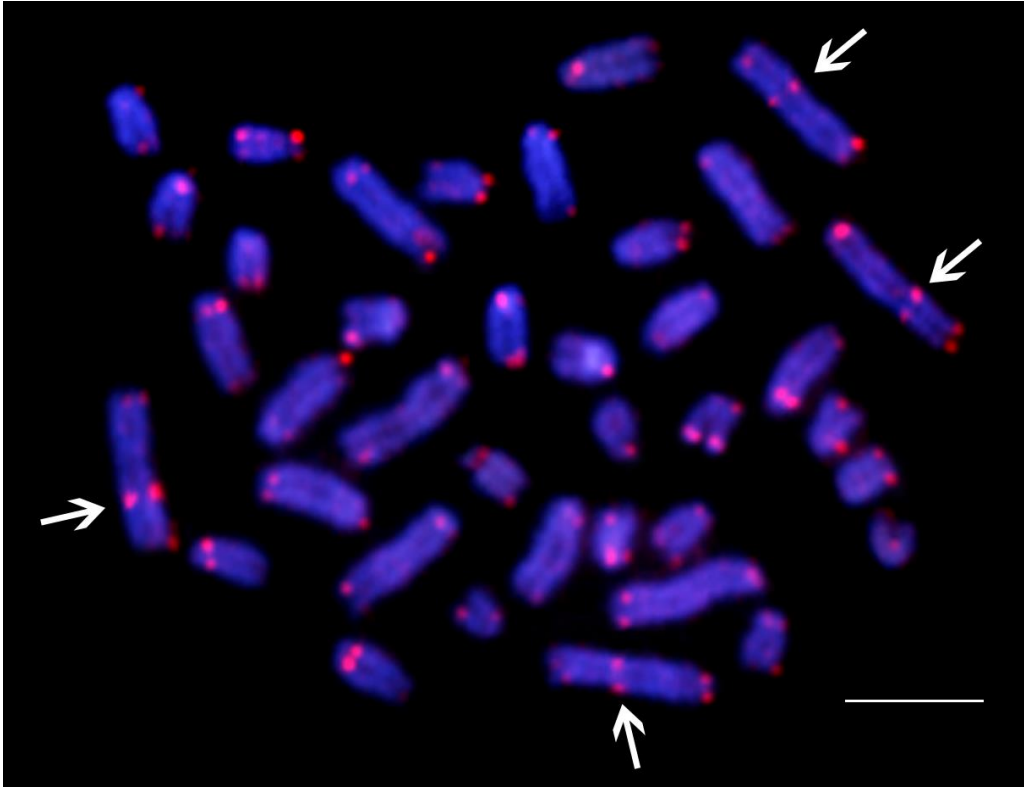


Figure 5. Metaphase plate of *Chitala lopis* hybridized with telomeric (TTAGGG)_n probe. Arrows indicate interstitial telomeric site (ITS) in four chromosomes. Scale bar = 5 μm.

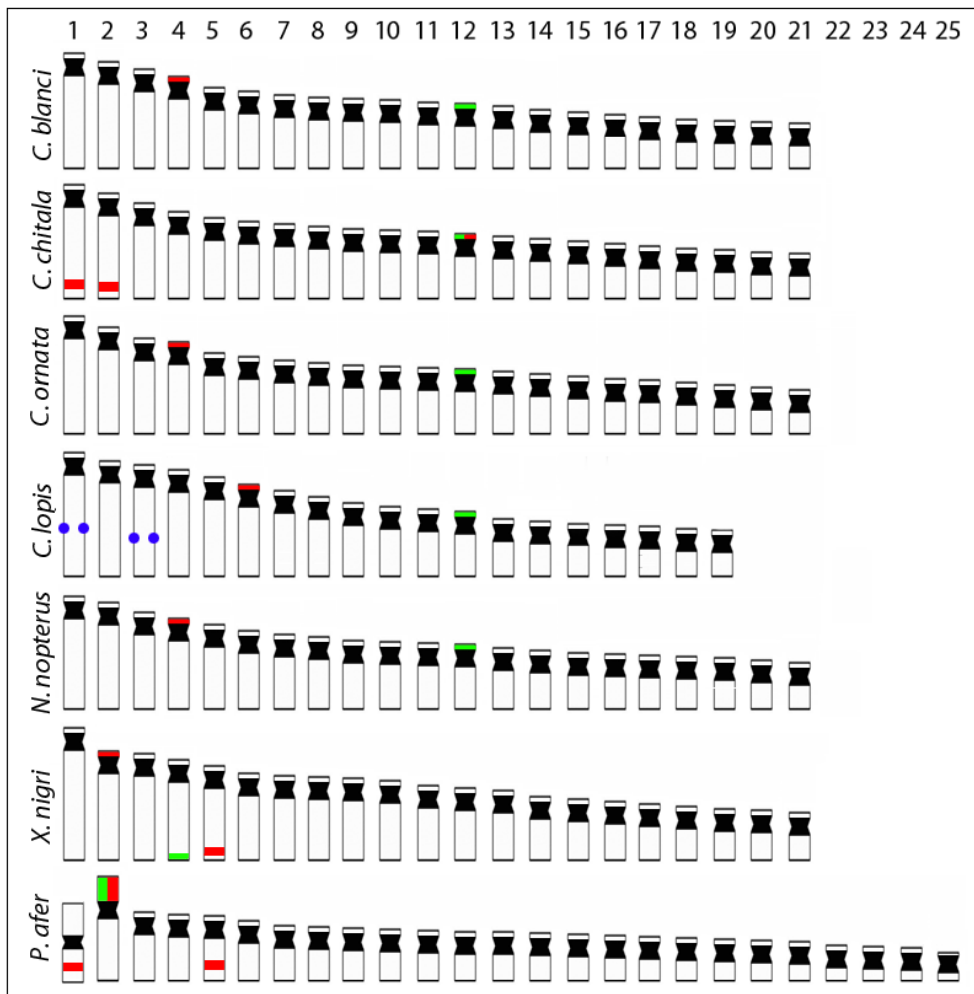


Figure 6. Idiograms representing chromosomes numbers and characteristics for each notopterid species examined in this study. On the chromosomes, the distribution sites of 18S rDNA are highlighted in green, 5S rDNA in red and (TTAGGG)_n in blue.

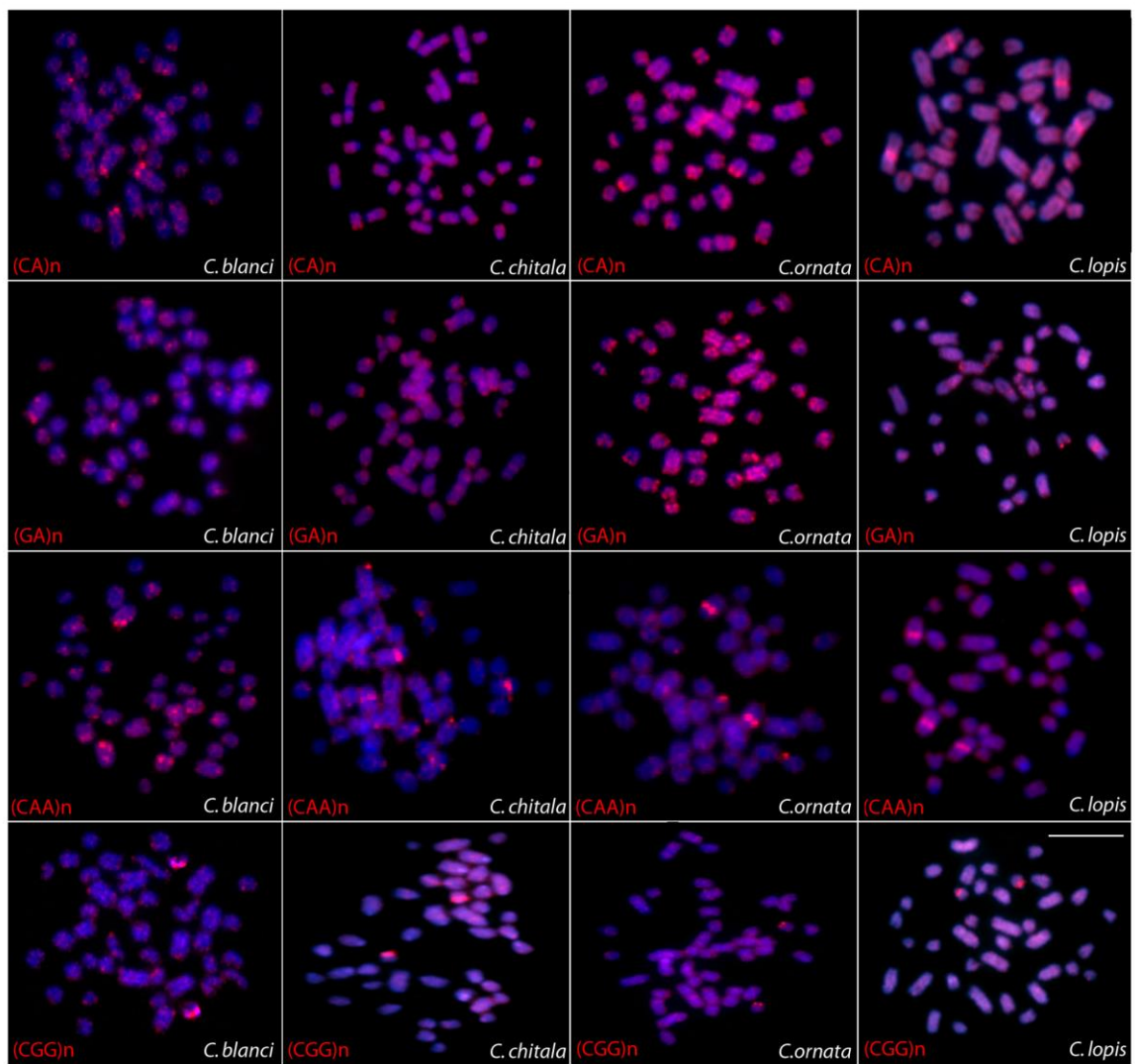


Figure 7. Metaphase chromosomes of four *Chitala* species hybridized with different labeled microsatellite-containing oligonucleotides. Scale bar = 5 μm .

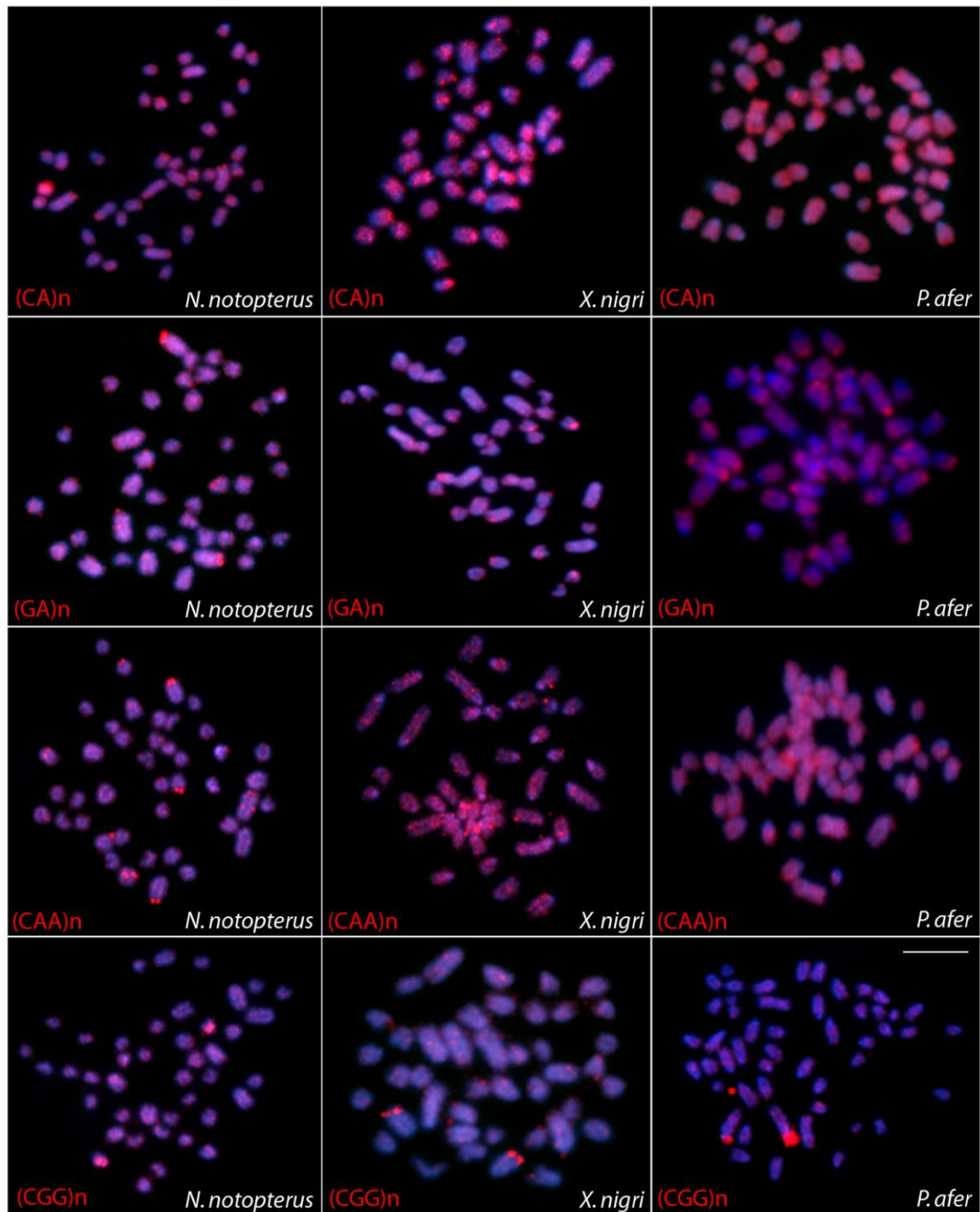


Figure 8. Metaphase chromosomes of *Notopterus notopterus*, *Xenomystus nigri* and *Papyrocranus afer* hybridized with different labeled microsatellite-containing oligonucleotides. Bar = 5 μ m.

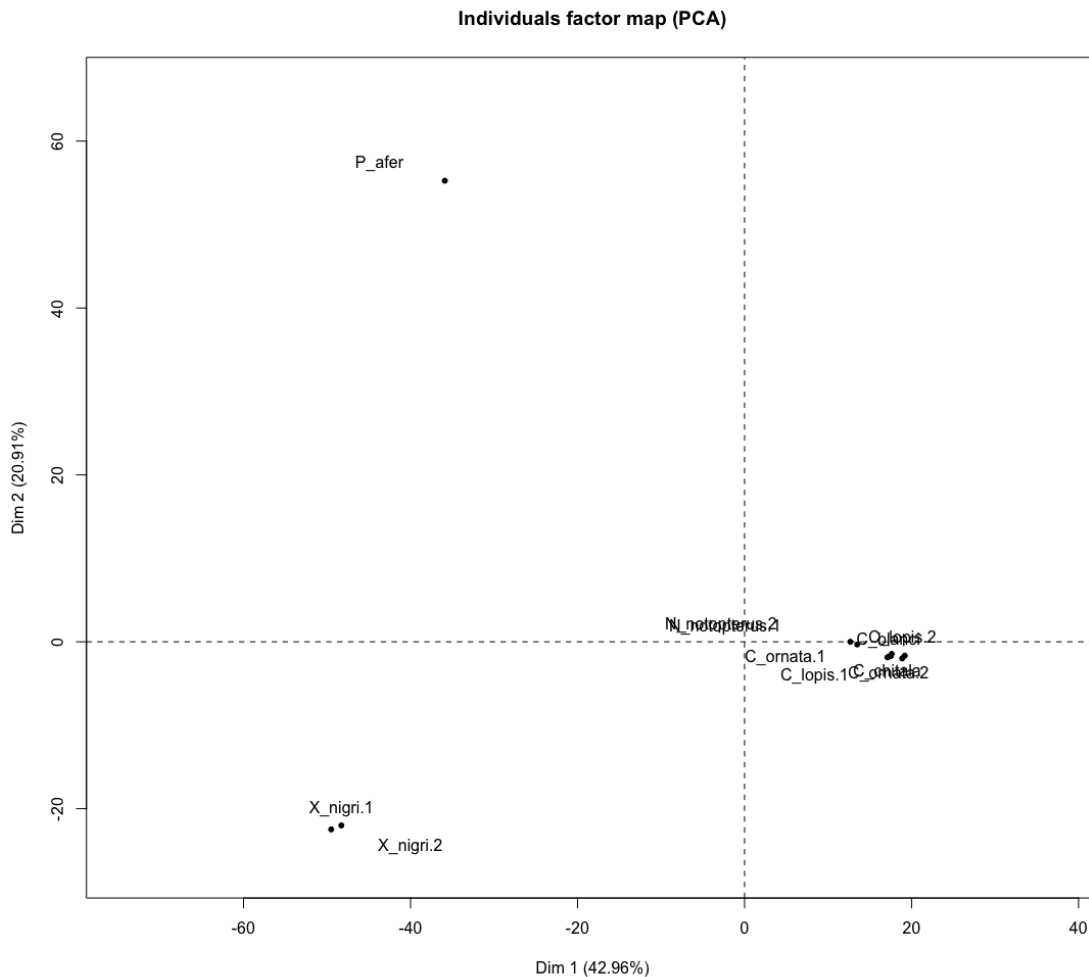


Figure 9. Principal component analyses of SNP data in DArT-seq alleles found in the seven Notopteridae species. A) Individuals factor map using 2,908 alleles (reference and alternative alleles). The notopterid specimens and presence/absence SNP were structured as observations (individual) and variable, respectively, as input matrix data. Note: Briefly, principal component analysis is used to extract the important information from a multivariate data table and to express this information as a set of new variables called principal components. The information in a given data set corresponds to the total variation it contains. The goal of PCA is to identify directions along which the variation in the data is maximal. These directions (called also principal components) can be used to visualize data graphically.

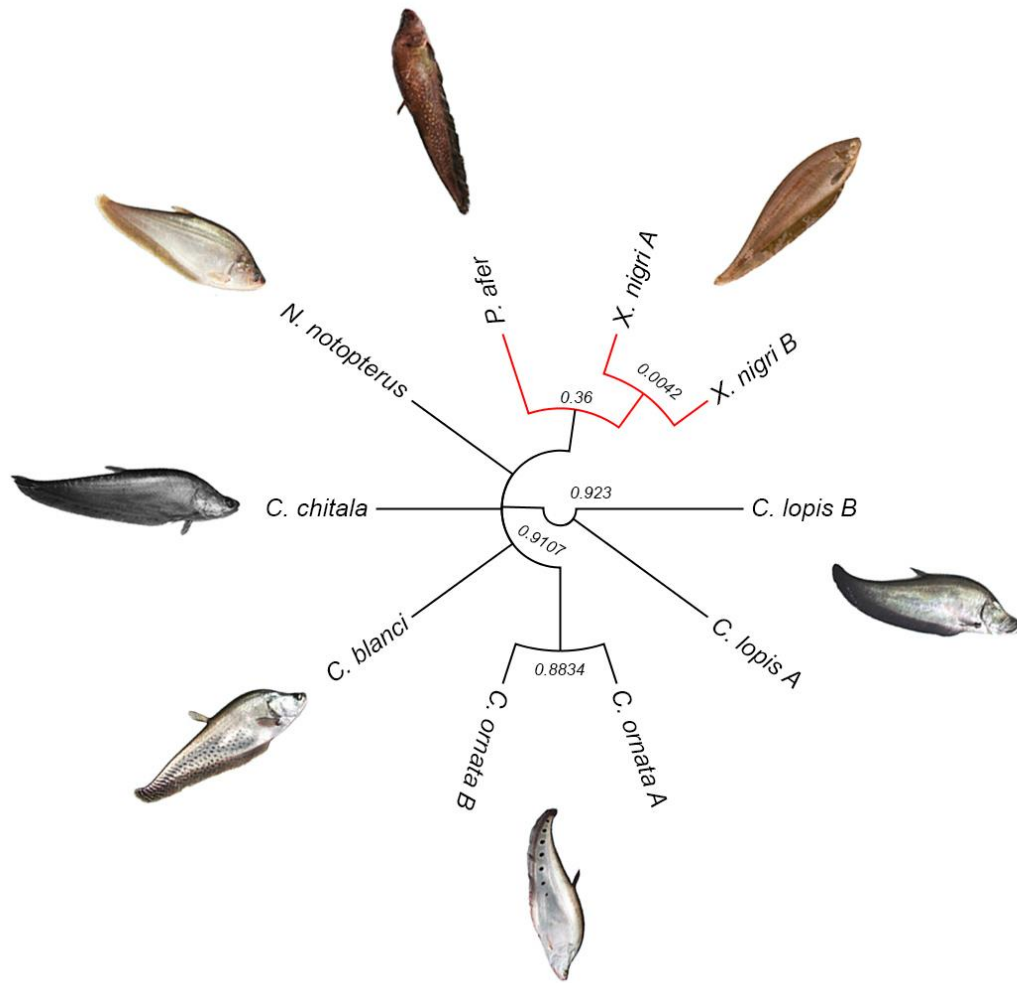


Figure 10. Dendrogram generated by Bayesian combined molecular and chromosomal data from the Notopterid family. Red branches represents species from Africa. Numbers in the nodes represents the Bayesian posterior probabilities.

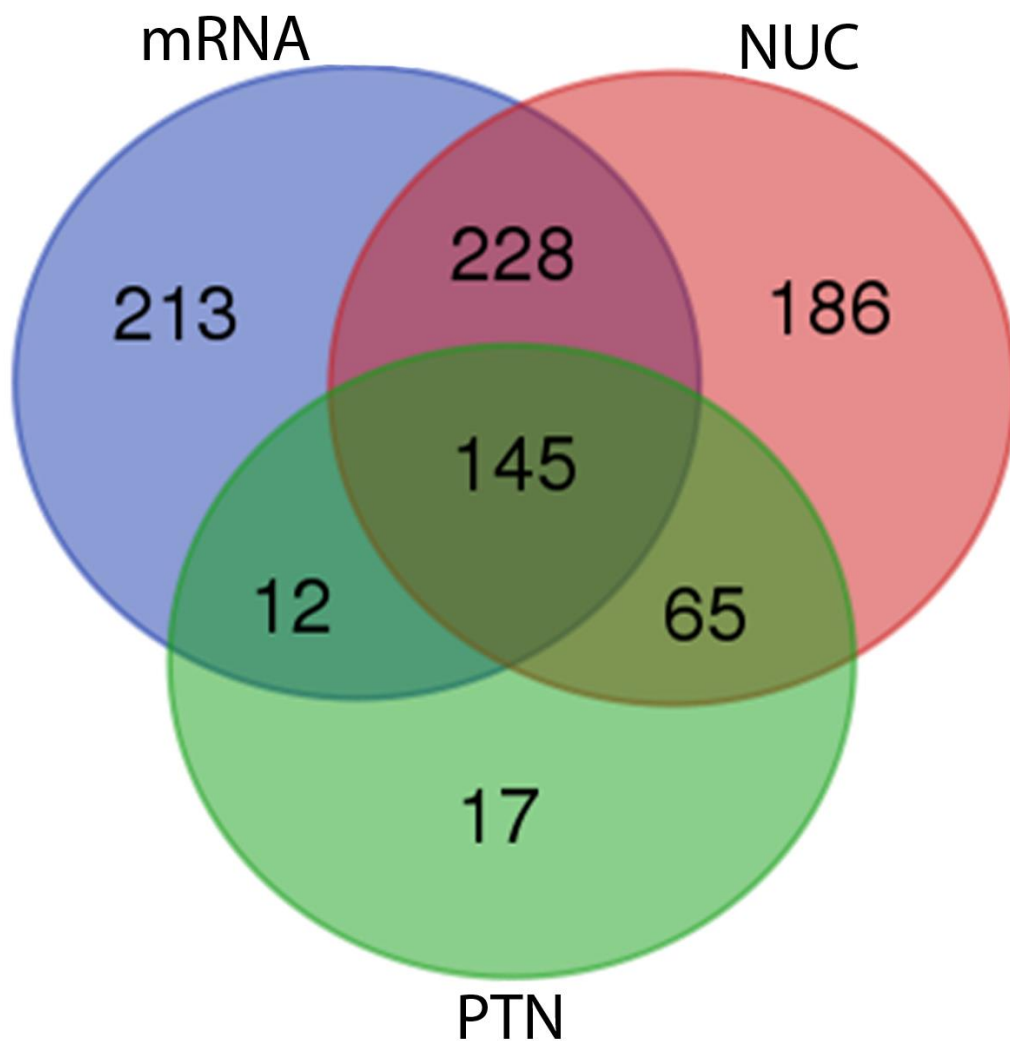


Figure 11. Venn diagram of BLAST hits for 1537 DArT-seq allele sequences against three RefSeq fish collections. Details for sequence collections can be viewed in Table 2. NUC: Osteoglossiformes genomic sequences. PTN: Osteoglossiformes protein sequences. mRNA: Teleostei mRNA sequences.

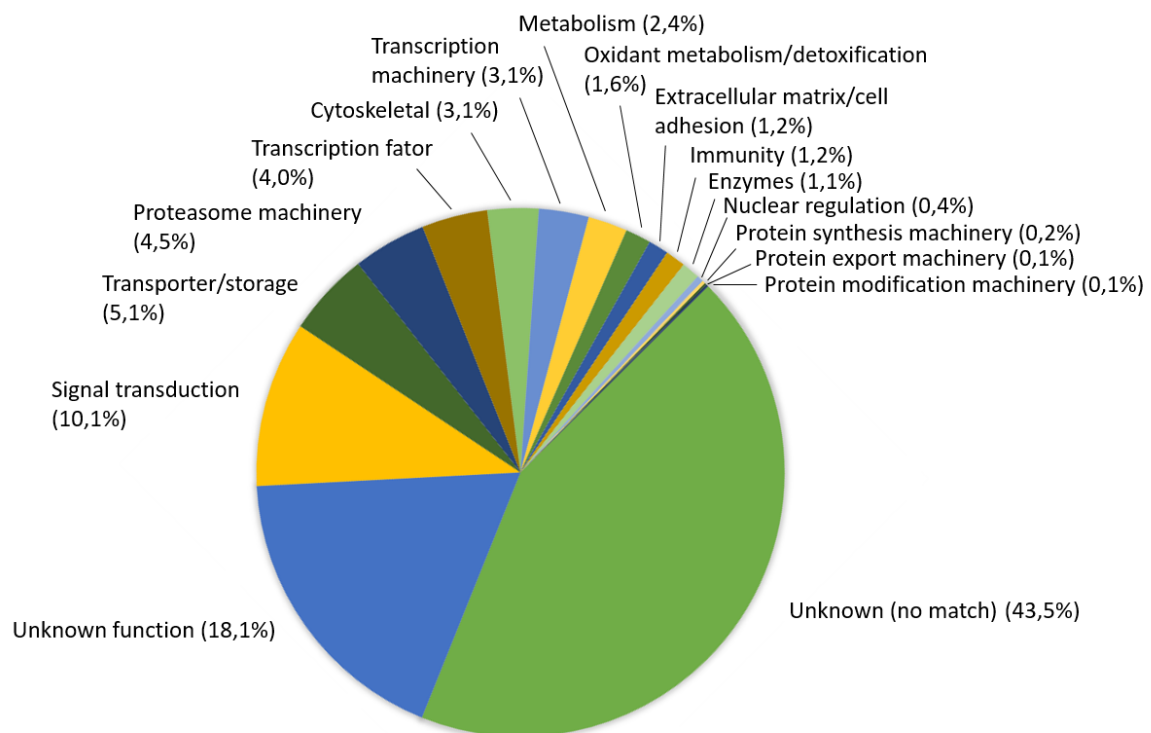


Figure 12. Functional annotation of 868 DArT-Seq allele sequences through BLAST hit description, calculated from Supplemental Table 3. Allele sequences were compared to three collections of Teleostei sequences from RefSeq/NCBI database, Teleostei mRNA (373,153 mRNA sequences from six species), Osteoglossiformes Nucleotide (48,195 genomic/mRNA sequences from 23 species) and Osteoglossiformes Protein (41,731 protein sequences from 239 species). BLAST searches used a cut-off E-value (Expected value) lower than 0.1. Functional classification of allele sequences was manually curated based on description of best matches against the three RefSeq collections above.

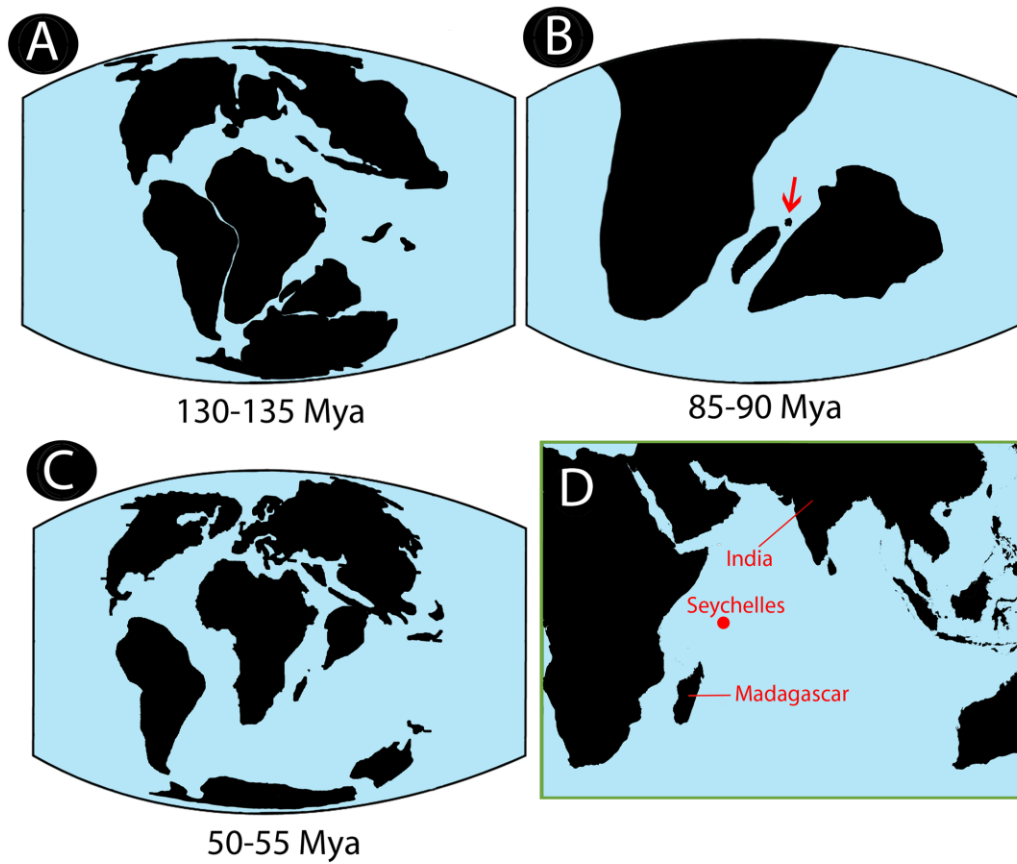


Figure 13. Illustration of key steps for Notopteridae biogeography: A) Split of India from the Gondwana continent; B) Geographic distribution of Seychelles-India - Madagascar- Africa; C) Arrival of India subcontinent to Eastern Asia; D) Actual location of Sechelles, India and Madascar

Capitulo 4.2

Emerging patterns of genome organization in Notopteridae species as revealed by Zoo-FISH and Comparative Genomic Hybridization (CGH)

Felipe Faix Barby¹ (felipe_barby@hotmail.com)

Luiz Antônio Carlos Bertollo¹ (bertollo@ufscar.br)

Ezequiel Aguiar de Oliveira¹ (ezekbio@gmail.com)

Cassia Fernanda Yano¹ (yanocassia@gmail.com)

Terumi Hatanaka¹ (haterumi@hotmail.com)

Petr Ráb² (rab@iapg.cas.cz)

Alexandr Sember² (alexandr.sember@seznam.cz)

Sébastien Lavoué³ (microceb@hotmail.com)

Tariq Ezaz⁴ (Tariq.Ezaz@canberra.edu.au)

Roberto Ferreira Artoni⁵ (rfartoni@gmail.com)

Thomas Liehr⁶ (thomas.liehr@mti.uni-jena.de)

Ahmed B. H. Al-Rikabi⁶ (Ahmed.Al-Rikabi@med.uni-jena.de)

Vladimir Tifonov⁷ (vlad@mcb.nsc.ru)

Edivaldo HC de Oliveira⁸ (ehco@ufpa.br)

Wagner Franco Molina⁹ (molinawf@yahoo.com.br)

Oladele Ilesanmi Jegede¹⁰ (jegedeio@yahoo.co.uk)

Alongklod Tanomtong¹¹ (tanomtong@hotmail.com)

Marcelo de Bello Cioffi^{*1} (mbcioffi@ufscar.br)

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Brazil

²Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, Liběchov 277 21, Czech Republic

³Institute of Oceanography, National Taiwan University, Roosevelt Road, Taipei 10617, Taiwan

⁴Institute for Applied Ecology, University of Canberra, Australia

⁵Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil.

⁶Institute of Human Genetics, University Hospital Jena, Jena, Germany

⁷Molecular and Cellular Biology, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch

⁸Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Brazil.

⁹ Department of Cellular Biology and Genetics, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

¹⁰Department of Fisheries and Aquaculture, Adamawa State University, Mubi. Adamawa State, Nigeria

¹¹Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, KhonKaen University, Muang, KhonKaen 40002, Thailand.

^{*1}Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz Km. 235, C.P. 676, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

e-mail: mbcioffi@ufscar.br

Abstract

Notopteridae (Teleostei, Osteoglossiformes) represent an old fish lineage with ten currently living species distributed in African and Southeastern Asian rivers. The conservative chromosome formula and diploid numbers among Notopteridae are maintained even in large periods of time, since African and Asian Notopteridae lineages diverged during the Cretaceous period ~120 Mya. However, a significant genetic diversity was already identified for these species after SNP analysis. Thus, why the evolutionary relationships within Notopteridae are so diverse at the genomic level but more conserved in terms of their karyotypes? Which evolutionary forces have shaped its particular mode of evolution? In an attempt to develop a more comprehensive picture of the karyotype and genome evolution in Notopteridae, we performed CGH and Zoo-FISH experiments to explore intergenomic divergence among distinct Notopteridae species. CGH experiments demonstrated an advanced stage of sequence divergence among the species, except for the bright signals corresponding to the NOR sites. Zoo-FISH experiments using the first chromosomal pair of *X. nigri* (XNI-1) showed diffuse and limited homology in inter-genera cross-hybridization, showing a temporal reduction of syntenic sequences. However, the presence of linkage groups opens perspectives that several other homologous syntenic regions have remained conserved among the genome differentiation of the species despite long temporal isolation. In summary, Notopteridae is an interesting model for tracking the chromosome evolution in fishes and singularly illustrates new aspects of karyotype stasis in this important vertebrate group.

Introduction

The monophyletic fish order Osteoglossiformes represents an ancient teleost group with a geographic distribution area restricted to the freshwater river basins (Bănărescu, 1990; Greenwood and Wilson, 1998; Hilton, 2003). This ancestral teleost lineage retained primitive anatomical features (e.g., the toothed tongue bones) (Sallan, 2014) and, more remarkably, considering their very ancient origin (~ 227 Mya), the current osteoglossiform distribution pattern could reflect the vicarious events occurring after the Gondwana's break-up (Darlington, 1957, Kumazawa & Nishida, 2000). While some osteoglossiform families (Gymnarchidae, Mormyridae, and Pantodontidae) are restricted to Africa, other ones (Osteoglossidae, Notopteridae, and Arapaimidae) exhibit a patchy distribution, with species endemic to different continents (Nelson et al. 2016).

Besides their importance in the ornamental fish trade, their wide geographical distributions, together with their basal position in the fish phylogeny, qualifies this group as an excellent object for systematic, genomic, cytogenetic, and evolutionary studies. However, only few cytogenetic and genomic studies of osteoglossiforms have been undertaken/accomplished so far, covering a limited number of species (Ozouf-Costaz et al. 2015b; Austin, et al. 2015, Bian et al. 2016, Ráb et al. 2016, Canitz et al. 2017, Oliveira et al. in press, Barby et al. in press). This paucity of data mirrors the world-wide distribution of this group, coupled with endemism of some species to particular continents, thus hindering integrative studies that allow a globalized view of its evolutionary process.

Currently, the Notopteridae family covers four genera (*Chitala*, *Notopterus*, *Xenomystus*, and *Papyrocranus*) with ten extant species (Eschmeyer and Fong, 2017). While *Chitala* and *Notopterus* are endemic to Southeastern Asia, *Papyrocranus* and *Xenomystus* exhibit wide distribution throughout the African rivers (Roberts, 1992). Representatives of this family are known as "knife fishes" (Vidthayanon 2005) and are restricted to freshwaters, except for a single species - *N. notopterus*, which can be occasionally found in brackish waters (Roberts, 1992). *Chitala* is the most speciose genus encompassing six recognized species, with several of them being commercially

important for both aquaculture and the aquarium trade. While *X. nigri* and *N. notopterus* are monotypic, the remaining notopterid genus *Papyrocranus* holds two species (*P. afer* and *P. congoensis*) (Roberts 1992). Phylogenetic studies support the monophyletic status of Notopteridae, placing them within the suborder Notopteroidei, together with Gymnarchidae and Mormyridae, whose representatives are found exclusively in African rivers (Axelrod et al. 1996; Nelson, 2006; Inoue et al. 2009).

The integrative study of Barby et al. (in press) combining molecular-cytogenetic data with DART-Seq (Diversity Array Technology Sequencing) markers was recently performed in seven notopterid species. In brief, that study showed that, from the cytogenetic standpoint, five species displayed karyotypes composed of $2n=42$ chromosomes, with all of them being exclusively acrocentric, while *Papyrocranus afer* and *Chitala lopis* showed $2n=50$ and $2n=38$, respectively. For the latter, interstitial telomeric sites (ITSs) were observed in the first and third chromosomal pairs, thereby providing strong evidence for the involvement of fusion events as the mechanism behind the reduction of $2n$ in this species. Nonetheless, SNP analyses demonstrated a great molecular differentiation between congeneric species. Furthermore, the results distinguished two major Notopteridae groups based on the genomic and chromosomal features – i.e. the African and the South Asian species groups, with *C. chitala* showing intermediate characteristics, placing evolutionarily this species somewhat between these two groups, hence strengthening the hypothesis that India probably represented the migratory route for these fishes, allowing them to reach Asia. The major finding of the above-mentioned study is thus the contrasting scenario showing, on the one hand, a significant genetic diversity observed among these species while, on the other hand, the trend for the conservative karyotype macrostructure is clearly apparent. The question then arises: why the evolutionary relationships within Notopteridae are so diverse at the genomic level but more conserved in terms of their karyotypes? Which evolutionary forces have shaped its particular mode of evolution?

In recent years, an increasing drive towards application of advanced molecular cytogenetic tools in studies conducted in fishes is apparent. Namely, comparative genomic hybridization (CGH) and chromosome painting techniques have gained a prominence in solving various issues in the field of

comparative cytogenetics in fishes, allowing gaining more fine-scale insights into a number of karyo-evolutionary issues. As a hybridization probe for WCP is constructed from a specific and well-recognizable chromosome, application of whole or partial chromosome painting probes (PCPs or WCPs) can be derived from microdissection or flow sorting and allow more thorough investigation of structural chromosomal rearrangements between closely or possibly also distantly-related species (especially in a cross-species painting experiments, referred to as Zoo-FISH). CGH requires two probes derived from the total genomic DNA of two given individuals/species, allowing the intergenomic comparisons both at intra- or interspecific level. To put it succinctly, especially over the last decade, both technologies have been used in fishes for investigation of 1) genome divergence between closely related species (Ráb et al. 2008, Nagamachi et al. 2010, 2013, Symonová et al. 2013, Yano et al. 2017, Moraes et al. 2017, Oliveira and Sember et al. 2017), 2) evolution of sex chromosomes intraspecifically (i.e. unmasking molecular differentiation of homomorphic or heteromorphic sex chromosomes; (Traut and Winking 2001, Cocca et al. 2015, Yano et al. 2017, Freitas et al. 2017, Oliveira and Sember et al. 2017) or interspecifically (i.e. deciphering the homologies between sex chromosomes among related species; Phillips et al. 2001, Henning et al. 2008, 2011, Machado et al. 2011, Terencio et al. 2012, Parise-Maltempi et al. 2013, Pazian et al. 2013, Cioffi et al. 2013, Blanco et al. 2014, Pansonato-Alves et al. 2014, Scacchetti et al. 2015, Oliveira and Sember 2017, Yano et al. 2017); and 3) the origin of B chromosomes (Fantinati et al. 2011, Vicari et al. 2011, Sampaio et al. 2015, Scudeler et al. 2015, Silva et al. 2016, Utsunomia et al. 2016). Besides that, CGH (or analogous/similar method genomic *in situ* hybridization, GISH) was successfully employed also in studies aiming in parental genome identification among asexual polyploid or homoploid fish hybrids (Rampin et al. 2012, Knytl et al. 2013, Pereira et al. 2013, 2014, Symonová et al. 2013, Majtánová et al. 2016) or in studies focused on the uniparental chromosome elimination (Fujiwara et al. 1997, Sakai et al. 2007).

In an attempt to develop a more comprehensive picture of the karyotype and genome evolution in Notopteridae, we aimed to perform CGH and Zoo-FISH experiments to explore intergenomic divergence among distinct Notopteridae species. Indeed, our recent results provided new insights into the

karyoevolution of this fish group, with both methodologies proving to be efficient for gaining a better understanding of genomic and chromosomal differentiation, highlighting relationships and uncovering chromosome differences among these species.

Material and Methods

Mitotic chromosome preparations

Seven Notopteridae species were collected in different African and Southeast Asian River basins, as indicated in **Figure 1 and Table 1**. The animals were captured with cast-nets, placed in sealed plastic bags containing oxygen and clean water, and transported to the laboratory. The specimens were deposited in the fish collection of the Museu de Zoologia da USP, Brazil (MZUSP, vouchers 20557, 20557 and 119845). The experiments followed ethical and anesthesia conducts, in accordance with the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Federal de São Carlos (Process number CEUA 1926260315). Mitotic metaphases were prepared directly from the anterior portion of the kidney after *in vivo* colchicine treatment of the specimens following the protocol described in Bertollo et al. (2015).

Chromosome microdissection, probe preparation and fluorescence in situ hybridization (FISH) used for WCP

For cross-species painting, we selected the first chromosome pair from the *X. nigri* complement, as it is unambiguously the largest element in the karyotype (Barby et al. in press), allowing us to identify precisely both homologues ones after Giemsa staining. Twenty copies of this chromosome were isolated by glass-needle based microdissection, and amplified using the procedure described in Yang et al. (2009). The whole chromosome-derived probe (hereafter designated as XNI-1) was labelled with Spectrum-Orange-dUTP (Vysis, Downers Grove, IL, USA) through 30 cycles of secondary DOP PCR, using 1 µl of the primary amplification product (Yang et al. 2009). The final probe cocktail was composed/consisted of 100ng/µg of the XNI-1 probe and 60 µg of Cot-1 DNA isolated from the *X. nigri* male total genomic DNA (for details,

see Zwick et al. 1997), in order to outcompete the hybridization of highly-repeated DNA sequences.

Hybridization procedure followed the protocol described in Yano et al. (2017) and was performed for 6 days (144h) at 37 °C in a moist chamber. Finally, after washing procedures acc. to Yano et al. (2017) the chromosomes were counterstained with DAPI (1.2 µg/ml) and mounted in antifade solution (Vector).

Preparation of probes for CGH

The total genomic DNAs (gDNAs) from male and female specimens of all species listed in Table 1 were extracted from liver tissues by the standard phenol-chloroform method (Sambrook et al. 2001). Three different experimental designs were used for this study, as outlined in **Figure 2**. In the first set of experiments, the gDNA of *X. nigri* and *P. afer* were compared with the gDNA of *N. notopterus* against metaphase chromosomes of the *N. notopterus*. In the second set of experiments, the gDNA of *X. nigri* was compared with the gDNA of *P. afer* against metaphase chromosomes of the *X. nigri*. And in the third set of experiments, the gDNA of all species were compared with the gDNA of *C. lopis*, in separated CGH experiments, against metaphase chromosomes of the *C. lopis*. For these purposes, gDNAs of all species were labelled either with digoxigenin-11-dUTP using DIG-nick-translation Mix (Roche, Mannheim, Germany) or biotin-16-dUTP using BIO-nick-translation Mix (Roche). For blocking the repetitive sequences in all experiments, we used C_{ot}-1 DNA (i.e. fraction of genomic DNA enriched for highly and moderately repetitive sequences) prepared according to Zwick et al. (1997). Hence, the final probe cocktail for each slide was composed by 500ng of gDNA of one species + 500ng of gDNA corresponding to one of the comparative species + 15µg of derived C_{ot}-1 DNA of each species. The probe were ethanol-precipitated and the dry pellets were suspended in hybridization buffer containing 50% formamide, 2xSSC, 10% SDS, 10% dextran sulfate and Denhardt's buffer, pH 7.0.

FISH used for CGH

For the CGH experiments, we used the methodology described in Symonová et al. (2015), with several modifications. Briefly, a thermal aging of slides was performed prior to hybridization, at 37°C for 2 h. Next, a treatment with RNase A (100 µg/ml, 90 min, 37°C) took place, followed by the pepsin digestion (50 µg/ml in 10 mM HCl, 3 min, 37°C). Denaturation of chromosomes was done in 75% formamide/2×SSC at 74°C for 3 min, and slides were then immediately dehydrated in 70% (cold), 85%, and 100% (RT) ethanol. The probe cocktail was denatured at 86°C for 6 min, chilled on ice for 10 min and then applied to each slide. The hybridization was performed at 37°C for 3 days in a dark humid chamber. Subsequently, non-specific hybridization was removed by stringent washing: once or twice in 50% formamide/2×SSC (44°C, 10 min each) and three times in 1×SSC (44°C, 7 min each). To block non-specific binding sites for antibodies, slides were incubated with 3% non-fat dried milk (NFDM) at 37°C and subsequently hybridization signals were detected using Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Roche) and Avidin-FITC (Sigma). Finally, the preparations were mounted in antifade containing 1.5 µg/ml DAPI (Vector).

Microscopic analysis and image processing

At least 30 metaphase spreads per individual were analyzed to confirm the 2n, karyotype structure and FISH results. Images were captured using an Olympus BX50 microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan) with CoolSNAP and the images processed using Image Pro Plus 4.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Chromosomes were classified as metacentric (m), subtelocentric (st) or acrocentric (a), according to their arm ratios (Levan et al. 1964).

Estimating levels of cytogenetic similarity among Notopteridae clades

The estimates of cytogenetic evolutionary diversification among the Notopteridae species was obtained from a data matrix with 13 specific chromosome features, including macrostructural traits (diploid number; occurrence of two-armed elements), organization of repetitive sequences in the

chromosomes [e.g., rDNAs sites; (TTAGGG)_n sites], and CGH homology (intraclade genomic similarity). The groups/species relationships (Notopteridae; African Notopteridae species; African/Asian Notopteridae species; Asian Notopteridae species) followed phylogenetic hypothesis based on DNA molecular markers available to family (Inoue et al. 2009; Lavoué, 2016). Cytogenetic similarity indexes were calculated for all inner Notopteridae clades.

Results

Whole chromosome painting of XNI-1 probe

As a control experiment, we first applied the XNI-1 probe in *X. nigri* and the first chromosome pair was completely painted as expected, with prominent hybridization signals in both terminal regions. Additionally, faint hybridization blocks in the centromeric region of three other chromosomal pairs were also observed (**Figure 3a**).

The XNI-1 probe hybridization in the notopterid species of other genera showed a bright hybridization signals in the centromeric region of a medium-sized acrocentric pair for all the six species. However, we are not able to convincingly identify which pair was painted and whether they are equivalent pairs between the species, due to the fact that the chromosomes of the complement have similar size and morphology (**Figure 3b**).

Comparative genomic hybridization (CGH)

In the interspecific set of experiments, the cross-hybridization of the gDNA probes from the species produced only limited numbers of overlapping signals (**Figures 4-6**). More specifically, while the gDNA probes hybridizing back against their own chromosome complements highlighted many heterochromatic blocks abundantly present in the centromeric and terminal chromosomal regions, the probes derived from the gDNA of species of other genera usually produced only weak hybridization patterns. Few consistent signals were accumulated in the terminal portions of some chromosomes (thus resulting in co-localization of both genomic probes, yielding the yellowish signal). Some of these signals were considerably stronger and could be related

to major rDNA sites. On the other hand, when performing the intrageneric experiments in *Chitala* species, chromosomes were almost equally stained with both genomic probes (again with a stronger binding preferentially in terminal or pericentromeric heterochromatic regions), suggesting significant sequence homology. Besides that, several exclusive genome-specific signals were also apparent.

Discussion

The conservative chromosome formula and diploid numbers among species of Notopteridae are preferentially maintained even in large periods of time, apparently with only slight disturbances of colinearity (**Figure 7**). This cytogenetical trend contrast with the more dynamic evolution showed by other Osteoglossiformes lineages. In fact, Mormyridae, a sister group of Notopteridae (Inoue et al. 2009), whose species diverged more than 100 Mya (Lavoué, 2016), had a marked karyotype diversification, mainly modulated by pericentric inversions (NF=52-68) (Ozouf-Costaz et al. 2015b).

Karyotype and chromosome diversifications may accompany speciation (White, 1978; King, 1993; Coyne and Orr, 2004; Potter et al. 2017). During the phyletic diversification, the rate of karyotype evolution can be highly variable in phylogenetically related fish groups (Molina et al. 2014a). In fact, despite the long divergence time, several fish groups have shown no karyotype differentiation in macrostructure or only some minor differences. For example, in the cohort Clupeocephala, the largest clade of Teleostei with a long evolutionary history (≈ 153 Mya), this condition is characterized by an extensive sharing of a basal karyotype with $2n=48$ acrocentric chromosomes (Brum and Galetti, 1997). Besides the macrostructural karyotype similarities, cytogenomic analyses have supported a conservative scenario regarding the genomic organization (Motta-Neto et al. 2011a, b, 2012). Although some fish groups exhibit structural karyotype diversifications, like recent Cichlidae, chromosomal homologies have been identified by BAC-FISH revealing large syntenic chromosome segments maintained conserved during evolution (Mazzuchelli et al. 2012).

The elevated macrostructural karyotype conservation over time

represents an evolutionary process defined early as karyotype stasis (King, 1993) and exemplified for several fish families (Motta-Neto et al. 2011a; Molina et al. 2013; Calado et al. 2013, 2014). Despite that, this process has not been demonstrated for all fish clades yet, and its probable causes have been delineated for some groups (Molina, 2007), as its recurrence and phylogenetic extension (Molina et al. 2014a, b). Karyotype stasis can be associated with a recent phyletic radiation (Getlekha et al. 2017), or less precise cytogenetic techniques in the past (Motta-Neto et al. 2012). However, in the cases where the absence of marked chromosomal changes resists to large divergence episodes have been suggested that the karyotype stasis can be modulated mainly by “extrinsic” and “intrinsic” causes (Molina, 2007). Among extrinsic causes for the low evolutionary dynamics that have been suggested were mainly those related to population structure. Among them, limited occurrence of biogeographic barriers (Brum, 1996), range of larval pelagic phase in marine environments (Molina et al. 2014a), or active adult migration (Soares et al. 2017), level of parental care, occupation of exclusive habitats, and population size can be listed (Molina, 2007). On other hand, factors associated with chromosome organization can propitiate variable rhythms of evolutionary changes in some lineages. In fact, particular chromosome characteristics related to the organization and particular properties of DNA sequences are phylogenetically shared and can promote less stable evolutionary arrays for chromosomes of a group of species. Among them, the amount and heterochromatin heterogeneity degree (Motta-Neto et al. 2011a, 2011b, 2012), specific repetitive elements (Ellegren, 2010; Farré et al. 2015), or sequences/regions that contribute to distortions during asymmetric meiotic segregation (Molina et al. 2014a, 2014b), can be highlighted.

Heterochromatin is a repository of very complex sets of repetitive DNA sequences (Costa et al. 2015), including mobile elements, notoriously involved in chromosome changes (Cordaux and Batzer, 2009), and duplications, that can propitiate substrates for illegitimate recombination, resulting in chromosome rearrangements (Bailey et al. 2004; Peng and Karpen, 2008; Sotero-Caio et al. 2017).

Divergences in tandem repeats occur in different taxonomic levels, even in populations, and can precedes the evolution of species (Feliciello et al.

2011). In some Characiforms groups with very high karyotype diversification, the heterochromatic regions are extremely polymorphic among populations (e.g., Kantek et al. 2009). In contrast, reduced and homogeneous heterochromatins have been suggested as one of the probable causes of evolutionary inertia in certain chromosome sets (Molina, 2007; Motta-Neto et al. 2011a). In this sense, the high homology of orthologous heterochromatic regions in several Notopteridae species can indicate an accessory role of the repetitive elements in karyotype divergence and a possible explanation to evolutionary karyotype macrostructure maintenance for this family.

In notopterid genera, the application of conventional cytogenetic techniques (C-banding and Ag-NOR) coupled with FISH using repetitive DNA probes complementary to 5S and 18S rDNA clusters and a set of microsatellite motifs did not reveal any substantial differentiation at the sub-chromosomal level of genome organization of these species as well (Barby et al. in press).

A well-resolved phylogeny for knifefishes allowed investigations of allows investigation into the historical chromosome changes that occurred in this fish group. The cytogenetic divergence level was calibrated by comparative analysis of homologous chromosomal traits within and among clades of Notopteridae. The common chromosomal features are progressively larger regarding the phylogenetic proximity showing support for current phylogenies based on molecular evidence.

The prediction of growing karyotype/chromosomal identity is followed by all clades (**Figure 7**) except by the clade formed by the African lineages *Xenomystus* and *Papyrocranus*. The cytogenetic traits analyzed indicate elevated karyotype conservatism among Asian genera/species (90%), but very low similarity between African lineages represented by *X. nigri* and *P. afer* (50%). Comparisons between African and Asian (70%) are biased overall for marked diversification suffered by *P. afer*. Remarkably, this species is unique with the possession of $2n > 42$, biarmed chromosomes and additionally a co-localized array of 18S and 5SDNAs, also presented by *C. chitala* (Barby et al. in press), indicating a peculiar karyoevolution pattern. When *P. afer* is excluded from the analysis, the similarity index among lineages of two continents increases substantially (85%).

Since the evolutionary split between African Notopteridae lineages (≈ 55 Mya), the level of chromosome differentiation among the extant genera was lower than the exhibited by all the sets of lineages of Notopteridae, diverged significantly earlier (≈ 120 Mya). The clade *Notopterus/Chitala* with a more recent origin (≈ 50 Mya), presents considerably less cytogenetical divergence (90%). Such divergent pattern clearly suggests differential rates of chromosome evolution among Notopteridae clades. Molina et al. (2014b) analyzing chromosome evolution rates in Percomorpha groups, which comprise more than 25% of all living vertebrates, demonstrated the occurrence of considerable variation in evolutionary karyotype rates. In this metadata study some families showed very low rates of karyotype changes suggesting chromosome stasis, while others in extreme cases reaching a magnitude of variation of a hundred times.

In accordance to the expected phylogenetic hypothesis (Inoue et al. 2009; Lavoué, 2016) the cytogenetic similarity between all *Chitala* species (diverged ≈ 35 Mya) was lower than between *C. blanci* and *C. ornata*, which are phylogenetically closer and demonstrated identical cytogenetic traits. Surprisingly, the approximately ≈ 30 Mya of species divergence was not sufficient for fixation of any distinct cytogenetic traits, indicating a very slow temporal divergence, like other cases of karyotype stasis in fishes (Molina, 2007). In *Chitala* species, the extensive shared cytogenetic features are supported by CGH array that only slightly differed in overall hybridization pattern, thus pointing to a high degree of sequence homology. This condition is coincident with other vertebrate groups, whose evolutionary stasis is perceived across widely phylogenetically distributed clades by whole chromosomes that have remained mostly intact during 100 million years, like birds, (Nanda et al. 2008; Oliveira et al. 2008, 2010; Ellegren, 2010; Tagliarini et al. 2011), lizards (Pokorná et al. 2011), and mammals (Balmus et al. 2007; Dementyeva et al. 2010; Kulemzina et al. 2011) species. In fishes, evidence of the high level of cytogenetic conservatism have been obtained among closely-related cichlid species (Valente et al. 2009), and in distinct karyomorphs of the wolf fish *Hoplias malabaricus* (Semper et al. 2017) and, to a lesser extent, our results are comparable to those obtained in *Pyrrhulina* species (Moraes et al. 2017).

Regarding the CGH experiments performed in order to compare genomes among the different notopterid genera (*Xenomystus*, *Papyrocranus*, *Notopterus*, and *Chitala*), our results suggest an advanced stage of sequence divergence, except for the bright signals corresponding to the NOR site (a result typical for distantly related or substantially diverged genomes, see Lim et al. 2007; Majka et al. 2017). The decrease of shared sequences is hardly surprising considering the ancient time of divergence between the clades. The evolutionary genetic differentiation among Notopteridae genera is also perceived in mitogenome and nuclear genome using mtDNA markers and new generation sequencing technology by DArTseq markers (Inoue et al. 2009; Barby et al. in press). The progressive temporal reduction of chromosome homology in Notopterids seems to occur slowly and suggests the cumulative action of several factors associated to chromosome evolution, such as intrachromosomal rearrangements. The internal reorganization in chromosomes is likely to be related with less identified rearrangements in fish karyotypes, such as paracentric inversions or bursts of amplification of repetitive sequences, mutations, with marked role in the karyotype evolution of several animal groups (e.g., Matsuoka et al. 2004). The features of repetitive DNA sequences organization and macrostructural karyotype patterns among knifefishes highlight shared common traits, congruent with the gradual temporal divergence among the lineages and with phylogenetic relationships in this family (Figure 7).

The similarities between the karyotype structure in Notopteridae species raise the question: are the chromosome pairs homeologous among these species? This question is pertinent to confirm chromosome markers in groups with very diversified karyotype evolution (Milhomem et al. 2013), or to establish the conservation level of syntenic groups in those with very conserved karyotype macrostructure. Thus, inter-specific cross-hybridization experiments using the XNI-1 WCP were performed to help clarify this question. In *X. nigri*, the first pair was painted, with conspicuous bright signals detected in both terminal regions (heterochromatin sites) of the chromosome after FISH. Besides, bright signals were also identified in few additional specific regions of other chromosomes of the complement. The XNI-1(chromosome 1 of *X. nigri*) probe showed diffuse and limited homology in inter-genera cross-hybridization, showing a temporal reduction of syntenic sequences. In fact, among the

notopterid species of distinct genera highlights a homeolog region, possibly heterochromatic (Barby et al. in press), in the centromeric region of a medium-sized acrocentric pair for all the six species. In front the larger temporal divergence among Notopteridae lineages of Africa and Asia, these shared hybridization signals are indicative of an ancestral conserved sequences cluster. The presence of these linkage groups in these chromosomes open perspectives that several others homologous syntenic regions have remained conserved among the genome differentiation of the species despite long temporal isolation.

Considering birds, a group with recognized chromosome conservatism (Pokorná et al. 2011), comparative mapping of orthologous genes in the Z chromosome of species belonging to different orders, confirmed the maintenance of this syntenic group. However, the linear gene order has been changed (Backström et al. 2006; Itoh et al. 2006, Nanda et al. 2008; Skinner & Griffin, 2012) indicating that intra-chromosomal rearrangements (mainly pericentric and paracentric inversions) occurred several times during avian evolution (Backström et al. 2006; Itoh et al. 2006).

In summary, the maintenance of the gross structure of karyotypes among the Notopteridae lineages shows in minor time scale that similar evolutionary processes occurred within these lineages. The conserved condition in the clades is only disrupted by divergent numerical and structural chromosome rearrangements occurred in *P. afer* and *C. lopis*. The extant representatives of *Xenomystus*, *Notopterus*, and *Chitala* genera, preserved a considerable level of cytogenetic similarities among them. In general, the temporal decrease of homology among their chromosomes, suggests the involvement of intrachromosomal rearrangements likely to reshape the syntenic order. The mode of chromosome evolution in the family, apparently was constant over time. Thus, Notopteridae is an interesting model for tracking the chromosome evolution in fishes and singularly illustrates new aspects of karyotype stasis in this important vertebrate group.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Proc. nos 401962/2016-4 and 304992/2015-1) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (Proc. No 2016/22196-2).

Table 1. Collection sites of the Notopteridae species and number of individuals analyzed in this study

Species	Sampling Site	N
<i>Chitala blanci</i>	Song Khram basin, Thailand	(04 ♀ ; 04 ♂)
<i>Chitala chitala</i>	Ganges river, India	(05 ♀ ; 04 ♂)
<i>Chitala lopis</i>	Song Khram basin, Thailand	(12 ♀ ; 06 ♂)
<i>Chitala ornata</i>	Chi and Mekong basins, Thailand	(09 ♀ ; 07 ♂)
<i>Notopterus notopterus</i>	Chi and Mekong basins, Thailand	(06 ♀ ; 04 ♂)
<i>Papyrocranus afer</i>	Oluwa River, Nigeria	(19 ♀ ; 21 ♂)
<i>Xenomystus nigri</i>	Oluwa River, Nigeria	(13 ♀ ; 24 ♂)

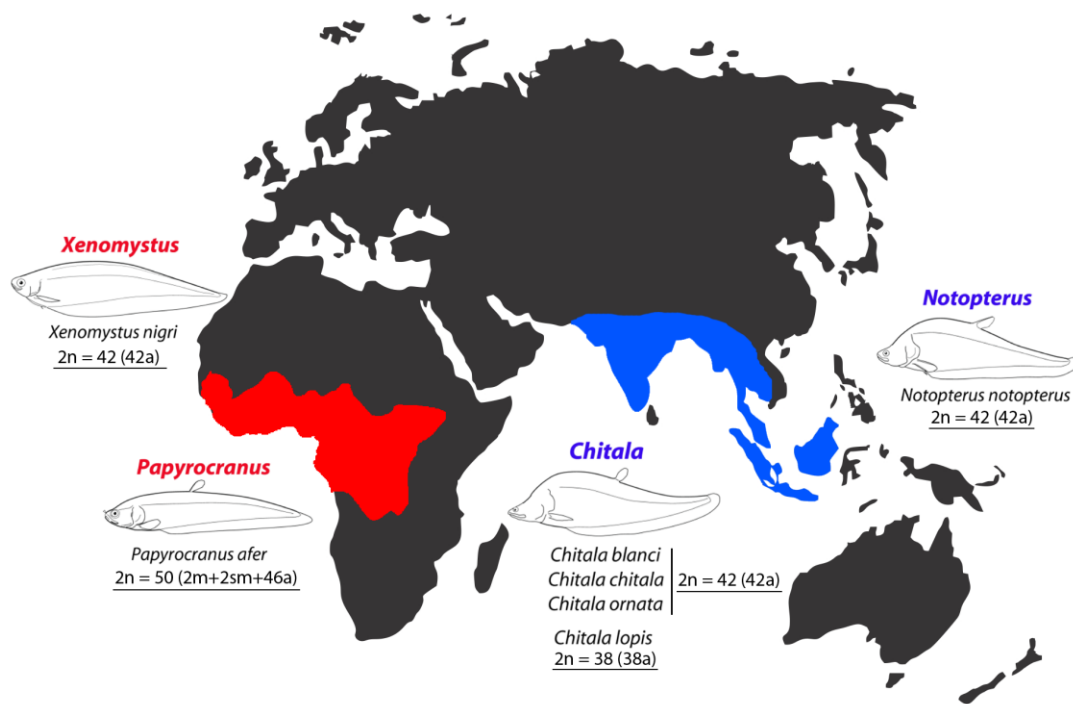


Figure 1. Map showing the area of distribution and the chromosomal characteristic of the sevennotopterid species examined in this study. The geographic distribution of the living species of Notopteridae is shown in red (Africa) and blue (Asia).

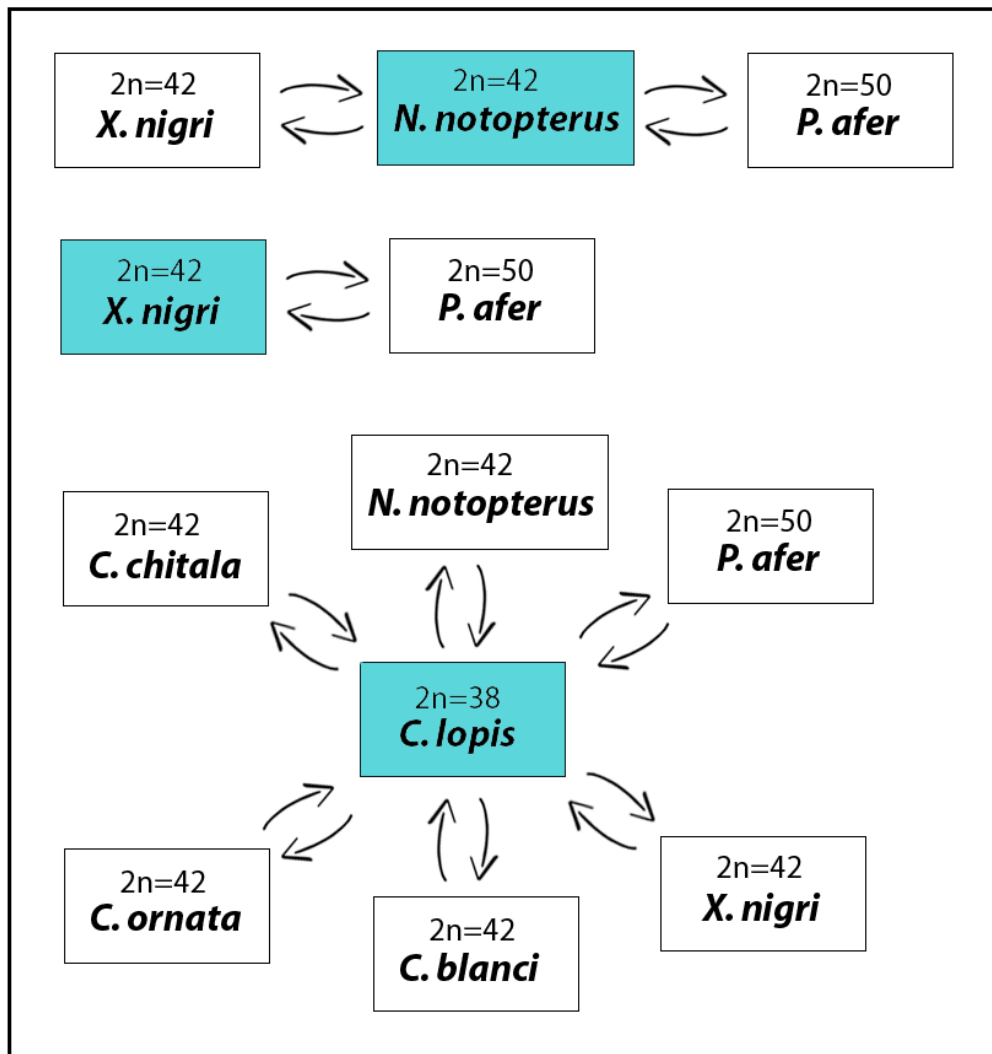


Figure 2. The experimental design in this study. Three different experimental designs were used in this study. In the first one, gDNA of *P. afer* and *X. nigri* were used for hybridization against chromosomal background of *N. notopterus*. In the second set of experiments, gDNA of *X. nigri* was used for hybridization against chromosomal background of *P. afer* and the in the third set of experiments, gDNA of all Notopteridae species were used for hybridization against chromosomal background of *C. lopis*.

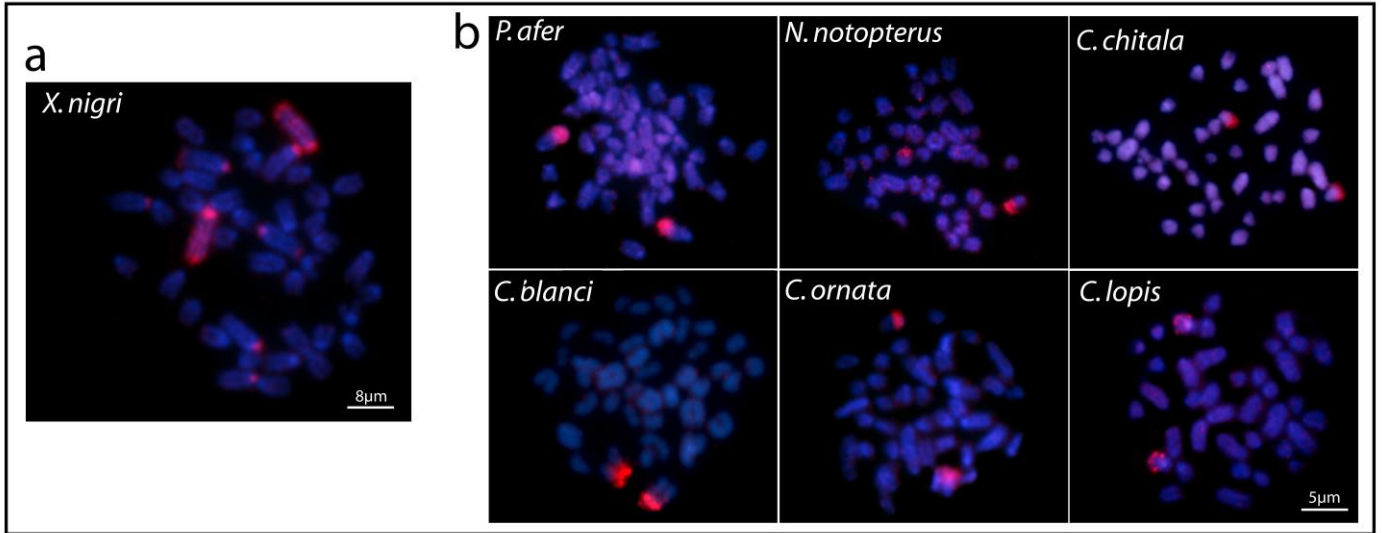


Figure 3. Zoo-FISH results after the use of XNI-1 probe. (A) XNI-1 probe applied in the metaphase plate of *X. nigri* and (B) The XNI-1 probe hybridization in the other six notopterid species. Bar = 5 µm

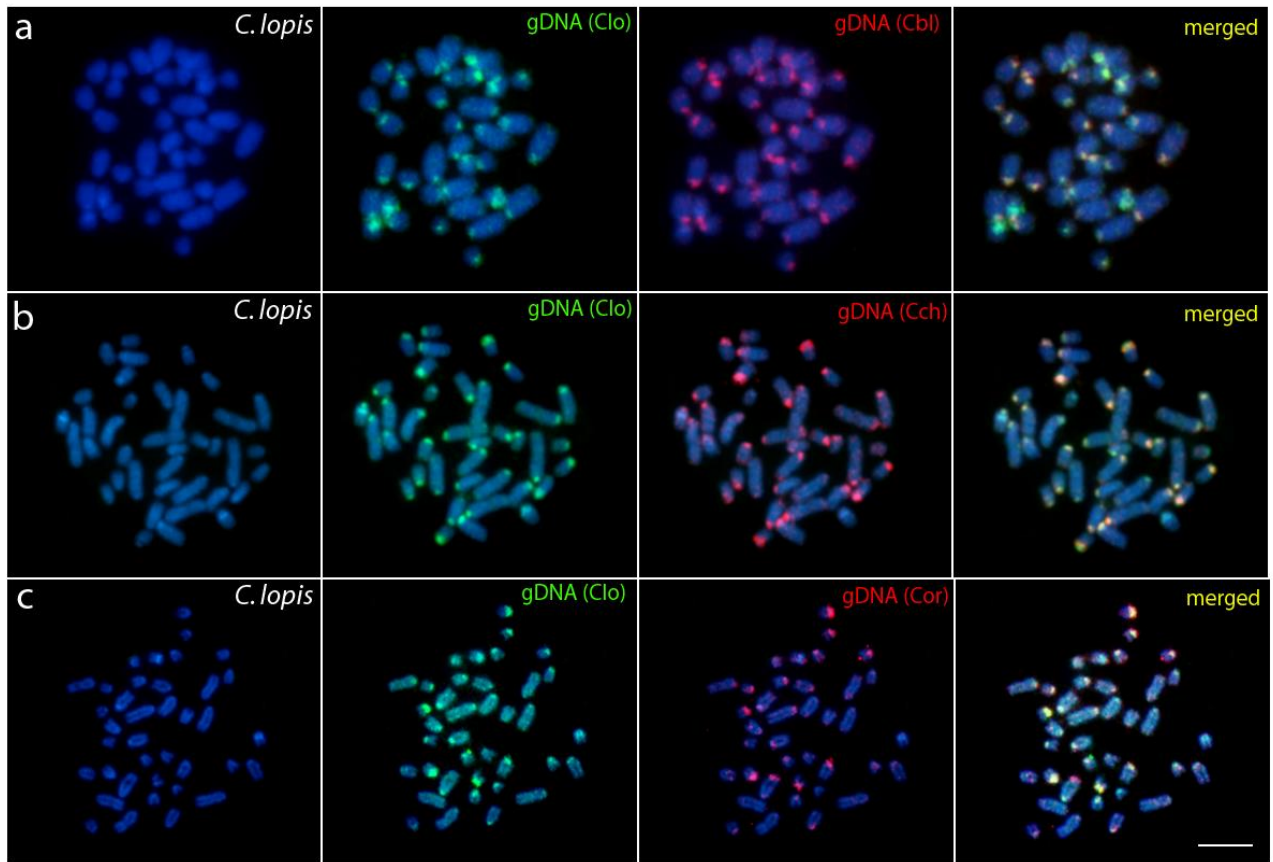


Figure 4. Comparative genomic hybridization (CGH) using the gDNA of *C. blanci* (A), *C. chitala* (B) and *C. ornata* (C) against chromosomal background of *C. lopis*. First column: DAPI images (blue); Second column: hybridization pattern with *C. lopis* (Clo) gDNA probe; Third column: Hybridization patterns with *C. blanci* (Cbl) gDNA, *C. chitala* (Cch) gDNA and *C. ornata* (Cor) gDNA. Fourth column: merged images of each genomic probes and DAPI staining. The common genomic regions are depicted in yellow. Bar = 5 μ m.

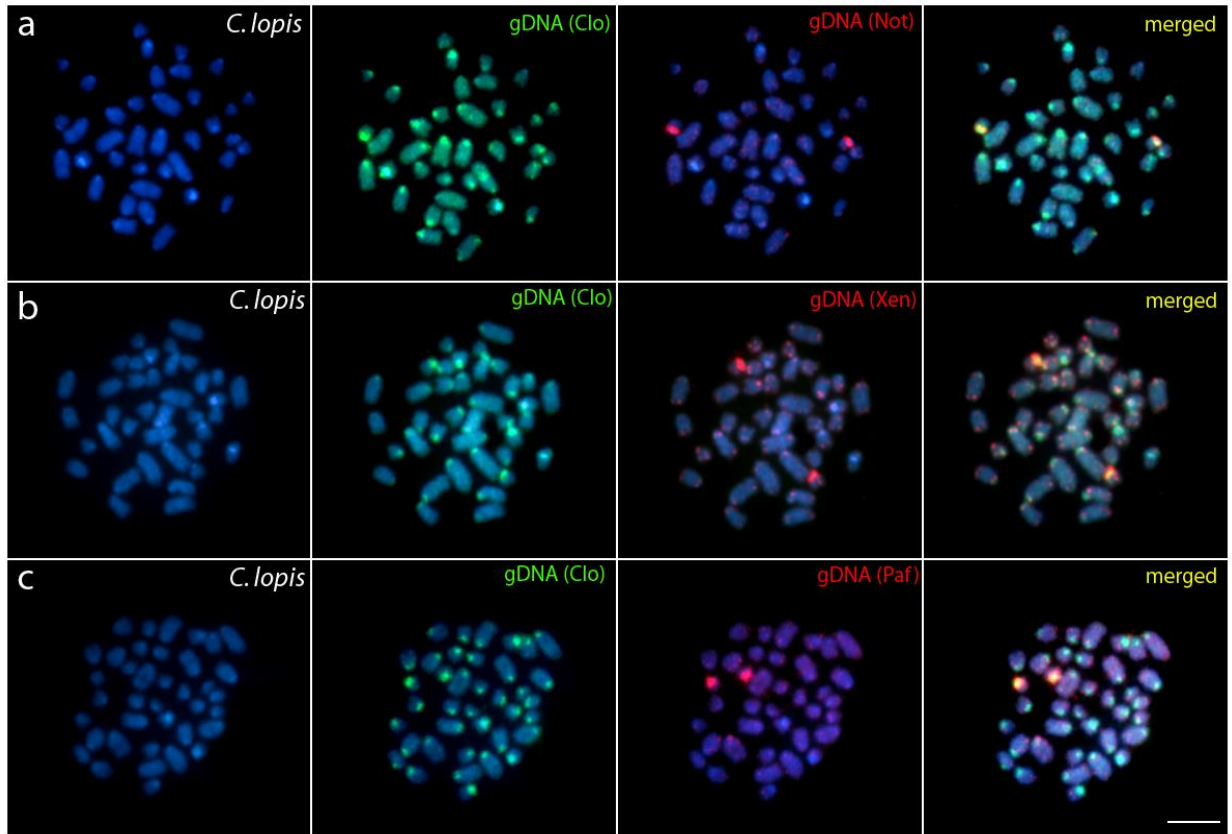


Figure 5. Comparative genomic hybridization (CGH) using the gDNA of *N. notopterus* (A), *X. nigri* (B) and *P. afer* (C) against chromosomal background of *C. lopis*. First column: DAPI images (blue); Second column: hybridization pattern with *C. lopis* (Clo) gDNA probe; Third column: Hybridization patterns with *N. notopterus* (Not) gDNA, *X. nigri* (Xen) gDNA and *P. afer* (Paf) gDNA. Fourth column: merged images of each genomic probes and DAPI staining. The common genomic regions are depicted in yellow. Bar = 5 μ m.

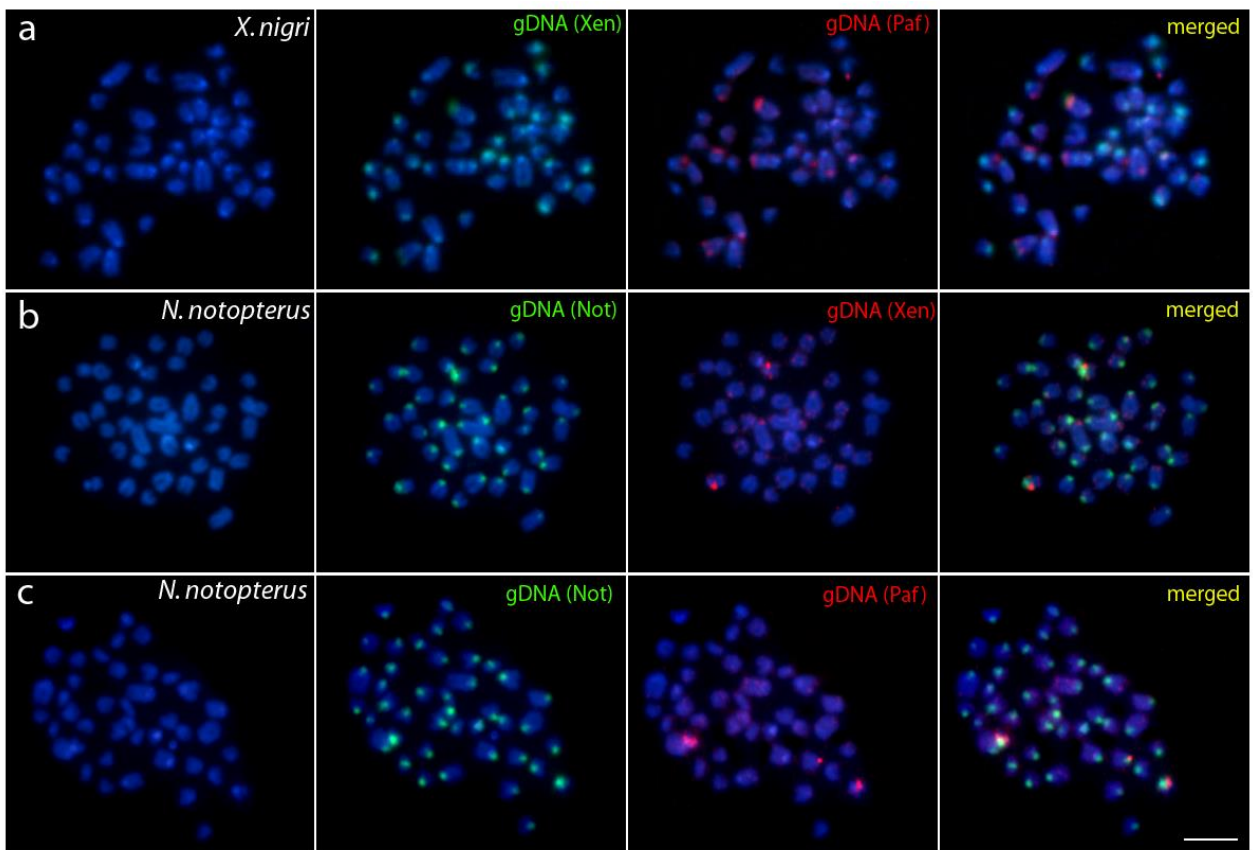


Figure 6. Comparative genomic hybridization (CGH) using the gDNA of *P. afer* against chromosomal background of *X. nigri* (A) and using the gDNA of *X. nigri* (B) and *P. afer* (C) against chromosomal background of *N. notopterus*. First column: DAPI images (blue); Second column: hybridization pattern with *X. nigri* (Xen) and *N. notopterus* (Not) gDNA probe; Third column: Hybridization patterns with *X. nigri* (Xen) gDNA and *P. afer* (Paf) gDNA. Fourth column: merged images of each genomic probes and DAPI staining. The common genomic regions are depicted in yellow. Bar = 5 μ m.

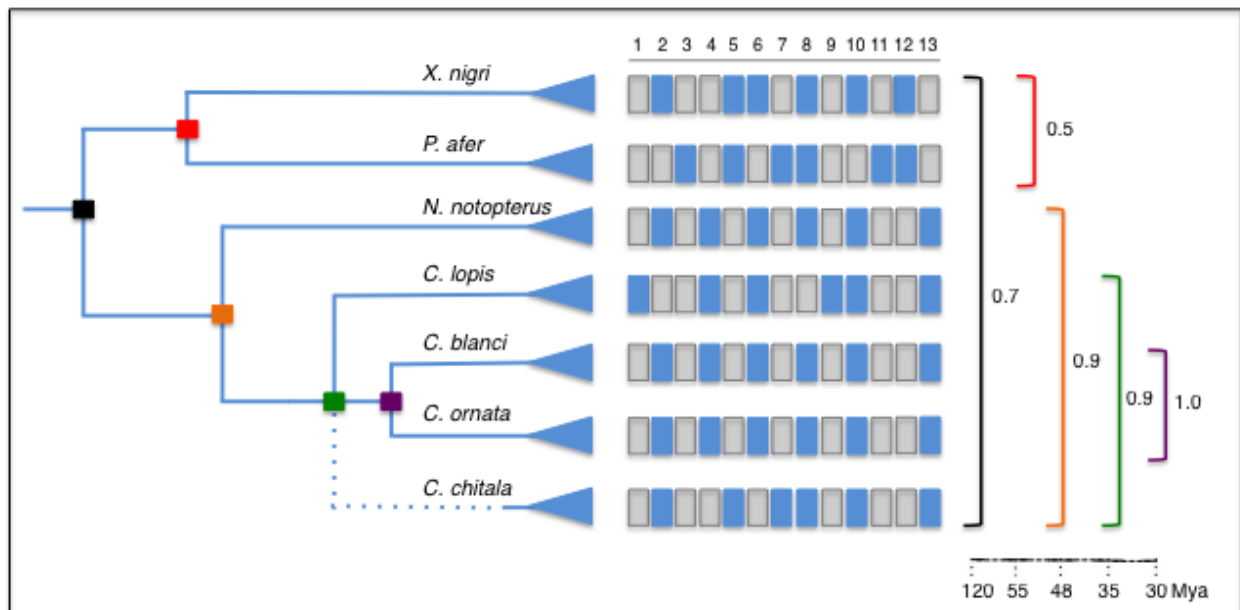


Figure 7. Similarity cytogenetic indexes in Notopterids clades from phylogenetic and temporal perspectives. Matrix traits: Diploid numbers - 1. $2n=38$; 2. $2n=42$; 3. $2n=50$. 18S rDNA sites: 4. unique; 5. multiple. 5S rDNA sites - 6. non synteny with 18S rDNA; 7. synteny. (TTAGGG) n sites: 8. terminal; 9. ectopic. Biarmed elements: 10. absence; 11. presence. CGH homology: 12. high genomic similarity intraclade; 13. reduced similarity.

Considerações Finais

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além da ampla distribuição geográfica, os peixes Osteoglossiformes representam uma das linhagens mais antigas de teleósteos de água doce, constituindo um grupo importante para estudos sistemáticos e evolutivos. Esse grupo teve origem na Gondwana e sua distribuição provavelmente contribuiu para a diversidade que ora apresenta. No entanto, dados de citogenética e genômica são bastante escassos, dificultando o rastreamento das trajetórias evolutivas dentro dessa ordem. Além disso, sua ampla distribuição, com grupos endêmicos a diferentes continentes, dificulta um estudo integrativo e uma visão globalizada do seu processo evolutivo. Neste estudo realizamos uma análise cromossômica detalhada de sete espécies de Notopteridae provenientes de regiões da África e da Ásia utilizando métodos citogenéticos moleculares convencionais e avançados evidenciando características inerentes desse grupo. Adicionalmente, as distâncias genéticas das espécies foram avaliadas a partir do sequenciamento DarT-Seq, fornecendo um painel evidente da diversidade genética entre as espécies africanas e asiáticas de Notopteridae sendo consistentes com os marcadores cromossômicos e dados geográficos e históricos associados à diversificação evolutiva dos Notopteridae. Nossos resultados evidenciaram dois clados principais de notopterídeos com base em suas características genômicas e cromossômicas: o grupo de espécies africanas e do sul da Ásia, onde *Chitala chitala* apresenta características intermediárias entre eles. Significativamente, *C. chitala* apresenta a distribuição mais limitada no continente asiático, sendo restrito à Índia, indicando que esta região provavelmente representou a rota de migração dos notopterídeos para a Ásia.

Na verdade, de forma semelhante aos Notopteridae, várias linhagens modernas de vertebrados terrestres podem ter sido originadas e depois isoladas no subcontinente indiano durante sua deriva, até que pudessem colonizar outras regiões após a colisão da Índia e Eurásia. Além dos Notopteridae, vários outros peixes de água doce primários mostram uma distribuição afro-asiática e, notavelmente, a maioria deles tem uma diversificação conspícua do cariótipo, resultante de milhões de anos de restrição ao fluxo genético. Contrariamente, apesar da significativa diversidade

genética e do seu longo período de divergência, a maioria dos Notopteridae mantém organização cariotípica similar em nível macroestrutural. Contudo, até o momento, não há respostas convincentes que esclareçam o que moldou esse modo particular de evolução tão divergente aos níveis cromossômicos e genômicos.

Buscando melhor elucidar este padrão evolutivo evidenciado por esse grupo de Osteoglossiformes, realizamos experimentos de hibridização genômica comparativa (CGH) e Zoo-FISH explorando os caracteres interespecíficos decorrentes dessas modernas metodologias de análises. Ambas as metodologias se mostraram eficientes para abordagens das relações cromossômicas entre as espécies, possibilitando avanços no tocante ao conhecimento da carioevolução do grupo. Uma estimativa da diversificação citogenética entre as espécies investigadas foi obtida a partir de uma matriz de dados com 13 características cromossômicas, incluindo caracteres macroestruturais (número diplóide, número de braços cromossômicos), organização de sequências repetitivas (sítios de DNA ribossomais e teloméricos) e homologias genômicas (dados CGH). A manutenção de uma estrutura cariotípica geral entre as linhagens de Notopteridae mostra, em escala menor de tempo, que processos evolutivos similares também ocorreram nas mesmas. A condição conservadora nos clados é apenas interrompida por um processo cromossômico numérico e estrutural divergente ocorrido em *Papycrocranus afer*. Os representantes dos gêneros *Xenomystus*, *Notopterus* e *Chitala* preservam um considerável nível de similaridades citogenéticas entre eles. Em geral, a diminuição temporal da homologia entre os seus cromossomos sugere o envolvimento de rearranjos intracromossômicos, aparentemente para uma remodelagem da ordenação sintênica. O modo de evolução cromossômica na família, exceto pela divergência episódica em linhagens africanas, foi aparentemente constante ao longo do tempo. Assim, Notopteridae se apresenta como um modelo interessante para rastrear a evolução cromossômica em peixes e ilustra, singularmente, novos aspectos da estase cariotípica neste importante grupo de vertebrados.

Os dados ora obtidos, comparado aos dados moleculares constantes na literatura (Inoue et al. 2009 e Lavoué 2016), possibilitaram considerar uma

hipótese alternativa à “*Out-of-India*”, considerando as características cromossômicas como moleculares, juntamente com o contexto geológico de separação das massas. Assim sendo, mesmo após a segregação das grandes massas continentais da África/Madagascar-Seychelles-Índia, é possível ter ainda havido, durante algum tempo, contato entre as linhagens oriundas da antiga Gondwana, considerando uma possível ponte de ligação entre a África e o subcontinente indiano por intermédio de Madagascar e do arquipélago de Seychelles. A ocorrência de pontes temporárias de ligação vem sendo considerada em muitos grupos de dispersão limitada, incluindo os caranguejos de água doce, como possíveis eventos influenciando a atual distribuição geográfica que os mesmos apresentam. Contudo este é o primeiro estudo a considerar tal abordagem entre os peixes, tendo em vista as condições encontradas entre os Osteoglossiformes.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuín M, Martínez P, Sánchez L (1996). Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)_n in four salmonid species. **Genome**, 39:1035–1038.
- Agnarsson I, Kuntner M (2012). The generation of a biodiversity hotspot: biogeography and phylogeography of the Western Indian Ocean Islands. In: Anamthawat-Jonsson K (Eds). Current topics in phylogenetics and phylogeography of terrestrial and aquatic. **InTech**, Rijeka, pp. 33–82.
- Aitchison JC, Ali JR, Davis AM, (2007). When and where did India and Asia collide? **Journal of Geophysical Research**, 112B.
- Ali JR, Aitchison JC (2008). Gondwana to Asia: Plate tectonics, paleogeography and the biological connectivity of the Indian sub-continent from the Middle Jurassic through latest Eocene (166– 35 Ma). **Earth-Science Reviews**, 88:145–166.
- Almeida-Toledo LF (1998). Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari, RP, Lucena ZM & Lucena CA. eds Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. **Edipucrs**, Porto Alegre; p. 583-588.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215(3):403-405.
- Amemiya CT, Gold JR (1986). Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. **Copeia**, 1:226–231.
- Amorim EP, Vilarinhos AD, Cohen KO, Amorim VBO et al. (2009). Genetic diversity of carotenoid-rich bananas evaluated by Diversity Arrays Technology (DArT). **Genetics and Molecular Biology**, 32(1): 96-103.
- Arai R (2011). Fish karyotypes. A Check List. **Springer**, 340 pp.
- Arratia G (2010). The Clupeocephala re-visited: Analysis of characters and homologies. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, 45:635-657.
- Austin CM, Tan MH, Croft LJ, Hammer MP, Gan HM (2015). Whole genome sequencing of Asian arowana (*Scleropages formosus*) provides insight into the evolution of ray-finned fishes. **Genome Biology and Evolution**, 7(10): 2885–2895.
- Axelrod HR (Eds), Burgess WE, Emmens CW, Pronek N (1996). Exotic Tropical Fishes. **T.F.H Publications**, Neptune City, New Jersey, 1312p.
- Azuma Y, Kumazawa Y, Miya M, Mabuchi K, Nishida M (2008). Mitogenomic evaluation of the historical biogeography of cichlids toward reliable dating of teleostean divergences. **BMC Evolutionary Biology**, 8:215.
- Backström N, Brandström M, Gustafsson L, Qvarnström A, Cheng H, Ellegren H (2006). Genetic mapping in a natural population of collared flycatchers (*Ficedula albicollis*): Conserved synteny but gene order rearrangements on the avian Z chromosome. **Genetics**, 174(1): 377-86.
- Bailey JA, Baertsch R, Kent WJ, Haussler D, Eichler EE (2004). Hotspots of mammalian chromosomal evolution. **Genome Biology**, 5: R23.
- Balmus G, Trifonov VA, Biltueva LS, O'Brien PCM, Alkalaeva ES, Fu B et al. (2007). Cross species painting among camel, cattle, pig and human: further insights into the putative Cetartiodactyla ancestral karyotype. **Chromosome Research**, 15 499–514.
- Baloch FS, Alsaleh A, Shahid MQ, Çiftçi V, Miera LES et al. (2017). A Whole Genome DArTseq and SNP Analysis for Genetic Diversity Assessment in Durum Wheat from Central Fertile Crescent. **PLoS one**, 12(1):1-18.

- Bănărescu P. (1990). Zoogeography of Fresh Waters. General Distribution and Dispersal of Freshwater Animals. **Aula-Verlag**, Wiesbaden.
- Bănărescu P (1991). Zoogeography of Fresh Waters. vol. 2. **Aula-Verlag**, Wiesbaden.
- Barros LC, Junior PMG, Feldberg E (2016). Mapping 45S and 5S ribosomal genes in chromosomes of Anostomidae fish species (Ostariophysi, Characiformes) from different Amazonian water types. **Hydrobiologia**, 1–13.
- Berra T (2001). Freshwater fish distribution. **Academic Press**, San Diego, 604p.7
- Bertollo LAC, Cioffi MB, Moreira-Filho O (2015). Direct chromosome preparation from Freshwater Teleost Fishes. In: Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida-Toledo LF (Eds). Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts). **CRC Press**, Enfield USA, p. 21–6.
- Betancur-R R, Wiley EO, Arratia G, Acero A, Bailly N, Miya M, Lecointre G, Ortí G (2017). Phylogenetic classification of bony fishes. **BMC Evolutionary Biology**, 17:162.
- Bi K, Bogart JP (2006). Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic in situ hybridization (GISH). **Cytogenetic and Genome Research**, 112:307–31.
- Bian C, HU Y, Ravi V, Kuznetsova IS, Shen X, Mu X et al. (2016). The Asian arowana (*Scleropages formosus*) genome provides new insights into the evolution of an early lineage of teleosts. **Scientific Reports**, 6:1-17.
- Biémont C, Vieira C (2006). Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, 443:521-524.
- Blackburn EH (1994). Telomeres: No end in sight. **Cell**, 77:621-623.
- Blanco DR, Vicari MR, Lui RI, Artoni RF, Almeida MC, Traldi JB, Margarido VP, Moreira-Filho O (2014). Origin of the X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. **Genetica**, DOI 10.1007/s10709-014-9759-4.
- Bossuyt F, Milinkovitch MC (2001). Amphibians as indicators of early tertiary “out of India” dispersal of vertebrates. **Science**, 292:93–95.
- Brandolini A, Volante A, Heun M (2016). Geographic differentiation of domesticated einkorn wheat and possible Neolithic migration routes. **Heredity** (Edinb); 117(3): 135–141.
- Briggs JC (1979). Ostariophysan zoogeography: an alternative hypothesis. **Copeia** 1:111-118.
- Brower JR, Willemsen R, Oostra BA (2009). Microsatellite repeat instability and neurological disease. **Bioessays**; 31:71– 83.
- Brum, MJJ (1996). Cytogenetic Studies of Brazilian Marine Fish. **Brazilian Journal of Genetics**, 19(3): 421-427.
- Brum MJJ, Galetti PM (1997). Teleostei ground plan karyotype. **Journal of Computational Biology**, 2: 91-102.
- Calado LL, Bertollo LAC, Costa GWWF, Molina WF (2013). Cytogenetic studies of Atlantic mojarra (Perciformes - Gerreidae): chromosomal mapping of 5S and 18S ribosomal genes using double FISH. **Aquaculture Research**, 44: 829-835.
- Calado LL, Bertollo LAC, Cioffi MB, Costa GWWF, Jacobina UP, Molina WF (2014). Evolutionary dynamics of rDNA genes on chromosomes of the *Eucinostomus* fishes: cytotaxonomic and karyoevolutive implications. **Genetics and Molecular Research: GMR**, 13:9951–9959.

- Canitz J, Kirschbaum F, Tiedemann R (2017). Karyotype description of the African weakly electric fish *Campylomormyrus compressirostris* in the context of chromosome evolution in Osteoglossiformes. **Journal of Physiology** (in press).
- Cavin L, Forey PL (2001). Osteology and systematic affinities of *Palaeonotopterus greenwoodi* Forey 1997 (Teleostei: Osteoglossomorpha). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 133: 25-52.
- Chakrabarty P. (2004). Cichlid biogeography: comment and review. **FISH and FISHERIES**, 5:97–119.
- Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, 371:215-220.
- Chen WJ, Lavoué S, Mayden RL (2013). Evolutionary origin and early biogeography of Otophysan fishes (Ostariophysi: Teleostei). **Evolution**, 67(8):2218–2239.
- Chen M-Y, Liang D, Zhang P (2015). Selecting Question-Specific Genes to Reduce Incongruence in Phylogenomics: A Case Study of Jawed Vertebrate Backbone Phylogeny. **Systematic Biology**, 64(6): 1104-1120.
- Chester M, Leitch AR, Soltis PS, Soltis DE (2010). Review of the Application of Modern Cytogenetic Methods (FISH/GISH) to the Study of Reticulation (Polyploidy/Hybridisation). **Genes**, 1:166-192.
- Chew JSK, Oliveira C, Wright JM, Dobson MJ (2002). Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)_n repetitive sequences in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosoma**, 111:45–52.
- Chowdhary BP, Raudsepp T (2001). Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. **Methods in Cell Science**, 23:37-55.
- Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (2009). Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genetics**, 10:34.
- Cioffi MB, Martins C, Rebordinos L, Vicari MR, Bertollo LAC (2010). Differentiation of the XX/XY sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*: Unusual accumulation of repetitive sequences on the X chromosome. **Sexual Development**, 4:176-185.
- Cioffi MB, Sánchez A, Marchal JA, Kosyakova N, Liehr T, Trifonov V, Bertollo LAC (2011a). Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamilial Erythrinidae fishes. **BMC Evolutionary Biology**, 11:186.
- Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC (2011b). The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the wolf fish genome *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 132: 289-296.
- Cioffi MB, Bertollo LAC (2012). Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: Garrido-Ramos, MA. (Eds). *Genome Dynamics*, **Karger**, 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: 186-194.
- Cioffi MB, Bertollo LAC, Villa MA, Oliveira EA, Tanomtong A, Yano CF, et al. (2015). Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and Its Implications for the Chromosomal Evolution of Channid Fishes (Actinopterygii, Perciformes). **PLoS one**, 10: e0130199.

- Coates D, Poeu O, Suntornaratana U, Tung NT, Viravong S (2003). Biodiversity and fisheries in the Lower Mekong Basin. **Mekong Development Series**. Mekong River Commission, Phnom Penh, No 2, 30pp.
- Cocca E, Patraccioli A, Morescalchi MA, Odierna G, Capriglione T (2015). Laser microdissection-based analysis of the Y sex chromosome of the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* (Notothenioidei, Channichthyidae). **Comparative Cytogenetics**, 9(1):1–15.
- Cooper A, Lalueza-Fox C, Anderson S, Rambaut A, Austin J, et al. (2001). Completemitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. **Nature**, 409:704–7.
- Cordaux R, Batzer MA (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. **Nature Reviews Genetics**, 10: 691–703.
- Costa GW, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF (2015). Structurally complex organization of repetitive DNAs in the genome of Cobia (*Rachycentron canadum*). **Zebrafish**, 12(3): 215-220.
- Coyne JA, Orr HA (2004). Speciation. **Sinauer Associates**, Sunderland, MA.
- Daniels SR (2011). Reconstructing the colonisation and diversification history of the endemic freshwater crab (*Seychellum alluaudi*) in the granitic and volcanic Seychelles Archipelago. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 61:534-542.
- Darlington PJ (1957). Zoogeography. The geographical distribution of animals. **Wiley & Sons**, New York, 675p.
- Dementyeva PV, Trifonov VA, Kulemzina AI, Graphodatsky AS (2010). Reconstruction of the putative Cervidae ancestral karyotype by chromosome painting of Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) with dromedary probes. **Cytogenetic and Genome Research**, 128: 228–235.
- Devlin RH., Nagahama, T (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, 208:191-364.
- Dice, L. R. (1945). Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. **Ecology**, 26: 297–302.
- Diniz D, Laudicina A, Cioffi MB, Bertollo LAC (2008). Microdissection and whole chromosome painting. Improving sex chromosome analysis in *Triplotheus* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 122: 163-168.
- Diniz D, Laudicina A, Bertollo LAC (2009). Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triplotheus* fish species (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, 32:37–41.
- 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**, 17:100.
- Donsakul T, Magtoon W (1990). A chromosome study on three species of featherbacks, *Notopterus chilata* (Hamilton), *N. bland* (D'Aubenton) and *N. notopterus* (Pallas), from Thailand. In: **Proceedings of the 28th Kasetsart University Conference, 29 - 31 January**. Kasetsart University, Bangkok, p.459-466.
- Ellegren H (2010). Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. **Trends in Ecology & Evolution**, 25: 283–291.

- Eschmeyer WN, Fong, JD. 2017. Species by family/subfamily. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed 14/11/2017.
- Fantinatti BEA, Mazzuchelli J, Valente GT, Cabral-de-Mello DC, Martins C (2011). Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Genetica**, 139: 1273-1282.
- Farré M, Robinson TJ, Ruiz-Herrera A (2015). An integrative breakage model of genome architecture, reshuffling and evolution. **Bioessays**, 37: 479–488.
- Feliciello I, Chinali G, Ugarković D (2011). Structure and population dynamics of the major satellite DNA in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **Genetica**, 139(8): 999-1008.
- Fontana F, Lanfredi M, Congiu L, Leis M, Chicca M, Rossi R (2003). Chromosomal mapping of 18S, 28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. **Genome**, 46(3): 473-477.
- Fontana F (2016). **Geneweb**. Available from <http://sveb.unife.it/it/ricerca-1/laboratori/geneweb>.
- Foster JT, Gerard JA, Chan AP, Rabinowicz PD, Ravel J, Jackson PJ, Keim P (2010). Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). **BMC Plant Biology**, 10:13.
- Freitas NL, Al-Rikabi ABH, Bertollo LAC, Ezaz T, Yano CF, Oliveira EA, Hatanaka T, Cioffi MB (2017). Early stages of XY sex chromosomes differentiation in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) revealed by DNA repeats accumulation. **Current Genomics**, 18.
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazak F, Yoshida MC (1997). Uniparental chromosome elimination in the early embryogenesis of the inviable salmonid hybrids between masu salmon female and rainbow trout male. **Chromosoma**, 106:44–52.
- Garavito A, Montagnon C, Guyoy R, Bertrand B (2016). Identification by the DArTseq method of the genetic origin of the *Coffea canephora* cultivated in Vietnam and Mexico. **BMC Plant Biology**, 16:242.
- Gemayel R, Vences MD, Legendre M, Verstrepen KJ (2010). Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. **Annual Review of Genetics**, 44:445– 477.
- Getlekha N, Molina WF, Cioffi MB, Yano CF, Maneechot N, Bertollo LAC, et al. (2016). Repetitive DNAs highlight the role of chromosomal fusions in the karyotype evolution of *Dascyllus* species (Pomacentridae, Perciformes). **Genetica**, 144:203–211.
- Getlekha N, Cioffi MB, Maneechot N, Bertollo LAC, Supiwong W, Alongklod T, Molina WF (2017). Contrasting evolutionary paths among Indo-Pacific *Pomacentrus* species promoted by extensive pericentric inversions and genome organization of repetitive sequences. **Zebrafish**, in press.
- Going JJ, Gusterson BA (1999). Molecular Pathology and Future Developments. **European Journal of Cancer**, 35:1895-1904.
- Gornung E, Mannarelli ME, Rossi AR, Sola L (2004). Chromosomal evolution in Mugilidae (Pisces, Mugiliformes): FISH mapping of the (TTAGGG)_n telomeric repeat in the six Mediterranean mullets. **Hereditas**, 140:158–159.

- Gornung E (2013). Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: A review of research. **Cytogenetic and Genome Research**, 141(2-3):90–102.
- Greenwood PH, Wilson MV, Paxton JR, Eschmeyer, WN (1998). Encyclopedia of Fishes. **Academic Press**, San Diego, p. 81–84.
- Gregory TR (2005). Genome size evolution in animals. In: Gregory TR (Ed.) The evolution of the genome. **Elsevier**: San Diego, CA. p. 3-87.
- Grewe PM, Feutry P, Hill PL, Gunasekera RM, Schaefer KM, Itano DG, Fuller DW, Foster SD, Davies CR (2015). Evidence of discrete yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) populations demands rethink of management for this globally important resource. **Scientific Reports**, 5:1-9.
- Gupta A, Lal KK, Mohindra V, Singh RK, Dwivedi AK, Gupta BK, Luhariya RK, Masih P, Mishra RM, Jena JK. (2013). Genetic divergence in natural populations of bronze featherback, *Notopterus notopterus* (Osteoglossiformes: Notopteridae) from five Indian rivers, analyzed through mtDNA ATPase6/8 regions. **Meta gene**, 1:50-57.
- Hay WW, DeConto R, Wold CN, Wilson KM, Voigt S, Schulz M, Wold-Rosby A, Dullo W-C, Rnov AB, Balukhovskiy AN, Soeding E (1999). Alternative global Cretaceous paleogeography. In: Barrera E, Johnson C (Eds.). The Evolution of Cretaceous Ocean/Climate Systems. Geological Society of America Special Paper, **Boulder**, 332:1–47.
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF (2008). Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 121: 55–58.
- Henning F, Moysés CB, Calcagnotto D, Meyer A, Almeida-Toledo LF (2011). Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (*Eigenmannia*). **Heredity**, 106: 391-400.
- Hilton EJ. (2003): Comparative osteology and phylogenetic systematics of fossil and living bony-tongue fishes (Actinopterygii, Teleostei, Osteoglossomorpha). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 137:1–100.
- Hirata J, Urushido T (2000). Karyotypes and DNA content in the Osteoglossiformes (in Japanese with English abstract). **Science Report of the Research Institute of Evolutionary Biology**, 9:83–90 (2000).
- Howard EL, Whittock SP, Jakse J, Carling J, Matthews PD, Probasco G, Henning JA et al. (2011). High-throughput genotyping of hop (*Humulus lupulus* L.) utilizing diversity arrays technology (DArT). **Theoretical and Applied Genetics**, 122:1265–1280.
- Howell WM, Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 36:1014-1015.
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, 19:4780.
- Inafuku J, Nabeyama M, Kikuma Y, Saitoh J, Kubota S, Kohno S (2000) Chromosomal location and nucleotide sequences of 5S ribosomal DNA of two cyprinid species (Osteichthyes, Pisces). **Chromosome Research**, 8:193–199.
- Inoue JG, Kumazawa Y, Miya M, Nishida M. (2009). The historical biogeography of the freshwater knifefishes using mitogenomic approaches: A Mesozoic origin of the

- Asian notopterids (Actinopterygii: Osteoglossomorpha). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 51:486–499.
- Itoh Y, Kampf K, Arnold AP (2006). Comparison of the chicken and zebra finch Z chromosomes shows evolutionary rearrangements. **Chromosome Research**, 14: 805–815.
- Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001). Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, 29:4.
- Jauch A, Wienberg J, Stanyon R, Arnold N, Tofanelli S, Ishida T, Cremer T (1992). Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 89:8611-8615.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992). Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. **Science**, 258:818-821.
- Kantek DLZ, Vicari MR, Peres WAM, Cestari MM, Artoni R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2009). Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). **Journal of Fish Biology**, 75: 408-421.
- Karanth KP (2006). Out-of-India Gondwanan origin of some tropical Asian biota. **Current Science**, 90:789-792.
- Kidwell MG (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, 115:49–63.
- Kilian A, Wenzl P, Huttner E, Carling J, Xia L, Blois H, Caig V, Heller-Uszynska K, Jaccoud D et. al (2012). Diversity Arrays Technology: A Generic Genome Profiling Technology on Open Platforms. In: Pompanon F, Bonin A (eds.). Data Production and Analysis in Population Genomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. **Springer Science**, New York, v. 888.
- King M (1993). Species Evolution: The Role of Chromosome Change. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK.
- Kottelat M., Whitten T (1996). Freshwater biodiversity in Asia with special reference to fish. **World Bank Technical paper**, v. 343, 59p.
- 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: 276-283.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E (2008). Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. **Genome**, 51:350-356.
- Kulemzina AI, Yang F, Trifonov VA, Ryder OA, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS (2011). Chromosome painting in Tragulidae facilitates the reconstruction of Ruminantia ancestral karyotype. **Chromosome Research**, 19: 531–539.
- Kumar K, Rana RS, Paliwal S (2005). Osteoglossid and lepisosteid fish remains from the Paleocene Palana Formation, Rajasthan, India. **Palaeontology**, 48(6):1187–1209.
- Kumazawa Y, Nishida M. (2000) Molecular phylogeny of osteoglossoids: a new model for gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. **Molecular Biology and Evolution**, 17:1869-1878.

- Kuntner M, Agnarsson I (2011a). Biogeography and diversification of hermit spiders on Indian Ocean islands (Nephilidae: Nephilengys). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 59(2):477-488.
- Kuntner M, Agnarsson I (2011b). Phylogeography of a successful aerial disperser: the golden orb spider *Nephila* on Indian Ocean islands. **BMC Evolutionary Biology**, 11.
- Lambert MR, Skelly DK, Ezaz T (2016). Sex-linked markers in the North American green frog (*Rana clamitans*) developed using DArTseq provide early insight into sex chromosome evolution. **BMC Genomics**, 17:844.
- Lavoué S, Sullivan JP (2004). Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 33:171–185.
- Lavoué S. (2016). Was Gondwanan breakup the cause of the intercontinental distribution of Osteoglossiformes? A time-calibrated phylogenetic test combining molecular, morphological, and paleontological evidence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 99:34–43.
- Le S, Josse J, Husson F (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, 25(1).
- Lee TY, Lawver LA (1995). Cenozoic plate reconstruction of Southeast Asia. **Tectonophysics**, 251, 85–138.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52: 201-220.
- Lévêque C, Oberdorff T, Paugy D, Stiassny, MLJ., Tedesco, PA (2008). Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia** 595:545-567.
- Li GQ, Wilson MVH (1996). Phylogeny of Osteoglossomorpha. In: Stiassny MLJ.; Parenti LR; Johnson GD. (eds.): Interrelationships of Fishes. **Academic**, San Diego, 163-174.
- Li GQ, Wilson MVH (1999). Early divergence of Hiodontiformes sensu stricto in East Asia and phylogeny of some Late Mesozoic teleost from China. In: Arratia G, Schultze HP (eds) Mesozoic Fishes 2 – Systematics and Fossil Record. **Dr F. Pfeil**, Munich, 369-384.
- Libertini A, Vitturi R, Lannino A, Maone MC, Franzoi P, et al. (2006): Fish mapping of 18S rDNA and (TTAGGG)_n sequences in two pipefish species (Gasterosteiformes: Syngnathidae). **Journal of Genetics**, 85: 153–156.
- Lim KY, Kovařík A, Matyášek R, Chase MW, Clarkson JJ, Grandbastien MA, Leitch AR (2007). Sequence of events leading to near-complete genome turnover in allopolyploid *Nicotiana* within five million years. **New Phytologist.**, 175: 756-763.
- Liu Z (2007). Aquaculture Genoma technologies. Blackwell Publishing, Iowa, 584p.
- López-Flores I, Garrido-Ramos MA (2012). The Repetitive DNA content of Eukaryotic Genomes, In: Genome Dynamics Repetitive DNA, Garrido-Ramos MA (Ed), **Karger**, Basel, SU, pp. 1-28.
- Lundberg JG (1993). African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. In: Goldblatt, P.(Eds). Biological relationships between Africa and South America. **Yale University Press**, New Haven, Connecticut, p. 156-199.

- Macey JR, Schulte II JA, Larson A, Ananjeva NB, Wang Y, Pethiyagoda R, Rastegar-Pouyani N, Papenfuss TJ (2000). Evaluating trans-Tethys migration: an example using acrodont lizard phylogenetics. **Systematic Biology**, 49: 233–256.
- Machado TC, Pansonato-Alves JC, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Oliveira C, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Artoni RF, Vicari MR (2011). Chromosomal painting and ZW sex chromosomes differentiation in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **BMC Genetics**, 12:65.
- Magtoon W, Donsakul T (2004). Morphology and cytogenetics of Arowana fishes in subfamily Osteoglossinae from Asia, Australia and South America. **30th Congress on Science and Technology of Thailand** (9-21 October 2004) Muang Thong Thani, Thailand. p. 62.
- Maisey JG (1996). Discovering Fossil Fishes. **Henry Holt**, New York, 223p.
- Majka J, Majka M, Kwiatek M, Wiśniewska H. (2017) Similarities and differences in the nuclear genome organization within Pooideae species revealed by comparative genomic in situ hybridization (GISH). **Journal of Applied Genetics**. doi:10.1007/s13353-016-0369-y.
- Majtánová Z, Chovela L, Symonová R, Ráb P, Kotusz J, Pekárik L, Janko Karel (2016). Asexual reproduction does not apparently increase the rate of Chromosomal evolution: Karyotype stability in diploid and triploid clonal hybrid fish (Cobitis, Cypriniformes, Teleostei). **PLoS one**, 11(1): e0146872.
- Majtánová Z, Symonová R, Rodrigues LA, Sallan L, Ráb P (2017). "Holostei versus Halecostomi" problem: insight from cytogenetics of ancient non-teleost actinopterygian fish, bowfin *Amia calva*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. **Wiley Periodicals, Inc**, 00:1–9.
- Maneechot N, Yano CF, Bertollo LAC, Getlekha N, Molina WF, Sukhonthip D, et al. (2016). Genomic organization of repetitive DNAs highlights chromosomal evolution in the genus *Clarias* (Clariidae, Siluriformes). **Molecular Cytogenetics**, 9:4.
- Marques DK, Venere PC, Galetti PM Jr (2006). Chromosomal characterization of the bonytongue *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes: Arapaimidae). **Neotropical Ichthyology**, 4:215–218.
- Marquioni V, Bertollo LAC, Diniz D, Cioffi MB (2013). Comparative chromosomal mapping in *Triportheus* fish species. Analysis of synteny between ribosomal genes. **Micron**, 45:129–135.
- Martins C, Galetti Jr PM (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, 7:363–367.
- Martins C; Galetti Jr PM (2001). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes. **Genetica**, 111: 439-446.
- Martins C, Wasko AP (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome, In: Focus on Genome Research, Williams CR (Eds), **Nova Science Publishers**, Hauppauge, pp. 289-318.
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, 127:133–141.
- Martins C (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of the fish genome. In: Pizano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (Eds). Fish Cytogenetics. Enfield: **Science Publishers**, p. 421 -452.

- Martins NF, Bertollo LAC, Troy WP, Feldberg E, Valentin FCS, Cioffi MB (2013). Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): comparative chromosome mapping of repetitive sequences. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**; 23:261-269.
- Masters JC, de Wit MJ, Asher RJ (2006). Reconciling the origins of Africa, India and Madagascar with vertebrate dispersal scenarios. **Folia Primatologica**, 77(6): 399-418.
- Matschiner M, Musilová Z, Barth JMI, Starostová Z, Salzburger W, Steel M, Bouckaert R (2016). Bayesian Node Dating based on Probabilities of Fossil Sampling Supports Trans-Atlantic Dispersal of Cichlid Fishes. **bioRxiv**, not peer reviewed.
- Matsuoka MP, Gharrett AJ, Wilmot RL, Smoker WW (2004). Genetic linkage mapping of allozyme loci in even- and odd-year Pink Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). **Journal of Heredity**, 95(5): 421-429.
- Mayr B, Ráb P, Kalat M (1985). Localization of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Perca fluviatilis* (Pisces, Percidae). **Genetica**, 67:51-56.
- Mazzuchelli J, Kocher TD, Yang F, Martins C (2012). Integrating cytogenetics and genomics in comparative evolutionary studies of cichlid fish. **BMC Genomics**, 13: 463.
- Melville J, Haines ML, Boysen K, Hodkinson L, Kilian A, Date KLS, Potvin DA, Parris MK (2017). Identifying hybridization and admixture using SNPs: application of the DArTseq platform in phylogeographic research on vertebrates. **Royal Society Open Science**, 4:161061.
- Mestriner CA, Galetti PM Jr, Valentini SR, Ruiz IRG, Abel LDS, Moreira-Filho O, Camacho JPM (2000) Structural and functional evidence that a B chromosome in the Characidae fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. **Heredity**, 85:1-9.
- Meyne J, Baker R, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, et al. (1990). Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, 99:3-10.
- Milhomem SSR, Scacchetti PC, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA, Pansonato-Alves JC, O'Brien PCM, Foresti F, Nagamachi CY (2013). Are NORs always located on homeologous chromosomes? A FISH Investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). **PLoS one**, 8(2): e55608.
- Mirande MJ (2017). Combined phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) and the use of morphological characters in large-scale analyses. **Cladistics**, 33: 333-350.
- Mittermeier RA, Myers N, Mittermeier CG (1999). Hotspots: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. **CEMEX**, Mexico City, 431p.
- Molina W (2007). Chromosomal change and stasis in marine fish groups. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (Eds). *Fish Cytogenetics*. **Science Publisher, Inc**, Enfield, USA pp 69-109.
- Molina WF, Galetti PM Jr (2004). Karyotypic changes associated to the dispersive potential on Pomacentridae (Pisces, Perciformes). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 309:109-119.
- Molina WF, Martinez, PA, Bertollo LAC, Bidau CJ (2014a). Evidence for meiotic drive as an explanation for karyotype changes in fishes. **Marine Genomics**, 15: 29-34.
- Molina WF, Martinez PA, Bertollo LAC, Bidau CJ (2014b). Preferential accumulation of sex and Bs chromosomes in biarmed karyotypes by meiotic drive and rates of

- chromosomal changes in fishes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 00, p. 00-00.
- Moraes, RLR, Bertollo LAC, Marinho MMF, Yano CF, Hatanaka T, Barby FF, Troy W, Cioffi MB (2017). Evolutionary Relationships and Cytotaxonomy Considerations in the Genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). **Zebrafish**, in press.
- Motta-Neto CC, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF (2011a). Molecular cytogenetic analysis of Haemulidae fish (Perciformes): Evidence of evolutionary conservation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 407: 97-100.
- Motta-Neto CC, Cioffi MB, Bertollo LAC, Molina WF (2011b). Extensive chromosomal homologies and evidence of karyotypic stasis in Atlantic grunts of the genus *Haemulon* (Perciformes). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 401: 75-79.
- Motta-Neto CC, Lima-Filho PA, Araújo WC, Bertollo LAC, Molina WF (2012). Differentiated evolutionary pathways in Haemulidae (Perciformes): karyotype stasis versus morphological differentiation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 22: 457-465.
- Myers GS (1949). Salt-tolerance of fresh-water fish groups in relation to zoogeographical problems. **Bijdragen tot de Dierkunde**, 28: 315–322.
- Myers N (1997). The Rich Diversity of Biodiversity Issues. In: Reaka-Kudla ML, Wilson DE, Wilson EO (Eds). Biodiversity II: understanding and protecting our biological resources. **Joseph Henry Press**, Washington, D.C., p. 125-138.
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, Souza ACP, Ferguson-Smith MA (2010). Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosome painting. **BMC Genetics**, 11:28.
- Nagamachi CY, Pieczarka JC, Milhomem SSR, O'Brien PCM, Batista JA, Ferguson-Smith MA (2013). Chromosome Painting Reveals Multiple Rearrangements between *Gymnotus capanema* and *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 141:163–168.
- Najman Y (2006). The detrital record of orogenesis: a review of approaches and techniques used in the Himalayan sedimentary basins. **Earth-Science Reviews**, 74:1–72.
- Nanda I, Schlegelmilch K, Haaf T, Scharl M, Schmid M (2008). Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families supports a role for Z dosage in avian sex determination). **Cytogenetic and Genome Research**, 122(2): 150-156.
- Near TJ, Eytan RI, Dornburg A, Kuhn KL, Moore JA, Davis MP, Wainwright PC, Friedman M, Smith WL (2012). Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109(34): 13698-13703.
- Nelson JS (2006). Fishes of the World. **John Willey & Sons Inc**: New York 4th Ed, 624p.
- Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH (2016). Fishes of the World. **John Willey & Sons Inc**: Hoboken, New Jersey. 5th Ed, 752p.
- O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufo S, Haddad D, McVeigh R, et al. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Research**, 44:733-745.

- Oberdorff T, Guegan JF, Hugueny B (1995). Global scale patterns of fish species richness in rivers. **Ecography**, 18 345–352.
- Obermiller LE, Pfeiler E (2003). Phylogenetic relationships of elopomorph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 26:202-214.
- Ocalewicz K (2013). Telomeres in Fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, 141:114-125.
- Ohno S, Atkin NB (1966). Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. **Chromosoma**, 18:455-466.
- Ohno S (1967). Sex chromosomes and sex-linked genes. **Springer-Verlag**, Berlin, Heidelberg, New York, 192p.
- Oliveira EA & Sember A, Bertollo LAC, Yano CF, Ezaz T, Moreira-Filho O, Hatanaka T, Trifonov V, Liehr T, Al-Rikabi ABH, Rab P, Pains H, Cioffi MB: Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: characterizing the unique XX/XY1Y2 system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). **Chromosoma**, <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0648-3>.
- Oliveira EHC, De Moura SP, Dos Anjos LJS, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA (2008). Comparative chromosome painting between chicken and spectacled owl (*Pulsatrix perspicillata*): implications for chromosomal evolution in the Strigidae (Aves, Strigiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, 122: 157–162.
- Oliveira EHC, Tagliarini MM, Rissino JD, Pieczarka JC, Nagamachi CY, O'Brien PC et al. (2010). Reciprocal chromosome painting between white hawk (*Leucopternis albicollis*) and chicken reveals extensive fusions and fissions during karyotype evolution of Accipitridae (Aves, Falconiformes). **Chromosome Research**, 18: 349–355.
- Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida-Toledo LF (2015a). Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts). **CRC Press**, Enfield USA; pp.21–261.
- Ozouf-Costaz C, Coutanceau J-P, Bonillo C, Belkadi L, Fermon Y, Agnès J-F, Guidi-Rontani C, Paugy D (2015b). First insights into karyotype evolution within the family Mormyridae. **Cybium** 39:227-236.
- Pansonato-Alves JC, Serrano EA, Camacho JPM, Utsunomia R, Silva GJC, Oliveira C, Foresti F (2014). Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish of the genus *Characidium*. **PLoS one**, 9(9): e107169.
- Parise-Maltempi PP, Silva EL, Rens W, Dearden F, O'Brien PCM, Trifonov V, Ferguson-Smith MA (2013). Comparative analysis of sex chromosomes in Leporinus species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. **BMC genetics**, 14:60.
- Pazian MF, Shimabukuro-Dias CK, Pansonato-Alves JC, Oliveira C, Foresti F (2013). Chromosome painting of Z and W sex chromosomes in *Characidium* (Characiformes, Crenuchidae). **Genetica**, 141:1–9.
- Peng Z, He S, Wang J, Wang W, Diogo R (2006). Mitochondrial molecular clocks and the origin of the major Otocephalan clades (Pisces: Teleostei): A new insight. **Gene**, 370: 113–124.
- Peng JC, Karpen GH (2008). Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. **Current Opinion in Genetics & Development**, 18(2):204-211.

- Pereira CSA, Ráb P, Collares-Pereira MJ (2013). Chromosomes of Iberian Leuciscinae (Cyprinidae) Revisited: Evidence of Genome Restructuring in Homoploid Hybrids Using Dual-Color FISH and CGH. **Cytogenetic and Genome Research**; 141:143–152.
- Pereira CSA, Aboim MA, Ráb P, Collares-Pereira MJ (2014). Introgressive hybridization as a promoter of genome reshuffling in natural homoploid fish hybrids (Cyprinidae, Leuciscinae). **Heredity**, 112:343–350.
- Phillips RB, Konkol NR, Reed KM, Stein JD (2001). Chromosome pairing supports lack of homology among sex chromosome in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae). **Genetica**, 111: 119-123.
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 83: 2934 – 2938.
- Plohl M, Luchetti A, Meštrović N, Mantovani B (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**, 409:72–82.
- Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Kasai F, Trifonov VA, O'Brien PC, Caputo V, Olmo E, Ferguson-Smith MA, Rens W (2011). Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence. **Chromosoma**, 120(5):455-468.
- Potter S, Bragg JG, Blom MPK, Deakin JE, Kirkpatrick M, Eldridge MDB, Moritz C (2017). Chromosomal Speciation in the Genomics Era: Disentangling Phylogenetic Evolution of Rock-wallabies. **Frontiers in Genetics**, 8:10.
- Ráb, P, Rábová M, Pereira CS, Collares-Pereira MJ, Pelikánová S (2008). Chromosome studies of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker – the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species painting. **Chromosome Research**, 16: 863-873.
- Ráb P, Yano CF, Lavoué S, Jegede OI, Bertollo LAC, Ezaz T, Majtánová Z, de Oliveira EA, Cioffi MB (2016). Karyotype and Mapping of Repetitive DNAs in the African Butterfly Fish *Pantodon buchholzi*, the Sole Species of the Family Pantodontidae. **Cytogenetic and Genome Research**, 149:312-320.
- Rage JC (2003). Relationships of the Malagasy fauna during the Late Cretaceous: Northern or Southern routes? **Acta Palaeontologica Polonica**, 48(4):661-662.
- Rambaut A, Drummond A (2010). FigTree v1. 3.1. **Institute of Evolutionary Biology**, University of Edinburgh.
- Rampin M, Bi K, Bogart JP, Collares-Pereira MJ (2012). Identifying parental chromosomes and genomic rearrangements in animal hybrid complexes of species with small genome size using Genomic In Situ Hybridization (GISH). **Comparative cytogenetics**, 6(3): 287-300.
- Rainboth WJ. (1996). Fishes of the Cambodian Mekong. FAO Species **Identification Field Guides**, Rome, 322p.
- Rebordinos L, Cross I, Merlo A (2013). High Evolutionary Dynamism in 5S rDNA of Fish: State of the Art. **Cytogenetic and Genome Research**, 141:103–113.
- Resende MDV, Resende Jr MFR, Sansaloni CP, Petrolí CD, Missiaggia AA, Aguiar AM, Abad JM, Takahashi EK, Rosado AM, Faria DA, Pappas Jr GJ, Kilian A, Grattapaglia D (2012). Genomic selection for growth and wood quality in *Eucalyptus*: capturing the missing heritability and accelerating breeding for complex traits in forest trees. **New Phytologist**, 194:116–128.

- Ribeiro JM, Alarcon-Chaidez F, Francischetti IM, Mans BJ, Mather TN, Valenzuela JG, et al. (2006). An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 36(2):1111-1111
- Roberts TR (1992). Systematic revision of the old world freshwater fish family Notopteridae. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, 2:361-383.
- Roberts TR (2012). *Scleropages inscriptus*, a new fish species from the Tananthayi or Tenasserim River basin, Malay Peninsula of Myanmar (Osteoglossidae: Osteoglossiformes). **International Journal of Ichthyology**, 18:113-118.
- Rögl F (1998). Palaeogeographic considerations for Mediterranean and Paratethys seaways (Oligocene to Miocene). **Annals of the Natal government museum**. Wien, 99(A):279–310.
- Ronquist, F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, 61(3): 539-542.
- Rosa R, Rubert M, Caetano-Filho M, Giuliano-Caetano L (2009). Conserved Cytogenetic Features in the Amazonian Arapaima, *Arapaima gigas* (Schinz 1822) from Jamari River, Rondônia–Brazil. **The Open Biology Journal**, 2:91-94.
- Rossi AR, Gornung E, Sola L, Nirchio M (2005). Comparative molecular cytogenetic analysis of two congeneric species, *Mugil curema* and *M. Liza* (Pisces, Mugiliformes), characterized by significant karyotype diversity. **Genetica**, 125:27–32.
- Sakai C, Konno F, Nakano O, et al. (2007). Chromosome elimination in the interspecific hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. hubbsi*. **Chromosome Research**, 15:697–709.
- Sallan LC (2014): Major issues in the origins of ray-finned fish (Actinopterygii) biodiversity. **Biological Reviews**, 89:950–971.
- Salvadori S, Deiana A, Coluccia E, Florida G, Rossi E, Zuffardi O (1995). Colocalization of (TTAGGG)_n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. **Chromosome Research**, 3:54–58.
- Sambrook J, Russel DW (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York.
- Sampaio TR, Gouveia JG, da Silva CRM, Dias AL, da Rosa R. (2015). Molecular analysis of the B microchromosomes in *Steindachnerina insculpita* (Characiformes: Curimatidae) by microdissection. **Cytogenetic and Genome Research**, 146(1): 51–57.
- Sánchez-Sevilla JF, Horvath A, Botella MA, Gaston A, Folta K, Kilian A, Denoyes B, Amaya I (2015). Diversity Arrays Technology (DArT) Marker Platforms for Diversity Analysis and Linkage Mapping in a Complex Crop, the Octoploid Cultivated Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). **PLoS one**, 10(12): e0144960.
- Sanders M (1934). Die fossilen Fische der Alttertiären Süßwasser-ablagerungen aus Mittel-Sumatra. **Verhandelingen van het geologisch-mijnbouwkundig genootschap voor Nederland em Kolonien**, 11, 1–143.
- Scacchetti PC, Utsunomia R, Pansonato-Alves JC, da Costa Silva GJ, Vicari MR, Artoni RF, Oliveira C, Foresti F (2015). Repetitive DNA Sequences and Evolution of ZZ/ZW Sex Chromosomes in *Characidium* (Teleostei: Characiformes). **PLoS one**; 10(9): e0137231.

- Schatz, GE (1996). Malagasy/Indo-australo-malesian phytogeographic connections. In: Lourenço W (Eds). *Biogéographie de Madagascar*. **ORSTOM**, Paris.
- Scherthan H, Cremer T, Arnason U, Weier HU, Lima-de-Faria A, Froenicke L (1994). Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. **Nature Genetics**; 6:342–347.
- Schmid, M (1980). Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC- and AT- rich chromosome regions in Anura. **Chromosoma**, 77:83-103.
- Schmid M, Guttenbach M (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. **Chromosoma**, 97:101–114.
- Schubert I, Schriever-Schwemmer G, Werner T, Adler ID (1992). Telomeric signals in Robertsonian fusion and fission chromosomes: implications for the origin of pseudoaneuploidy. **Cytogenetic and Genome Research**, 59:6–9.
- Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard H (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. **Science**, 294:109-115.
- Scotese CR, (2014a). Atlas of Early Cretaceous Paleogeographic Maps, PALEOMAP Atlas for ArcGIS, vol. 2. The Cretaceous, Maps 23–31, Mollweide Projection, **PALEOMAP Project**, Evanston, IL.
- Scotese CR. (2014b). Atlas of Late Cretaceous Paleogeographic Maps, PALEOMAP Atlas for ArcGIS, vol. 2. The Cretaceous, Maps 16–22, Mollweide Projection, **PALEOMAP Project**, Evanston, IL.
- Scudeler PES, Diniz D, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F (2015). Whole chromosome painting of B chromosomes of the red-eye tetra *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **Comparative Cytogenetics**, 9(4):661-669.
- Shen XY, Kwan HY, Thevasagayam NM, Prakki SRS, Kuznetsova IS, Ngoh SY, Lim Z, Feng F, Chang A, Orbán L (2014). The first transcriptome and genetic linkage map for Asian arowana. **Molecular Ecology Resources**, 14:622-635.
- Skinner BM, Griffin DK (2012). Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: evidence for regions prone to breakpoints. **Heredity**, 108(1): 37-41.
- Silawong K, Aoki S, Supiwong W, Tanomtong A, Khakhong S, Sanoamuang L (2012). The First Chromosomal Characteristics of Nucleolar Organizer Regions (NORs) in Grey Featherback Fish, *Notopterus notopterus* (Osteoglossiformes, Notopteridae) by Conventional and Ag-NOR Staining Techniques. **Cytologia**, 77:279-285.
- Silva DMZA, Daniel SN, Camacho JPMC, Utsunomia R, Ruiz-Ruano FJ, Penitente M, Pansonato-Alves JC, Hashimoto DT, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F (2016). Origin of B chromosomes in the genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) and the limits of chromosome painting. **Molecular Genetics and Genomics**, 291: 1407–1418.
- Slijepcevic P (1998). Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusions. **Chromosoma** 107:136–140.
- Smith WL, Chakrabarty P, Sparks JS (2008). Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). **Cladistics**, 24:625–641.
- Soares RX, Cioffi MB, Bertollo LAC, Borges AT, Costa GWWF, Molina WF (2017). Chromosomal evolution in large pelagic oceanic apex predators, the barracudas (Sphyraenidae, Percomorpha). **Genetics and Molecular Research**, 16(2): gmr16029644.
- Sparks JS, Smith WL (2005). Freshwater Fishes, Dispersal Ability, and Nonevidence: “Gondwana Life Rafts” to the Rescue. **Systematic Biology**, 54(1):158–165.

- Sotero-Caio CG, Platt RN, Suh A, Ray DA (2017). Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes. **Genome Biology and Evolution**, 9(1):161-177.
- Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, 75:304-306.
- Supiwong W, Tanomtong A, Khakhong S, Silawong K, Aoki S, Sanoamuang L (2012). The First Chromosomal Characteristics of Nucleolar Organizer Regions and Karyological Analysis of Clown Knife Fish, *Chitala ornate* (Osteoglossiformes, Notopteridae) by T-Lymphocyte Cell Culture. **Cytologia**, 77:393–399.
- Steane DA, Nicolle D, Sansaloni CP, Petroli CD, Carling J, Kilian A, Myburg AA, Grattapaglia D, Vaillancourt RE (2011). Population genetic analysis and phylogeny reconstruction in *Eucalyptus* (Myrtaceae) using high-throughput, genome-wide genotyping. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 59:206–224.
- Steenis CGGJ van (1962). The land-bridge theory in botany. **Blumea**, 11:235-372.
- Stewart DJ (2013). A New Species of *Arapaima* (Osteoglossomorpha: Osteoglossidae) from the Solimões River, Amazonas State, Brazil. **Copeia**, 3:470–476.
- Suzuki A, Taki Y, Urushido T (1982). Karyotypes of two species of arowana, *Osteoglossum bicirrhosum* and *O. ferreirai*. **Japanese Journal of Ichthyology**, 29:220–222.
- Suzuki R, Shimodaira H (2006). Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. **Bioinformatics**, 22(12):1540540h.
- Symonová R, Flajšhans M, Sember A, Havelka M, Gela D, Kořínková T, Rodina M, Rábová M, Ráb P (2013). Molecular Cytogenetics in artificial hybrid and highly polyploid sturgeons: An evolutionary story narrated by repetitive sequences. **Cytogenetic and Genome Research**, DOI: 10.1159/000354882.
- Symonová R, Sember A, Majtánová Z, Ráb P (2015). Characterization of Fish Genomes by GISH and CGH, In: Fish Cytogenetic Techniques. Ray-Fin Fishes and Chondrichthyans, Ozouf-Costaz C, Pisano E, Foresti F, Almeida Toledo LF (Eds), **CCR Press**, Boca Raton, pp 118 -131.
- Symonová R, Majtánová Z, Arias-Rodriguez L, Mořkovský L, Kořínková T, Cavin L, Pokorná MJ, Doležalková M, Flajšhans M, Normandeau E, Ráb P, Meyer A, Bernatchez L (2017). Genome compositional organization in gars shows more similarities to mammals than to other ray-finned fish. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, XXB:1–13.
- Tagliarini MM, O'Brien P, Ferguson-Smith MA, de Oliveira EH (2011). Maintenance of syntenic groups between Cathartidae and *Gallus gallus* indicates symplesiomorphic karyotypes in new world vultures. **Genetics and Molecular Biology**, 34: 80–83.
- Tautz D, Renz M (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**; 12:4127–4138.
- Taverne L, Maisey JG (1999). A Notopterid Skull (Teleostei, Osteoglossomorpha) from the Continental Early Cretaceous of Southern Morocco. **American Museum Novitates**, 3260: 1-12.
- Terencio ML, Schneider CH, Gross MC, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Vicari MR, Feldberg E (2012). Repetitive sequences promote W chromosome evolution in prochilodontid fish. **Genetica**, 140: 505–512.

- Tigano C, Rocco L, Ferrito V (2004). Chromosomal Mapping and Molecular Characterization of Ribosomal RNA Genes in *Lebias fasciata* (Teleostei, Cyprinodontidae). **Genetica**, 121, 95.
- Traut T, Winking H (2001). Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: zebrafish, platyfish and guppy. **Chromosome Research**, 9: 659-672.
- Urushido T, Takahashi E, Taki Y (1975). Karyotypes of three species of fishes in the order Osteoglossiformes. **Chromosome Information Service**, 18:20-22.
- Utsunomia R, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Araya-Jaime C, et al. (2016). Uncovering the Ancestry of B Chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PLoS one**, 11(3): e0150573.
- Uyeno T (1973). A comparative study of chromosomes in the teleostean fish order Osteoglossiformes. **Japanese Journal of Ichthyology**, 20:211-217.
- Valente TV, Schneider CH, Gross MC, Feldberg E, Martins C (2009). Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Research**, 17: 791-799.
- Vences M, Freyhof J, Sonnenberg R, Kosuch J, Veith M (2001). Reconciling fossils and molecules: Cenozoic divergence of cichlid fishes and the biogeography of Madagascar. **Journal of Biogeography**, 28:1091-1099.
- Venkatesh B (2003). Evolution and diversity of fish genomes. **Current Opinion in Genetics & Development**, 13:588-592.
- Vicari MR, Pistune HFM, Castro JP, Almeida MC, Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Camacho JPM, Artoni RF (2011). New insights on the origin of B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* obtained by chromosome painting and FISH. **Genetica**, 139:1073-1081.
- Widhayanon C (2005). Thailand Red Data: Fishes. **Office of Nature Resources and Environmental Policy and Planning**, Bangkok, Thailand. 108p.
- Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, 34:275–305.
- White MJD (1978). Modes of Speciation. **W. H. Freeman**, San Francisco, CA.
- Wienberg J, Jauch A, Stanyon R, Cremer T (1990). Molecular cytotaxonomy of primates by chromosomal in situ suppression hybridization. **Genomics**, 8:347-350.
- Wilson MVH, Murray AM. (2008). Osteoglossomorpha: phylogeny, biogeography, and fossil record and the significance of key African and Chinese fossil taxa. In: Cavin L, Longbottom A, Richter M. (eds). Fishes and the Break-up of Pangaea. **Geological Society**, London, Special Publications, 295, 185–219.
- WWF (2008). First contact in the greater Mekong. Vietnam: WWF Greater Mekong.
- Yano CF, Bertollo LAC, Ezaz T, Trifonov V, Sember A, Liehr T, Cioffi MB (2016). Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae). **Heredity**, 1–8.
- Yano CF, Bertollo LAC, Ezaz T, Trifonov V, Sember A, Liehr T, Cioffi MB (2017). Highly conserved Z and W chromosomes diverged molecularly in the fish genus *Triportheus* (Characiformes, Triporthidae). **Heredity**, in press.
- Yang F, Trifonov V, Ng BL, Kosyakova N, Carter NP (2009). Generation of paint probes by flow-sorted and microdissected chromosomes, In: Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) –Application Guide, Liehr T (Ed), **Springer**, Berlin, pp. 35-52.

- Yoder AD, Nowak MD (2006). Has Vicariance or Dispersal Been the Predominant Biogeographic Force in Madagascar? Only Time Will Tell. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 37:405–31
- Zhang J, Zhang YP, Rosenberg HF (2002). Adaptive evolution of a duplicated pancreatic ribonuclease gene in a leaf-eating monkey. **Nature Genetics**, 30:411-415.
- Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD, Islam-Faridi MH, Stelly DM, Wing RA, et al. (1997). A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. **Genome**, 40:138-142.