



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**PROCESSOS CARIOEVOLUTIVOS NA ORDEM TETRAODONTIFORMES:
UMA VISÃO ATRAVÉS DE SUAS DIFERENTES LINHAGENS**



Pablo Ariel Martinez

NATAL-RN
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biociências

Martinez, Pablo Ariel.

Processos carioevolutivos na Ordem Tetraodontiformes: uma visão através de suas diferentes linhagens / Pablo Ariel Martinez. – Natal, RN, 2010.

X, 98 f.

Orientador: Wagner Franco Molina.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ecologia.

1. Tetraodontiformes – Dissertação 2. Cromossomos – Dissertação. 3. Citogenética de peixes – Dissertação. I. Molina, Wagner Franco. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 597.556.37



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**Processos carioevolutivos na Ordem Tetraodontiformes:
Uma visão através de suas diferentes linhagens**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Bolsista CNPq: Pablo Ariel Martinez

Orientador: Dr. Wagner Franco Molina - UFRN

NATAL-RN

2010

A minha família e amigos

*“Mais importante que a inteligência
é a imaginação”
(Albert Einstein)*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível graças à participação das seguintes pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente:

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia (PPE) pelo suporte e as oportunidades oferecidas e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

A meu orientador Wagner Molina, por ter fornecido a oportunidade de desenvolver este e outros projetos, pelo apoio, experiência transmitida, paciência e confiança nestes dois anos de trabalho.

Aos professores: Dr. Carlos Blaha, Dra. Débora Diniz e Dr. Rafael Noletto pela importante participação na correção desta dissertação.

Ao Dr. Claudio Bidau pela ajuda, colaboração e predisposição no transcurso do trabalho.

Ao Dr. Garcia Jr. pela ajuda constante na identificação das espécies e sua boa predisposição para colaborar em tudo momento.

A Luis Gustavo Souza e Dr. Marcelo Guerra pela sua ajuda na realização de DAPI, CMA₃ e FISH.

A SECIRM pelo apoio outorgado para realizar as viagens ao Arquipélago São Pedro e São Paulo.

A todos os companheiros do Laboratório de Genética de Recursos Marinhos pela convivência, por ter ajudado nas coletas, transporte do material e processamento.

Aos meus colegas da turma de Ecologia.

A meus novos amigos de Natal, companheiros de saídas, cervejas, cachaças e qualquer outro acompanhante de distração, Uedson, Leo, Washington, Lucas, Pan, Fernanda, Pablo, Marianela, Gretel e Layse.

A Mario Ledesma por ter fornecido a oportunidade de começar a trabalhar na Citogenética.

A meus pais, Luisa e Edgardo, por sempre deixarem e apostarem para eu seguir no caminho científico e ajudando-me incondicionalmente em tudo o que precisasse.

A meus irmãos, Christian e Carolina pela amizade incondicional.

A meus amigos da Argentina.

SUMARIO

LISTAS DE FIGURAS	v
LISTAS DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Diversidade e filogenia dos Tetraodontiformes	1
1.2 Aspectos biológicos das famílias Ostraciidae, Balistidae, Monacanthidae e Tetraodontidae	2
1.3 Dados citogenéticos e genômicos dos Tetraodontiformes	5
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Material	10
3.1.1 Localidades de coleta, obtenção do material e acondicionamento	10
3.2 Métodos	12
3.2.1 Técnicas de estimulação mitótica e sacrifício dos indivíduos	12
3.2.2 Técnica de obtenção de cromossomos mitóticos	12
3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)	13
3.2.4 Detecção de Heterocromatina (Banda-C)	13
3.2.5 Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH) – FISH com sonda rDNA 18S e <i>double</i> FISH com sonda 18S e 5S	13
3.2.6 Digestão com enzimas de restrição	14
3.2.7 Coloração com fluorocromos base específico DAPI e CMA ₃	15
3.2.8 Análises cromossômicas	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Citogenética comparativa e padrões heterocromáticos em duas espécies do gênero <i>Acanthostracion</i> (Ostraciidae: Tetraodontiformes)	17
4.2 Evidências de relacionamento filogenético entre as famílias Balistidae e Monacanthidae (Tetraodontiformes) através de análises citogenéticas	36
4.3 Sítios ribossomais simples, condição plesiomórfica na diversificada família Tetraodontidae (Osteichthyes, Tetraodontiformes)	50
4.4 Polimorfismo de heterocromatina, RONs múltiplas e cromossomos Bs em <i>Canthigaster figueiredoi</i> (Tetraodontiformes)	66
5. CONCLUSÕES	84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Variação de tamanho dos genomas em diferentes famílias de Tetraodontiformes projetados sobre a hipótese filogenética a partir de caracteres morfológicos de Wintterbotton (1974). Tomado de Brainerd *et al.* (2001). **8**
- Figura 2. Pontos de coleta dos indivíduos no litoral de Natal (RN), Tibau do Sul (RN), Barra de Cunhau (RN), Salvador (BA) e Arquipélago São Pedro São Paulo. **10**
- Figura 3. Exemplares das espécies utilizadas no presente estudo: **a.** *Acanthostracion polygonius* (Ostraciidae), **b.** *Acanthostracion quadricornis* (Ostraciidae), **c.** *Melichthys niger* (Balistidae), **d.** *Cantherhines macrocerus* (Monacanthidae), **e.** *Cantherhines pullus* (Monacanthidae), **f.** *Lagocephalus laevigatus* (Tetraodontidae), **g.** *Colomesus psittacus* (Tetraodontidae), **h.** *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontidae). **11**

CAPITULO I

- Figura 1. Espécimes representativos de *Acanthostracion polygonius* (a) e *A. quadricornis* (b). Barra=1cm. **23**
- Figura 2. Cariótipos de *A. polygonius* (a, c, e) e *A. quadricornis* (b, d, f) a partir de coloração convencional (a, b). Em destaque se observam as regiões organizadoras nucleolares. Bandamento C (c, d), FISH 18S (verde) e 5S rDNA (vermelha) (e, f). Barra=5µm. **24**
- Figura 3. Tratamento com dupla coloração DAPI-CMA₃ (a, b), enzimas de restrição *AluI* (c, d), *TaqI* (e, f), *HinfI* (g, h), *EcoRI* (i, j) e *PstI* (k, l) de *A. polygonius* e *A. quadricornis* respectivamente. Barra=5µm. **25**

CAPITULO II

- Figura 1. Cariótipos de *Melichthys Níger* a partir de coloração convencional (a) e bandamento C (b). Em destaque o par organizador nucleolar (2º) corado com impregnação argêntea, FISH com sonda rDNA 18S, CMA₃ e DAPI; (b) Bandamento C. Barra=5µm. **40**
- Figura 2. Cariótipos de *Cantherhines macrocerus* a partir de coloração convencional (a) e bandamento C (b). Em destaque o para organizador nucleolar (7º par). Barra=5µm. **41**
- Figura 3. Cariótipo de *Cantherhines pullus* a partir de coloração convencional (a) e bandamento C (b). Em destaque o par organizador nucleolar (5º) corado com impregnação argêntea, FISH com sonda de rDNA 18S, DAPI e CMA₃. Barra=5µm. **41**

CAPITULO III

- Figura 1. Cariotipo de *Lagocephalus laevigatus* a partir de coloração convencional (a) e bandamento C (b). Em destaque se observam as regiões organizadoras nucleolares. Barra=5µm. **55**
- Figura 2. Cariotipo de *Colomesus psittacuss* a partir de coloração convencional (a) e bandamento C (b). Em destaque se observam as regiões organizadoras nucleolares. Barra=5µm. **56**

Figura 3. Filogenia baseada na árvore de Maximum likelihood de Alfaro *et al.* 57
(2007) combinado com os dados citogenéticos.

CAPITULO IV

Figura 1. Cariótipo de fêmea a partir de coloração convencional de *Canthigaster* 71
figueiredoi, $2n=36$. Em destaque os pares organizadores nucleolares. Barra=5 μ m.

Figura 2. Cariótipo a partir de hibridação *in situ* com sonda rDNA 18S de 71
Canthigaster figueiredoi. Barra=5 μ m.

Figura 3. Cariótipo de uma fêmea a partir da banda C de *Canthigaster* 72
figueiredoi. Barra=5 μ m.

Figura 4. Cariótipo a partir de dupla coloração DAPI/CMA₃ de uma fêmea, 72
evidenciando o polimorfismo heterocromático. Em destaque o sexto par homozigota para o polimorfismo heterocromático. Barra=5 μ m.

Figura 5. Metáfases de *C. figueiredoi*. As setas indicam os cromossomos Bs. 73
(a) metáfase com um cromossomo Bs, (b) presença de dois cromossomos Bs heteromórficos, (c) metáfase exibindo três cromossomos Bs heteromórficos, (d). Bandamento C exibindo o padrão heterocromático observado para o cromossomo Bs. Barra=5 μ m.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Padrões de resposta comuns dos cromossomos de *A. polygonius* e *A. quadricornis* ao bandamento C e a digestão a diferentes enzimas de restrição. **26**

CAPITULO II

Tabela 1. Dados cariotípicos disponíveis para as famílias Balistidae e Monacanthidae. **42**

LISTA DE ABREVIATURAS

AT: Adenina-Timina.

CMA₃: Cromomicina A3.

DAPI: 4'6-diamidino-2-fenilindol.

dATP: desoxi Trisfosfato de Adenosina.

DNA: Ácido Desoxirribonucléico.

ET: Elementos de transposição.

FISH: Hibridação fluorescente *in situ*.

FITC: Fluoresceína isotil cianato-avidina conjugada.

GC: Guanina-Citocina.

HC: Heterocromatina constitutiva.

NF: Número fundamental.

NFDM: Leite em pó desnatada.

PBS: Buffer fosfato salino.

Rb: Robertsonianas

rDNA: Ácido Desoxirribonucléico ribossômico.

RNA: Ácido ribonucléico.

RONs: Regiões Organizadoras de Nucléolos.

SSC: Solução Salina Concentrada.

RESUMO

Frente à grande diversidade de peixes, a Ordem Tetraodontiformes se destaca por exibir características genéticas e morfológicas bastantes singulares. Os peixes desta Ordem apresentam um DNA compacto o que favorece estudos moleculares, assim como comparações com espécies mais basais. Modelo de evolução genômica, ainda existem várias lacunas de conhecimento sobre seus padrões cromossômicos e como os rearranjos evolutivos influenciaram na marcante variação no conteúdo de DNA desta Ordem. Diante disto o presente estudo apresenta análises citogenéticas das espécies, *Acanthostracion quadricornis* (Ostraciidae), *A. polygonius* (Ostraciidae), *Melichthys niger* (Balistidae), *Cantherhines macrocerus* (Monacanthidae), *C. pullus* (Monacanthidae), *Lagocephalus laevigatus*, *Colomesus psittacus* e *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontidae) visando contribuir com mais dados citogenéticos para o grupo. As análises foram realizadas através do bandamento C, Ag-RONs, coloração com fluorocromos base-específicos DAPI-CMA₃, enzimas de restrição *AluI*, *EcoRI*, *TaqI*, *PstI* e *HinfI* e pela hibridação *in situ* com sondas de DNA ribossomal 18S e 5S. A ultra-estrutura heterocromatínica de *A. quadricornis* e *A. polygonius*, revelaram um marcante conteúdo heterocromático, situação que pode indicar que o acúmulo ou perda de extenso conteúdo de heterocromatinas poderiam ser responsáveis pelas extensas variações no conteúdo genômico exibidas nas diferentes famílias dos Tetraodontiformes. As espécies *Cantherhines macrocerus*, *C. pullus* (Monacanthidae) e *Melichthys niger* (Balistidae) apresentam uma grande similaridade cariotípica, tanto numérica, como estruturalmente. *Lagocephalus laevigatus* mostrou características citogenéticas similares (2n=44 e RONS simples) as espécies do gênero *Takifugu*, o que reforça a idéia de seu relacionamento filogenético, e *Colomesus psittacus* apresentou o maior número diplóide descrito para a família (2n=56) e grande quantidade de HC, características que o relacionariam com a família irmã Diodontidae. Análises citogenéticas em *C. figueiredoi* revelaram polimorfismos heterocromáticos, RONS múltiplas e cromossomos Bs, sendo estes eventos raros para peixes marinhos, estando possivelmente associados à marcante reestruturação e redução genômica que esta família sofreu. Estas características, somadas aos dados morfológicos e moleculares sugerem que estas espécies compartilham de um mesmo ramo ancestral, com possível origem monofilética. Neste trabalho novas contribuições ao conhecimento dos padrões evolutivos enfrentados pelos Tetraodontiformes são fornecidas e discutidas sob perspectivas citotaxônicas, genômicas e evolutivas.

Palavras chaves: Tetraodontiformes, citogenética de peixes, cromossomos Bs, heterocromatina, evolução cromossômica, tamanho genômico.

ABSTRACT

Given the great diversity of fishes, the Order Tetraodontiformes stands to show genetic and morphological characteristics enough singular. The fishes of this order have a compact DNA which favors molecular studies, as well as comparisons with more basal species. Model of genome evolution, there are still many gaps in knowledge about their chromosomal patterns and how evolutionary rearrangements influence the marked variation in DNA content of this order. In view of this, we present cytogenetic analyzes of the species *Acanthostracion quadricornis* (Ostraciidae), *A. polygonius* (Ostraciidae) *Melichthys niger* (Balistidae) *Cantherhines macrocerus* (Monacanthidae) and *C. pullus* (Monacanthidae), *Lagocephalus laevigatus*, *Colomesus psittacus* and *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontidae), to contribute with cytogenetic data for this group. The analysis was performed by C-banding, Ag-RONs, coloring with base-specific fluorochromes DAPI-CMA₃, restriction enzymes *AluI*, *EcoRI*, *TaqI*, *PstI* and *Hinfl* and *in situ* hybridization with probes for ribosomal DNA 18S and 5S. The heterochromatic ultrastructure of *A. quadricornis* and *A. polygonius* revealed a outstanding heterochromatin content, which may indicate that the accumulation or loss of extensive heterochromatin content could be responsible for large variations in genomic content displayed in different Tetraodontiformes families. The species *Cantherhines macrocerus*, *C. pullus* (Monacanthidae) and *Melichthys niger* (Balistidae) shows a huge karyotypic similarity both numerically and structural. *L. laevigatus* showed similar cytogenetic features ($2n = 44$ and single RONS) to the species of the genus *Takifugu*, which reinforces the idea of their phylogenetic relationships. *C. psittacus* presented the highest diploid number described for the family ($2n = 56$) and large amount of HC, features that related with its sister family Diodontidae. Cytogenetic analysis in *C. figueiredoi* revealed heterochromatic polymorphisms, RONS multiple and Bs chromosomes. These events are rare in marine fishes, and are possibly associated with the strong restructuring and genomic reduction that this family has been suffered. These features, plus the morphological and molecular data suggests that these species share the same ancestral branch, with a possible monophyletic origin. In this study, new contributions to the knowledge of evolutionary patterns facing by Tetraodontiformes are provided and discussed under cytotaxonomy, genomic and evolutionary perspectives.

Keys words: Tetraodontiformes, fish cytogenetics, chromosome Bs, heterochromatin, chromosomal evolution, genome size.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diversidade e filogenia dos Tetraodontiformes

Frente à grande diversidade de peixes, a Ordem Tetraodontiformes se destaca por exibir características genéticas e morfológicas bastantes singulares. Seus representantes são conhecidos vulgarmente como peixes-porcos, baiacus, peixes-cofres ou cangulos, constituindo um dos principais ramos da diversificação dos teleósteos (Nelson, 2006).

Em termos de diversidade constitui uma Ordem pequena com aproximadamente 350 espécies, 101 gêneros, distribuídos, segundo Tyler (1980), em 10 famílias (Tricanthodidae, Triacanthidae, Balistidae, Monacanthidae, Ostraciidae, Aracanidae, Triodontidae, Tetraodontidae, Diodontidae e Molidae), de ampla distribuição circuntropical, ocupando águas tropicais e temperadas, marinhas e doces (Leis, 1984).

Vários aspectos da biologia evolutiva dos Tetraodontiformes são notáveis, como a marcante diversidade de tamanho, pesando desde poucos gramas (o baiacu, *Carinotetraodon travancoricus*) até 2.000 kg (o peixe lua, *Mola mola*) e diversas defesas mecânicas (Brainerd, 1984; Wainwright *et al.*, 1995; Brainerd & Patek, 1998), como mecanismos de inflação do corpo, placas ósseas ou espinhos cutâneos. A evolução esquelética neste grupo reflete uma forte tendência à redução, simplificação e/ou perda de elementos do esqueleto (Tyler, 1980; Santini & Tyler, 2003, 2004). Este grau de diversificação morfológica é especialmente chamativo, já que possuem um número relativamente pequeno de espécies na Ordem, com a maioria das famílias exibindo menos de 25 espécies. Apenas duas famílias um elevado número de espécies, Monacanthidae com 100 espécies e Tetraodontidae com 125 espécies (Nelson, 2006).

Das 10 famílias desta Ordem, as famílias Balistidae, Monacanthidae, Ostraciidae, Tetraodontidae e Diodontidae contêm uma grande proporção de espécies que se encontram normalmente em recifes de corais de zonas tropicais pouco profundas ou águas temperadas – cálidas. A família Triacanthidae habita ambientes costeiros tropicais, mas geralmente são

encontrados em zonas profundas dos oceanos (Tyler, 1968). Aracaniidae localizam-se em águas profundas do Pacífico ocidental, e nas águas temperadas da costa do sul da Austrália. As famílias Triacanthodidae (morfologicamente primitiva), Triodontidae e Molidae também se encontram em águas profundas. A presença de famílias associadas predominantemente a recifes e outras a regiões profundas dos oceanos, o converte num grupo ideal para examinar a influência de um dos ecossistemas mais representativos do planeta na diversificação dos teleósteos (Alvaro *et. al.*, 2007).

Atualmente existe um consenso da origem monofilética do grupo, baseado em peculiaridades morfológicas (Tyler, 1980), e em análises filogenéticas utilizando marcadores moleculares (Holcroft, 2004). Com relação ao parentesco dos Tetraodontiformes com as demais Ordens de peixes, acredita-se na proposição deles serem um grupo irmão dos Acanthuroidea, uma subordem dos Perciformes (Tyler, 1980; Nelson, 2006; Holcroft, 2004).

Várias hipóteses foram apresentadas para a filogenia das famílias dos Tetraodontiformes, demonstrando que as relações basais ainda são pouco claras, sugerindo-se recentemente que existiu uma diversificação ecológica basal dentro da Ordem, uma vez que parece existir uma maior proximidade filogenética entre os membros que vivem em habitat similares (Yamanoue *et al.*, 2008).

1.2 Aspectos biológicos das famílias Ostraciidae, Balistidae, Monacanthidae e Tetraodontidae

As espécies da família Ostraciidae, são também conhecidos como “peixes cofres”, apresentam um corpo encerrado numa separação óssea, sem esqueleto pélvico, sem nadadeiras dorsal e anal, a mandíbula superior não é protrátil e normalmente apresentam 18 vértebras. O comprimento máximo de algumas espécies pode alcançar 60cm. Alguns peixes cofres descarregam uma substância tóxica, chamada ostracitoxina a qual pode matar a outros peixes encerrados. Esta substância chega a ser tóxica para eles mesmos, mas muito menos que para peixes de outras espécies (Nelson, 2006). Duas das espécies com distribuição no litoral brasileiro têm sido amplamente comercializadas no mercado aquarífilo, *Acanthostracion polygonius* e *A. quadricornis*. A espécie

Acanthostracion polygonius apresenta uma coloração olivácea com hexágonos obscuros separados por linhas claras. Habita recifes de corais até 70m de profundidade, alimentando-se preferencialmente de tunicados, esponjas e camarões. A outra espécie, *A. quadricornis*, possui uma coloração que vai do marrom até verde-amarelo, com numerosas manchas azuis ou negras brilhantes. Alimenta-se de invertebrados sésseis, tais como tunicados, gorgônias e anêmonas, como assim também de crustáceos. Sua carne é muito valorizada, mas foram registrados envenenamentos quando não são devidamente preparados (Matsuura *apud* Carpenter, 2002).

Conhecidos como cangulos ou peixes porcos, os membros da família Balistidae são marinhos, distribuindo-se pelos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. Sua principal característica é a presença de três espinhos dorsais, onde o primeiro é mais desenvolvido que os demais. As espécies desta família possuem geralmente cores vivas, são diurnas e habitantes comuns de áreas recifais (Chen *et al.*, 2001). Entre elas a espécie *Melichthys niger* popularmente denominada cangulo-preto, devido à coloração negra do corpo, com linhas azuis ao longo da nadadeira dorsal e caudal forma grandes cardumes em ilhas oceânicas, recifes e parciais em águas claras e afastadas da costa. Distribuem-se pelos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (Szpilman, 2000).

Os membros de Monacanthidae apresentam características morfológicas semelhantes aos Balistidae, distinguindo-se principalmente por apresentarem apenas dois espinhos dorsais, sendo o primeiro mais desenvolvido do que o segundo. Os peixes da família ocorrem mais comumente em fundos rochosos e de recifes de corais (Matsura *apud* Carpenter, 2002). Neste grupo, vulgarmente denominado porquinho-pintado, a espécie *Cantherines macrocerus* distribui-se desde o Caribe até a costa brasileira e caracteriza-se por possuir corpo marrom com uma grande mancha alaranjada e numerosas pintas brancas distribuídas pelo corpo, ocorrendo geralmente aos pares (machos e fêmeas). Fazendo parte desta mesma família, outro representante do Atlântico Ocidental encontra-se a espécie *Cantherines pullus* que possui coloração geralmente marrom onde destacam-se faixas claras longitudinais na parte posterior do corpo com numerosas pintas alaranjadas. Distribui-se desde a costa dos Estados Unidos até São Paulo (Matsuura *apud* Carpenter, 2002).

Os representantes da família Tetraodontidae são conhecidos popularmente como baiacus-lisos. Em grande parte marinhos, podem apresentar espécies em água doce e salobra. Uma característica peculiar destes peixes consiste na capacidade de inflar seu corpo (região ventral), além de possuir pequenos espinhos no dorso e ventre (Shipp *apud* Carpenter, 2002). Alguns membros desta família possuem toxicidade, a carne (especialmente as vísceras) ou gônadas contém o veneno tetraodotoxina, que em casos de ingestão pode ser fatal (Nelson, 2006).

Entre espécies de ocorrência no litoral do Rio Grande do Norte encontra-se com relativa freqüência na desembocadura de rios, a espécie *Colomesus psittacus*, conhecido também como camisa-de-meia ou mamaiacu. Esta espécie tem hábitos solitários, podendo ocorrer em grupos de dois ou três indivíduos, alimentando-se principalmente de moluscos e outros seres bentônicos, os quais esmaga com seus dentes potentes (Szpilman, 2002). Habita os ambientes demersais, de água doce e estuarina, sobre fundo mole, e também em águas marinhas até a profundidade de 40m, mas é encontrado mais freqüentemente em água doce (Camargo & Maia, 2008).

Outro membro tropical desta família é a espécie *Lagocephalus laevigatus*, conhecido como “baiacu-ará”, seu dorso é cinza-esverdeado, com as partes laterais prateadas e o ventre branco, podendo chegar até 1m de comprimento. Habita zonas costeiras, sobre areia e fundo de fango, geralmente é solitário ou forma pequenos cardumes. Se bem, não é considerada uma espécie comercial, sua carne é de boa qualidade, e não existem informes sobre sua possível toxicidade (Shipp *apud* Carpenter, 2002).

Na família Tetraodontidae, a subfamília Canthigasterinae é considerada a mais derivada (Yamanaue *et al.*, 2008). Entre seus representantes dados citogenéticos são escassos. Uma de suas espécies, *Canthigaster figueiredoi*, tem ocorrência no litoral Nordeste do Brasil, sendo facilmente diferenciada de outras espécies do gênero pela presença de uma longa banda obscura que se estende da parte lateral anterior chegando à base da nadadeira peitoral. Habita arrecifes de corais e fundos rochosos, onde se alimenta de vegetação, esponjas e moluscos (Moura & Castro, 2002).

1.3 Dados citogenéticos e genômicos dos Tetraodontiformes

O número diplóide em peixes marinhos varia de $2n=22-26$ em algumas espécies de Nototheniidae até $2n=240-260$ em alguns táxons de Acipenseridae (Galetti *et al.*, 2000). Os Perciformes constituem o grupo mais representativo entre os vertebrados e também do ambiente marinho, com 80% das suas 10.033 espécies descritas habitando águas marinhas (Nelson, 2006). Em sua maioria apresentam conservação em relação ao número e fórmula cromossômica (Ozouf-Costaz *et al.*, 1996), considerando-se o cariótipo $2n=48$ (NF=48), como basal (Brum & Galetti, 1997).

A diferença com os Perciformes se revela por uma maior diversidade cariotípica nos Tetraodontiformes, apresentando tanto espécies da família Triacanthidae, exibindo $2n=48$ e NF=48 (Rishi, 1973; Choudhury *et al.*, 1982), características consideradas basais e extensamente difundida entre os Perciformes, enquanto outras famílias, tais como Balistidae, Monacanthidae, Ostraciidae, Tetraodontidae e Diodontidae apresentam cariótipos mais derivados, com valores diplóides variando de 28 a 50 e NF de 33 a 78 (Galetti *et al.*, 2000). Molina (2006) tem encontrado evidências de ocorrência de ortoseleção cariotípica (*sensu* White, 1973) na Ordem, onde diferentes famílias apresentam maior propensão à fixação de determinados tipos de rearranjos que outros.

Dentro das alternativas de diversificação cariotípica que apresentam os peixes, destacam-se os cromossomos sexuais e cromossomos Bs. Análises cromossômicas em grupos de peixes filogeneticamente distantes sugerem que a presença funcional, mas morfologicamente críptica, de cromossomos sexuais é uma característica dos cariótipos dos teleósteos (Wiberg, 1983; Ewulonu *et al.*, 1985).

Sistemas de cromossomos sexuais em peixes se restringem a apenas 5% do total de espécies já caracterizadas citogeneticamente (Moreira-Filho *et al.*, 1993). Existem muitos sistemas de cromossomos sexuais nos peixes, sendo relatado o sexo heterogamético para machos, em alguns grupos de peixes, e para fêmeas em outros. Em adição, diferentes sistemas têm sido reportados, XX/XY, ZZ/ZW, $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, XX/XY_1Y_2 e ZZ/ZW_1W_2 (Almeida-Toledo *et al.*, 2000; Almeida-Toledo & Foresti, 2001). Em peixes marinhos,

apesar do grande número de espécies viventes, a presença de cromossomos sexuais citologicamente diferenciados parece ser rara (Morescalchi *et al.*, 1992).

Os cromossomos Bs, também conhecidos como supranumerários ou cromossomos acessórios, são cromossomos prescindíveis que estão presentes em alguns indivíduos de certas populações (Camacho *et al.*, 2000), ademais possuem um comportamento mitótico e meiótico que lhes permitem acumular-se na linha germinal, o que ocasiona uma herança não mendeliana, com taxas de transmissão superiores às dos demais cromossomos (0,5). Estes cromossomos foram encontrados em todos os grupos de animais e plantas (Jones, 1995). A presença de cromossomos supranumerários em peixes Neotropicais parece ser comum em espécies de água doce, já que foram descritos em 41 das 921 espécies analisadas (Oliveira *et al.*, 2000), que se caracterizam pela presença de microcromossomos ou macrocromossomos Bs (Porto-Foresti *et al.*, 1997; Alves & Martins-Santos, 2002).

Da mesma maneira que os cromossomos sexuais, a presença de cromossomos B em espécies marinhas Neotropicais não é comum. Das cerca 80 espécies marinhas Neotropicais analisadas até o momento cromossomos Bs foram observados em apenas três espécies, *Pseudopeneus maculatus* correspondente à Ordem Perciformes e duas espécies da Ordem Tetraodontiformes, *Sphoeroides spengleri* (Tetraodontidae) (Alves *et al.*, 2008; Noleto, 2009) e *Chilomycterus spinosus* (Diodontidae) (Noleto, 2009).

Entre as cerca de 350 espécies de Tetraodontiformes existentes, 15% têm apenas suas fórmulas cariotípicas estabelecidas. Dentre as famílias, se destaca Tetraodontidae, juntamente com Balistidae, que apresentam uma maior quantidade de informações citogenéticas disponíveis.

Entre os Tetraodontiformes, a família Tetraodontidae possui a menor quantidade de DNA por célula entre os vertebrados (Neafsey & Palumbi, 2003). O reduzido tamanho do genoma dos Tetraodontiformes sugere que os membros desta Ordem podem ser alçados à condição de modelos adequados ao estudo da evolução do genoma dos vertebrados (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 1997), o que favorece estudos moleculares, assim como comparações com espécies mais basais. A família Tetraodontidae, em especial, tem despertado grande interesse como modelo para o estudo do genoma de vertebrados. Isso

resulta em uma crescente quantidade de dados disponíveis sobre as seqüências gênicas de vários Tetraodontídeos, particularmente os gêneros *Fugu* (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 1997) e *Tetraodon* (Bradford *et al.*, 1997; Fisher, 2000; Mandrioli, 2000).

Dentre os representantes da Ordem, a quantidade de DNA por célula varia de 0,34 pg, em *Sphoeroides spengleri* (Noieto *et al.*, 2009) a 2,22 pg, em *Acanthostracion (Lactophrys) quadricornis* (Brainerd *et al.*, 2001) (Figura 1). Mesmo os maiores genomas encontrados são considerados pequenos em comparação com os genomas dos demais vertebrados, onde o maior valor (284 pg) pertence ao peixe pulmonado africano *Protopterus aethiopicus* (Pedersen, 1971).

As teorias que visam explicar os padrões observados na variação do tamanho do genoma tendem a cair em duas grandes categorias, aquelas nas quais a seleção natural é vista como o principal mecanismo de controle no tamanho do genoma e aquelas nas que se acha que a seleção natural é essencialmente neutra, e o tamanho do genoma depende principalmente de processos estocásticos (Cavalier-Smith, 1985; Wachtel & Tiersch 1993; Petrov, 2001).

As características citogenéticas dos Tetraodontiformes, como a reduzida quantidade de DNA, as tornam especialmente indicadas para a identificação *in situ* de genes. A partir do melhor conhecimento dos aspectos cromossômicos desta Ordem, análises envolvendo seqüências de DNA podem ser facilitadas pelo conhecimento prévio da sua estrutura cariotípica e do mapeamento físico de certos genes.

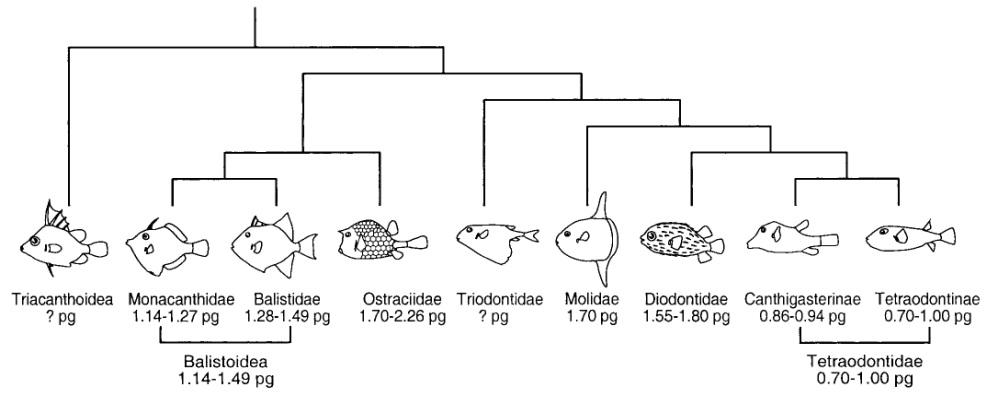


FIGURA 1. Variação de tamanho dos genomas em diferentes famílias de Tetraodontiformes projetados sobre a hipótese filogenética a partir de caracteres morfológicos de Wintterbotton (1974). Tomado de Brainerd *et al.* (2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Diante dos dados apresentados o presente trabalho se propôs a ampliar, analisando grupos diversos, e aprofundar por meio de técnicas de citogenética convencional e molecular os dados citogenéticos disponíveis para a Ordem Tetraodontiformes e inferir acerca dos mecanismos envolvidos na sua evolução cariotípica.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar os aspectos cromossômicos de duas espécies de Ostraciidae, *Acanthostracion quadricornis* e *A. polygonius*, através de impregnação argêntea, bandamento C, fluorocromos DAPI/CMA₃, *double* hibridação *in situ* com sondas de rDNA 18S e 5S, e tratamento com as enzimas de restrição *AluI*, *PstI*, *TaqI*, *HinfI* e *EcoRI*.
- Analisar citogeneticamente as espécies *Melichthys niger* (Balistidae), *Cantherhines macrocerus* e *C. pullus* (Monacanthidae) visando estabelecer evidências de relacionamento filogenético entre os grupos irmãos Balistidae e Monacanthidae por meio da impregnação argêntea, bandamento C, fluorocromos DAPI/CMA₃ e hibridação *in situ* com sondas de rDNA 18S.
- Determinar o cariótipo e analisar aspectos da heterocromatina na espécie *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontidae) a partir de bandamento C, coloração com fluorocromos DAPI/CMA₃ e a detecção de sítios ribossomais por impregnação argêntea e FISH com sonda de rDNA 18S.
- Analisar os padrões cariotípicos e caracterizar as regiões organizadoras de nucléolos em *Lagocephalus laevigatus* e *Colomesus psittacus* (Tetraodontidae), em relação a outros Tetraodontidae, bem como Tetraodontiformes, a partir de impregnação argêntea e bandamento C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1 Localidades de coleta, obtenção do material e acondicionamento

Todos os exemplares utilizados no presente trabalho foram coletados no litoral do Rio Grande do Norte, em praias da cidade de Natal (RN) ($5^{\circ}52'S$, $35^{\circ}10'O$), na praia de Tibau do Sul (RN) ($6^{\circ}11'S$, $35^{\circ}05'O$), Barra do Cunhau (RN) ($6^{\circ}18'S$, $35^{\circ}01'O$), no litoral da Bahia, costa de Salvador (BA) ($12^{\circ}58'S$, $38^{\circ}31'W$) e no Arquipélago São Pedro São Paulo (ASPSP) ($00^{\circ}55'15''N$ - $029^{\circ}20'60''W$). Os animais foram coletados com o uso de anzol, redes de arrasto, tarrafas, ou mergulho autônomo (Figura 2) e transportados para o Laboratório de Genética de Recursos Marinhos, do Departamento de Biologia Celular e Genética da UFRN, onde foram mantidos em aquários aerados até que fossem submetidos às preparações citogenéticas.

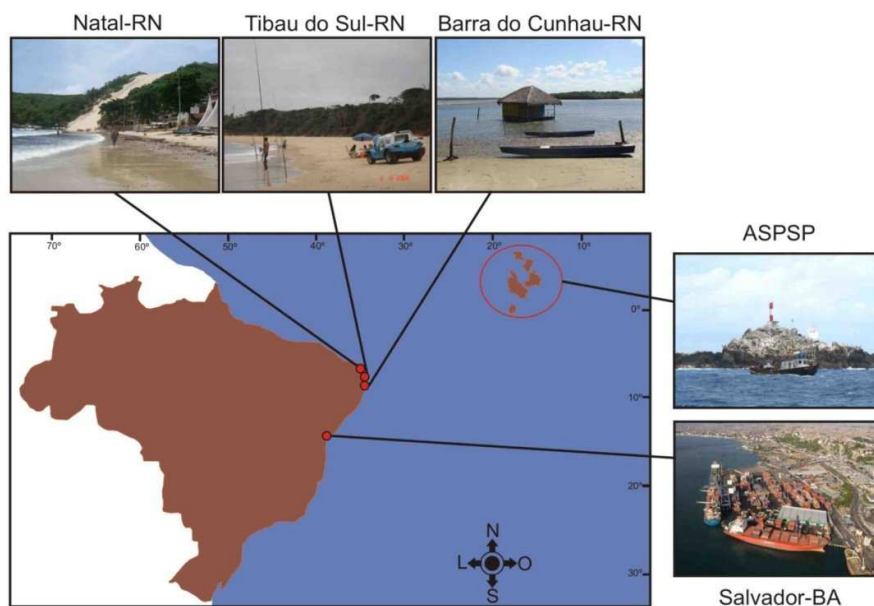


Figura 2. Pontos de coleta dos indivíduos no litoral de Natal (RN), Tibau do Sul (RN), Barra do Cunhau (RN), Salvador (BA) e Arquipélago São Pedro e São Paulo.

Analisaram-se diferentes espécies da Ordem Tetraodontiformes: *Acanthostracion quadricornis* (Linnaeus, 1758), $n=10$; *Acanthostracion*

polygonius (Poey, 1876), n=3 (Ostraciidae); *Melichthys niger* (Bloch, 1786), n=18 (Balistidae); *Cantherhines macrocerus* (Hollard, 1853), n=10 e *Cantherhines pullus* (Ranzani, 1842), n=2 (Monacanthidae); *Canthigaster figueiredoi* (Moura & Castro, 2002), n=11; *Lagocephalus laevigatus* (Linnaeus, 1766), n=3, *Colomesus psittacus* (Bloch & Schneider, 1801), n=5 (Tetraodontidae); (Figura 3).

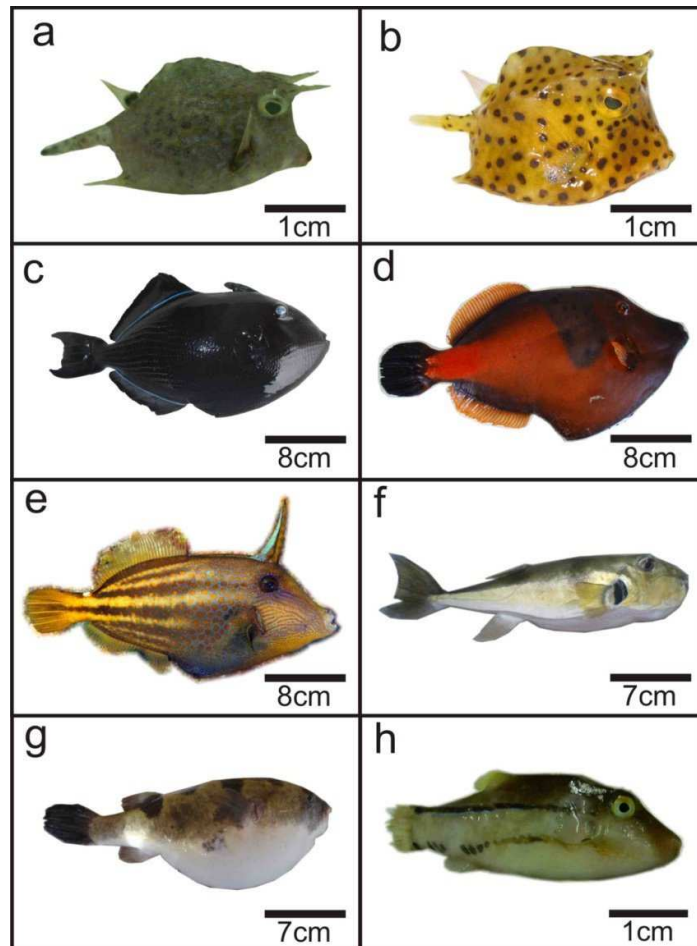


Figura 3. Exemplos das espécies utilizadas no presente estudo: **a.** *Acanthostracion polygonius* (Ostraciidae), **b.** *Acanthostracion quadricornis* (Ostraciidae), **c.** *Melichthys niger* (Balistidae), **d.** *Cantherhines macrocerus* (Monacanthidae), **e.** *Cantherhines pullus* (Monacanthidae), **f.** *Lagocephalus laevigatus* (Tetraodontidae), **g.** *Colomesus psittacus* (Tetraodontidae), **h.** *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontidae).

3.2 Métodos

3.2.1 Técnicas de estimulação mitótica

Os exemplares foram estimulados mitoticamente através da técnica preconizada por Molina (2001), que faz uso dos complexos comerciais de antígenos bacterianos e fúngicos, Munolan® (Allergan Frumtost) e Aminovac® (Molina *et al.*, em preparação). Este procedimento consiste na inoculação intramuscular de solução do composto (2 comprimidos/1ml de água destilada); na proporção de 1ml/50g de peso corporal, por um período de 24 a 48 horas. Decorrido este tempo, os exemplares foram anestesiados com Clove oil (Eugenol) e sacrificados para extração do rim cefálico.

3.2.2 Técnica de obtenção de cromossomos mitóticos

Para a obtenção de cromossomos mitóticos foi adotado o método de preparação *in vitro* descrito por Gold *et al.* (1990). Logo do sacrifício do animal, se prosseguiu com a extração do rim anterior, o qual possui função hematopoiética, nos casos no que o rim era insuficiente, outros tecidos foram utilizados, como brânquias ou vaso. O material retirado é posto em 5ml de médio de cultura (RPMI-GIBCO) e desagregado, logo foi adicionado 5 gotas de colchicina 0,025%, deixando agir por 30 minutos. Após de este tempo o material foi centrifugado por 10 minutos a 800rpm, foi descartado o sobrenadante e foram adicionados 8ml de solução hipotônica (KCL 0,075M), deixando por 28 minutos, logo se prefixo com 4 gotas de fixador (3 Metanol: 1 Ac. Acético), após foi novamente centrifugado por 10 minutos a 3000rpm, descartou-se o sobrenadante e se adicionou 10ml de fixador, e se centrifugou por 10 minutos a 3000r.p.m, este passo foi repetido três vezes. Logo da ultima centrifugação foi descartado o sobrenadante e adicionou-se 2,5ml de fixador para concentrar o material.

Após a preparação, 3 a 4 gotas de suspensão celular, foram gotejadas sobre uma lâmina lavada e seca ao ar, e posteriormente coradas com Giemsa, diluído a 5% em tampão fosfato (pH 6,8), por 10 min e analisadas em microscópio óptico sob aumento de 1.000X.

3.2.3 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)

As Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) foram detectadas através da técnica de impregnação pela prata idealizada por Howell & Black (1980), com algumas modificações. Sobre uma lâmina previamente preparada, se colocou de 2 a 3 gotas de solução aquosa de gelatina (um grama de gelatina incolor + 50 ml de água + 0,5ml de ácido fórmico), e 4-6 gotas de Ag-NO₃ à 50%, logo se cobriu com uma lamínula e se incubou em estufa a 60°C por 3-6 minutos.

3.2.4 Detecção de Heterocromatina (Banda-C)

As regiões heterocromáticas foram identificadas pelo método de bandamento C (Summer, 1972), com algumas modificações. Uma lâmina previamente preparada é imersa em HCl 0,2N à temperatura ambiente, por 15 minutos, após este período se lavou em água deionizada e se secou ao ar. Se incubou a lâmina em solução de 2XSSC por 15 minutos em estufa à 60°C, decorrido este tempo, se lavou em água deionizada e foram secas ao ar, logo se incubou a lâmina em uma solução de Ba(OH)₂ ao 5% por um minuto e 30 segundos a 42°C e rapidamente se mergulhou a lâmina em HCl 0,2N (três vezes, aproximadamente 3 segundos), em seguida lavou-se em água deionizada e foram secas ao ar. Se voltou a incubar em solução de 2xSSC à 60°C por 30 minutos. Decorrido este tempo, lavou-se em água deionizada, secou-se ao ar e corou-se em Giemsa diluído a 6%, em tampão fosfato (pH 6,8), por 4 minutos.

3.2.5 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) – FISH com sonda rDNA 18S e *double* FISH com sonda 18S e 5S

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pinkel *et al.* (1986). Duas técnicas de marcação de sondas foram utilizadas, para o FISH com sonda 18S foram marcadas com biotina a partir *nick translation* (BioNick Labeling System – Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As sondas para o *double* FISH 18S obtida por amplificação via polimerização de cadeia (PCR) do DNA do peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti, 2004) e 5S DNAr obtidos a partir do

DNA do peixe *Leporinus obtusidens* (Martins & Galetti, 1999) foram marcadas mediante PCR com biotina-dUTP e digoxigenina-dUTP respectivamente, e a sonda 5S rDNA foi cortada com DNase para a obtenção de fragmentos de 200-500pb aproximadamente. A solução de hibridação consistiu de 200µl de formamida 50%, 80µl de sulfato dextrano 50%, 40µl de 20xSSC, 80µl de água q.s.p., perfazendo um volume total de 400µl, sendo adicionado 1,5µg de sonda (DNA marcado com biotina). Em seguida, a solução de hibridação foi transferida para um banho fervente, durante 10 minutos, para desnaturação do DNA e, imediatamente após, para um recipiente com gelo, impedindo a renaturação por choque térmico. As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas com tampão PBS 1x por 5 minutos à temperatura ambiente, sob agitação e, posteriormente desidratada em série alcoólica (70%, 85% e 100%). Em seguida, foram colocadas em RNase (100 µg/ml) por 1 hora e 30 minutos, em câmara úmida a 37° C. Após este período as lâminas foram lavadas em soluções salinas. O material é desidratado em uma série alcoólica, 5 minutos em cada banho, e tratado com formamida 70%/2xSSC a 70°C, por 5 minutos, para desnaturação dos cromossomos. Uma nova desidratação em série alcoólica foi feita. Foram aplicados sobre a lâmina, 50µl da solução de hibridação com uma estringência de 77%, contendo a sonda desnaturada, permanecendo *overnight* a 37°C em câmara úmida. Transcorrido esse tempo, as lâmina foram lavadas em solução de formamida 50%/2xSSC a 42° C por 10 minutos, três vezes em 0,1xSSC a 60°C, 5 minutos em cada lavagem, e em solução *Tween 20* (0,05%/2xSSC), sob agitação, por 5 minutos. Foi feito um tratamento com 90µl de NFDM 5% (*non fat dry milk* – leite em pó desnatado) em 4xSSC, por 15 minutos à temperatura ambiente. A detecção da sonda 18S foi com Avidina-FITC (fluoroceína isotiacinato) conjugada e anti-avidina, e a sonda 5S foi detectada com antidigoxigenina conjugada com Rodamina. As preparações cromossômicas foram contracoradas com iodeto de propídio (50 µg/ml) ou DAPI (0,2 µg/ml).

3.2.6 Digestão com enzimas de restrição

O tratamento com enzimas de restrição foi realizado de acordo com Cau *et al.*, (1988). Foram utilizadas as endonucleases de restrição *EcoRI*

(5'G↓AATTC), *AluI* (5'AG↓CT), *TaqI* (5'T↓CGA), *HinfI* (5'G↓ANTC) e *PstI* (5'CTGCA↓G). As enzimas foram diluídas em solução tampão conforme recomendação do fabricante (Amersham Pharmacia), para uma concentração final de 0,5U/μl. Um volume de 40μl da enzima foi adicionado sobre cada lâmina previamente preparada. Em seguida foi coberta por uma lamínula e incubada em estufa a 37°, com exceção de *TaqI* que foi incubada a 65°C. A enzima *AluI* foi incubada durante 5 horas, entretanto as enzimas *EcoRI*, *TaqI*, *HinfI* e *PstI* o tempo de incubação foi de 10 horas. As preparações foram posteriormente coradas por Giemsa a 5% por 8 minutos.

3.2.7 Coloração com fluorocromos base-específicos DAPI e CMA₃

A coloração com fluorocromos DAPI e CMA₃ foi realizada de acordo com a metodologia de Schweizer (1980). Lâminas recém preparadas, com suspensão celulares, foram mergulhadas em solução de DAPI (0,3mg/ml), por 30 minutos, no escuro. Após lavagem uma nova coloração foi feita com Cromomicina A₃ por 1 hora. O material foi preservado a temperatura ambiente por 3 dias até a sua análise em microscópio de epifluorescência com filtros apropriados.

3.2.8 Análises cromossômicas

As preparações cromossômicas convencionais e preparações submetidas ao FISH e fluorocromos foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência Olympus BX50, em um aumento de 1.000 vezes, equipado com sistema digital de captura de imagem. As metáfases foram fotografadas, a partir das quais foi estabelecido o cariótipo, com a determinação da fórmula cromossômica e NF (Número Fundamental). A montagem dos cariótipos foi realizada pela ordenação dos cromossomos quanto à posição dos centrômeros, metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), e ordenados em ordem decrescente de tamanho em cada grupo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados na forma de capítulos, os quais correspondem a artigos científicos submetidos ou em fase de preparação.

CAPÍTULO I

Citogenética comparativa e padrões heterocromáticos em duas espécies do gênero *Acanthostracion* (Ostraciidae: Tetraodontiformes)



Citogenética comparativa e padrões heterocromáticos em duas espécies do gênero *Acanthostracion* (Ostraciidae: Tetraodontiformes)

Pablo Ariel Martinez & Wagner Franco Molina

Resumo

A heterocromatina constitutiva (HC) é um componente abundante dos genomas dos Eucariotos, entretanto sua variação parece, em muitos casos, ser neutra. Alguns grupos de peixes, como aqueles inseridos na ordem Tetraodontiformes, podem diferir significativamente na quantidade e localização da heterocromatina nos cromossomos. A variação no conteúdo de DNA é marcante entre as famílias desta ordem, divergindo em mais de sete vezes. Os maiores conteúdos genômicos estão presentes em espécies da família Ostraciidae (2,20-2,60pg). Os mecanismos carioevolutivos responsáveis por esta variação são basicamente desconhecidos. O presente trabalho caracterizou citogeneticamente duas espécies da família Ostraciidae, *Acanthostracion polygonius* e *A. quadricornis* empregando coloração convencional, bandamentos C, Ag-RONs, CMA₃/DAPI, enzimas de restrição (ERs) *AluI*, *PstI*, *EcoRI*, *Taq* e *HinfI* e *double FISH* 18S e 5S rDNA. Os cariótipos de ambas as espécies apresentaram 2n=52 cromossomos (NF=52) e também características estruturais conservadas quando submetidos a vários tipos de bandamentos. Sítios Ag-RONs (C+/GC⁺) coincidentes com marcações 18S rDNA foram evidenciados em posição intersticial no 13^o par, enquanto sequências da subunidade ribossomal 5S estavam presentes no 11^o par. O padrão de distribuição da heterocromatina revelou grandes blocos pericentroméricos em todos os cromossomos e segmentos intersticiais conspícuos em três pares cromossômicos. A digestão dos cromossomos com *AluI*, *TaqI* e *HinfI*, com pequenas variações, evidenciaram um padrão similar ao bandamento C, enquanto que com *EcoRI* exibiu maior número de bandas longitudinais discerníveis. Digestões com a enzima *PstI* demonstraram um padrão não seletivo sobre o cariótipo das espécies. O marcante conteúdo heterocromático equilocalmente distribuído em posição pericentromérica em todos os pares cromossômicos, pode ser apontado como fator diferencial em relação aos cariótipos de outras famílias de Tetraodontiformes e causa principal do maior conteúdo de DNA em Ostraciidae. Diante do papel desempenhado pelas sequências repetitivas na reorganização genômica nesta Ordem, sugere-se que os blocos heterocromáticos conspícuos, presentes em mesma posição cromossômica e com composição aparentemente similar podem ter facilitado eventos evolutivos em concerto, responsáveis pela extensa variação no conteúdo genômico exibida por suas diferentes famílias.

Palavras chaves: Peixe-cofre, enzima de restrição, heterocromatina, Tetraodontiformes.

Abstract

The constitutive heterochromatin (CH) is an abundant component of Eucaryote genomes, although your variation appears, in many cases, to be neutral. Some groups of fishes, such as those belonging to Tetraodontiformes, can differ significantly in quality and localization of heterochromatin in chromosomes. The variation in DNA content is remarkably between families of this order, diverging more than seven times. The biggest genome contents are present in species of family Ostraciidae (2, 20, 60pg). The carioevoutionary mechanisms responsible for this variation are basically unknown. This work characterized the karyotypes of two species of the family Ostraciidae, *Acanthostracion polygonius* e *A. quadricornis* by conventional staining, C banding, Ag-NORs, CMA₃/DAPI, restriction enzymes (REs) *AluI*, *PstI*, *EcoRI*, *Taq* and *HinfI* as well as double FISH 18S e 5S rDNA. The karyotypes of both species shared 2n=52 chromosomes (FN=52) as well as conserved structural characteristics when submitted to several types of banding. Ag-NOR sites (C+/GC+) coinciding with 18S rDNA marks were observed in an interstitial position on pair 13, while sequences of the 5S rRNA subunits were present on pair 11. The pattern of distribution of heterochromatin revealed large pericentromeric blocks in all chromosomes as well as conspicuous interstitial segments in three chromosome pairs. The chromosome digestion with *AluI*, *TaqI* e *HinfI* , with short variations, evidenced similar pattern to C banding, while *EcoRI* exhibited more numbers of discernible longitudinal bands. Digest with *PstI* demonstrated a non-selective pattern on the karyotypes of species. The remarkable heterochromatic content equilocally distributed in pericentromeric position amongst all chromosome pairs, can be pointed as differential factor concerning to karyotypes of others families of Tetraodontiformes and main cause of biggest DNA content in Ostraciidae. By the role played by repetitive sequences in genomic reorganization in this Order, suggests that conspicuous heterochromatic blocks, present in the same chromosome position and with apparently similar composition may have facilitated evolutionary events responsible for extensive variation in the genomic content exhibited by their different families.

Key words: Boxfish, restriction enzyme, heterochromatin, Tetraodontiformes.

Introdução

A heterocromatina constitutiva (HC) contribui variada parcela do genoma de diversos organismos. Enquanto em *Arabidopsis thaliana* corresponde a cerca de 5%, em *Drosophila* e humanos a 30%, chegando a representar 80% do genoma nos nemátodos (Rossi *et al.*, 2007).

A HC pode localizar-se em qualquer região dos cromossomos, mas geralmente localiza-se perto dos centrômeros e associado a regiões

teloméricas, embora, menos freqüentemente, também é encontrada nas regiões intersticiais dos cromossomos (Corradini *et al.*, 2007; Probst & Almouzni, 2008). Esta fração do genoma inclui, além de outras sequências repetitivas, elementos de transposição e DNA satélite, o qual reside principalmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos (Chaves *et al.*, 2000).

Blocos de heterocromatina podem variar consideravelmente de tamanho, no geral sem um efeito evidente sobre o organismo. Esta plasticidade também está presente em espécies estreitamente relacionadas que podem diferir muito na quantidade e localização da heterocromatina nos seus cromossomos (Sumner, 2003).

Variações no número de seqüências repetitivas, DNA satélites, elementos de transposição (ET) e genes ribossomais dos diferentes genomas ocasionam notáveis divergências no tamanho do genoma (valor C) entre as espécies de eucariotos (Biemont, 2008). Nos protozoários o conteúdo genômico varia em até 5.800 vezes, artrópodes, 250 vezes, peixes, 350 vezes, algas, 5.000 vezes e angiospermas, 1.000 vezes (Gregory, 2001), não estando este grau de variação relacionado com a complexidade biológica dos organismos (Petrov, 2001).

Entre as famílias de Tetraodontiformes as divergências em relação ao conteúdo de DNA são marcantes. Assim, nesta Ordem encontra-se a família Tetraodontidae que apresenta os menores conteúdos de DNA dentre os vertebrados (0,34-1,00pg), (Noletto *et al.*, 2009). Outros grupos possuem conteúdos próximos aos Perciformes (1,7pg), como a superfamília Balistoidea (1,14-1,49pg), enquanto que Ostraciidae exibe os maiores conteúdos de DNA por célula, com valores variando de 2,20 a 2,60pg (Brainerd, 2001). A variação genômica observada neste grupo deve-se presumivelmente à perda de DNA repetitivo ou outro DNA não codificante (Neafsey & Palumbi, 2003).

Dados citogenéticos apoiados em diferentes métodos de bandamento em espécies de Ostraciidae, propiciariam informações importantes sobre a evolução cariotípica e genômica da ordem. Diante disto apresentamos a caracterização citogenética de duas espécies Atlânticas desta família, *Acanthostracion polygonius* e *A. quadricornis*, conhecidas vulgarmente como peixes-cofre. Os cariótipos foram analisados, por meio de técnicas de

coloração convencional, bandamento C, Ag-RONs, coloração com os fluorocromos CMA₃/DAPI, tratamento com cinco enzimas de restrição *AluI*, *TaqI*, *Hinfl*, *EcoRI* e *PstI*, além da detecção do DNAr com sondas 18S e 5S através do método de *double* FISH.

Material e métodos

Um total de 13 exemplares foi coletado no litoral de Salvador (BA) (12°58'S, 38°31'W), região NE do Brasil, sendo três espécimes de *A. polygonius* e 10 de *A. quadricornis* (Figura 1a, b). A identificação das espécies foi estabelecida através de chaves taxonômicas e corroborada pelo Dr. José Garcia Jr (UFRN).

Previamente aos métodos de obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos, os exemplares foram submetidos à estimulação mitótica, *in vivo*, com aplicação intramuscular e peritoneal de Munolan® (complexo de antígenos bacterianos e fúngicos) ou Aminovac® na razão de um comprimido diluído em 0,5 ml de água na proporção de 100g de peso do animal (Molina, 2001; Molina *et al.*, em preparação). As preparações cromossômicas seguiram a metodologia *in vitro* preconizada por Gold *et al.* (1990).

As regiões heterocromáticas foram definidas segundo Sumner (1972), enquanto a detecção das marcações Ag-NORs foi realizada conforme a técnica descrita por Howell & Black (1980). A coloração com os fluorocromos CMA₃ e DAPI seguiu o protocolo de Schweizer (1980).

Padrões de digestão dos cromossomos pelas enzimas de restrição *AluI*, *EcoRI*, *PstI*, *Hinfl* e *TaqI* foram definidos a partir de testes de concentração, tempo de exposição e temperatura, de acordo com Cau *et al.* (1988). Um total de 40µl, a uma concentração de 10U/µl de enzima, diluída em tampão indicado pelo fabricante, foi depositado sobre lâmina previamente preparada e coberta com lamínula. A enzima *AluI* foi incubada por 4-5hs, e *EcoRI*, *PstI*, *Hinfl* e *TaqI* foram incubadas por 10-12hs em câmara úmida a 37°C, com exceção de *TaqI* que foi incubada a 65°C, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8, e secas ao ar.

A aplicação da técnica de *double* FISH foi realizada com base no procedimento adotado por Pinkel *et al.* (1986), com pequenas alterações,

visando uma melhor qualidade das preparações. As sondas 18S e 5S DNAr foram marcadas mediante PCR com biotina-dUTP e digoxigenina-dUTP respectivamente, e foram cortadas com DNase para a obtenção de fragmentos de 200-500pb aproximadamente. A detecção da sonda 18S foi com Avidina-FITC (fluoroceína isotiacinato) conjugada, e anti-avidina, e a sonda 5S foi detectada com antidigoxigenina conjugada com Rodamina.

As metáfases foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX50, com sistema digital de captura de imagens. Os cromossomos foram divididos em grupos quanto à posição do centrômero em metacêntricos, submetacêntricos, subtlocêntricos e acrocêntricos, e dispostos em ordem decrescente de tamanho.

Resultados

As análises citogenéticas realizadas nos peixes-cofre *Acanthostracion polygonius* e *A. quadricornis*, identificaram um número diplóide comum de $2n=52$ cromossomos, sendo todo o complemento constituído por elementos acrocêntricos ($NF=52$).

Ambas as espécies, quando submetidos aos diferentes bandamentos, apresentaram cariótipos com padrões estruturais idênticos. A impregnação com nitrato de prata revelou marcações de sítios ribossomais ativos em posição intersticial no 13º par cromossômico (Figura 2a, b).

Os cariótipos de ambas as espécies apresentaram todos os cromossomos portando grandes blocos heterocromáticos em posição pericentromérica. Além destes, heterocromatinas intersticiais estavam presentes sobre os pares cromossômicos 12, 13 ($CMA_3+/DAPI-$; coincidentes com as NORs) e 21 (Figura 2c,d e Figura 3a,b).

A técnica do double FISH permitiu identificar uma condição não sintênica entre as subunidades ribossomais 18S e 5S. As sequências da subunidade ribossomal 18S rDNA, se mostraram coincidentes, tanto em *A. polygonius*, como *A. quadricornis* com as marcações Ag-NORs no 13º par, enquanto os sítios 5S rDNA estão em posição intersticial no 11º par (Figura 2e,f).

A coloração seqüencial CMA₃/DAPI mostraram que além da região portadora nucleolar, as regiões pericentroméricas e regiões teloméricas de alguns pares cromossômicos eram CMA₃+ (Figura 3a, b).

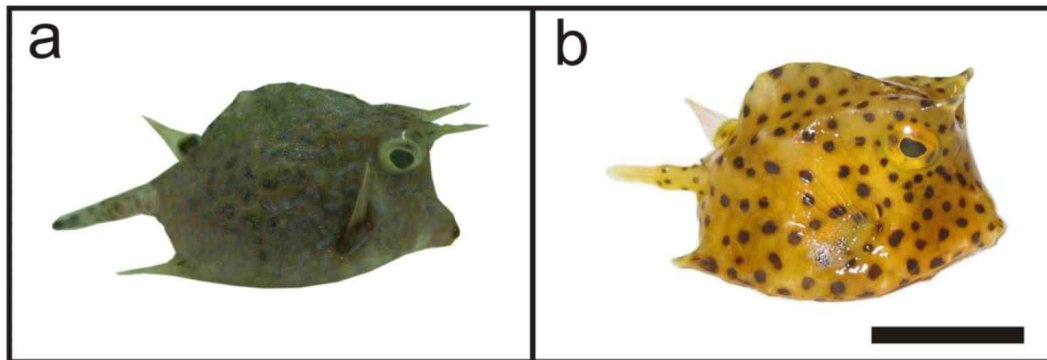


Figura 1. Espécimes representativos de *Acanthostracion polygonius* (a) e *A. quadricornis* (b). Barra=1cm.

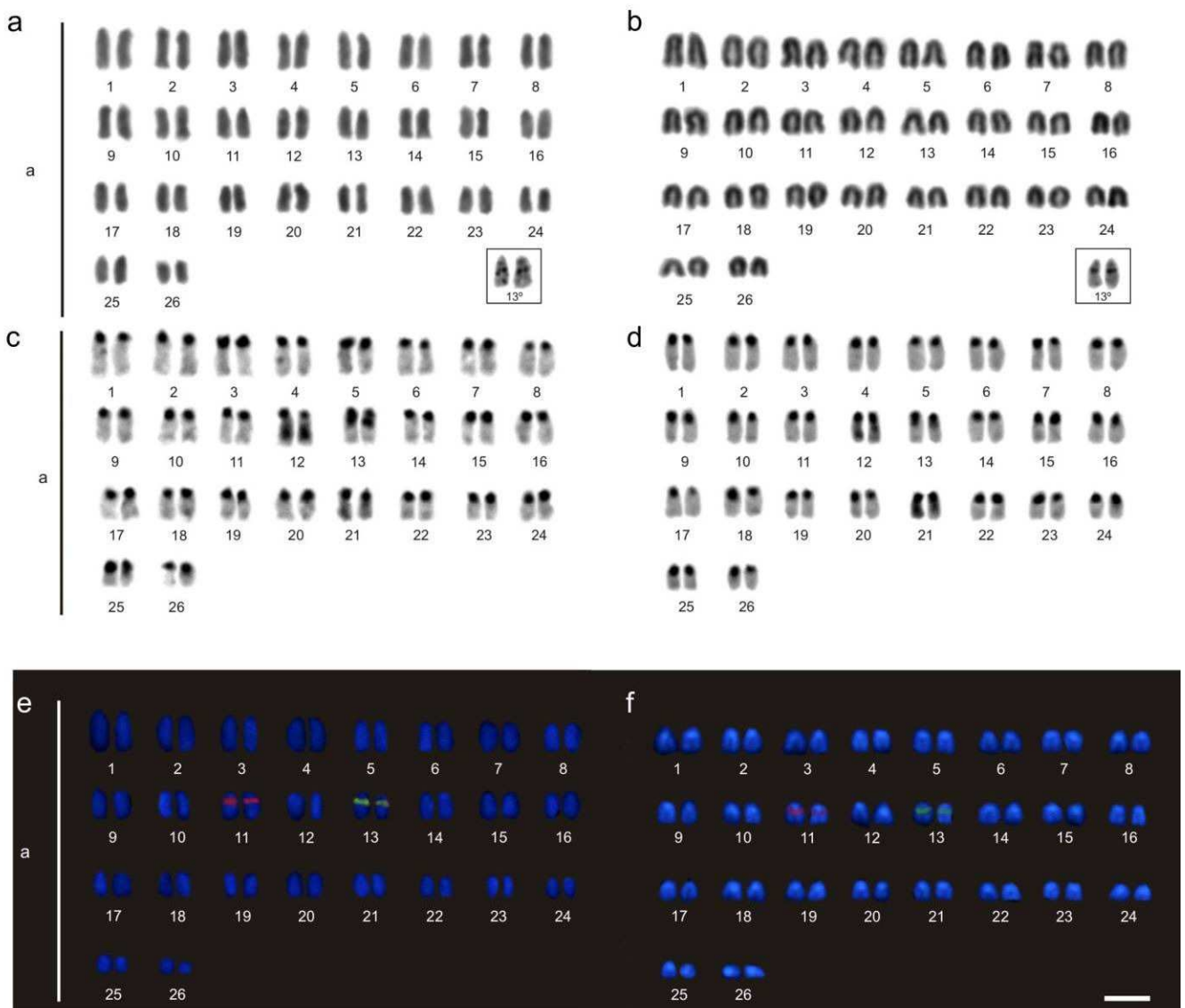


Figura 2. Cariótipos de *A. polygonius* (**a, c, e**) e *A. quadricornis* (**b, d, f**) a partir de coloração convencional (**a, b**). Em destaque se observam as regiões organizadoras nucleolares. Bandamento C (**c, d**), FISH 18S (verde) e 5S rDNA (vermelha) (**e, f**). Barra=5 μ m.

Marcações pericentroméricas foram observadas a partir da digestão com as enzimas de restrição *AluI*, *TaqI*, *HinfI* e *EcoRI*. Observou-se um pequeno nível de divergência quanto à intensidade das bandas não digeridas (Figura 3c-l). Tratamentos com a enzima *AluI* mostraram alguns cromossomos com marcações intersticiais. A enzima *TaqI*, permitiu ainda destacar uma região telomérica conspícua não digerida em um dos pares cromossômicos. O padrão de digestão com *EcoRI* produziu um padrão de bandas longitudinais

discerníveis, enquanto que a exposição à *PstI* digeriu de maneira uniforme a totalidade dos cromossomos, evidenciando a presença de sítios de corte equitativamente distribuídos nos cromossomos das duas espécies. Ambas as espécies mostraram um padrão semelhante de bandas oriundas da digestão pelas cinco enzimas de restrição utilizadas (Tabela 1).

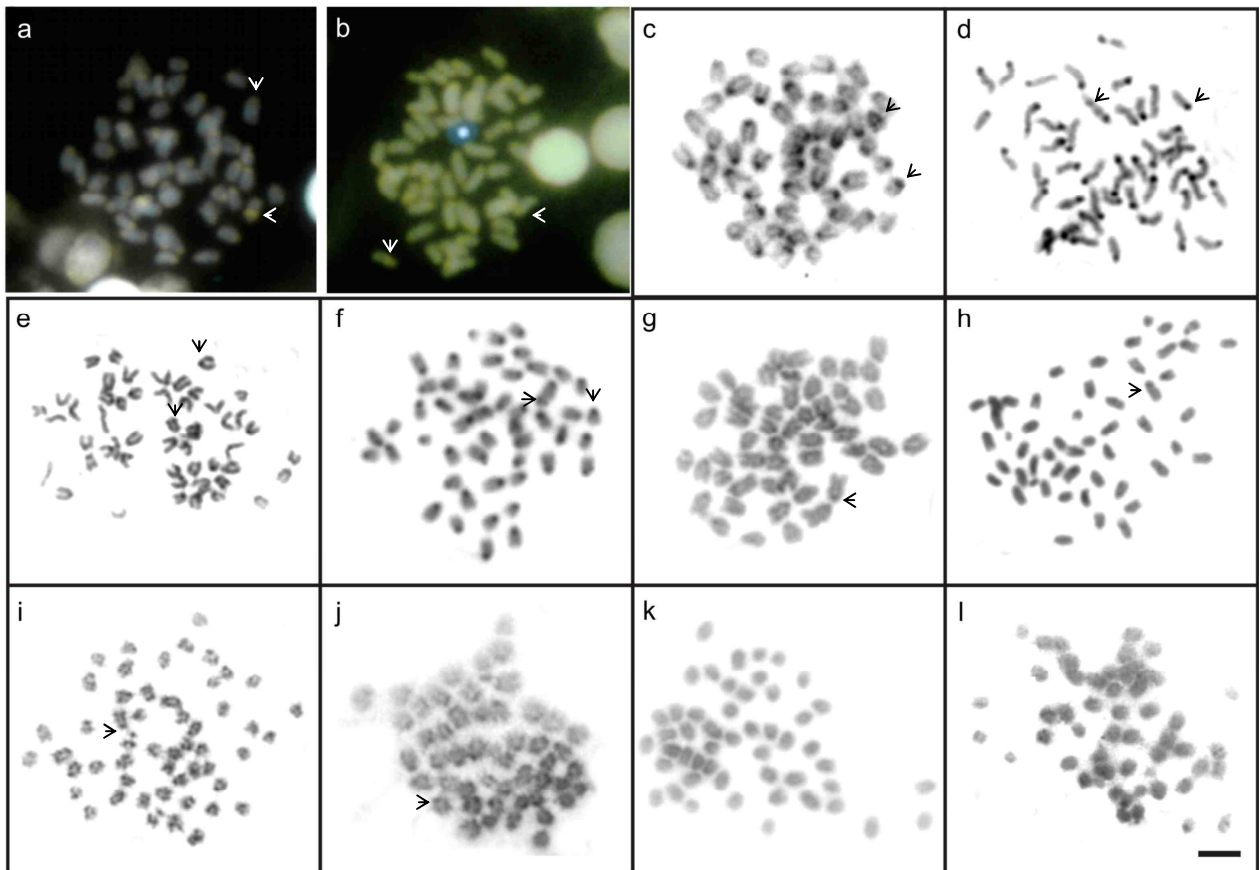


Figura 3. Tratamento com dupla coloração DAPI-CMA₃ (a, b), enzimas de restrição *AluI* (c, d), *TaqI* (e, f), *HinfI* (g, h), *EcoRI* (i, j) e *PstI* (k, l) de *A. polygonius* e *A. quadricornis* respectivamente. Barra=5µm.

Tabela 1. Padrões de resposta comuns dos cromossomos de *A. polygonius* e *A. quadricornis* ao bandamento C e a digestão a diferentes enzimas de restrição.

Tratamentos	Marcações			
	Centroméricas	Intersticiais	Teloméricas	Longitudinais
Banda C	+	+	-	-
<i>AluI</i>	+	+	-	-
<i>TaqI</i>	+	-	+	-
<i>Hinfl</i>	+	-	-	-
<i>EcoRI</i>	+	-	-	+
<i>PstI</i>	-	-	-	-

Discussão

As famílias de Tetraodontiformes têm revelado uma extrema diversificação cariotípica, tanto em aspectos numéricos quanto estruturais do complemento, com valores diplóides variando desde $2n=28$ a 52 cromossomos. Associado a isto exibem considerável diferenciação em relação ao número fundamental, com valores tão baixos como $NF=33$, até valores tão altos como $NF=72$ (Sá-Gabriel & Molina, 2005).

Os dados cromossômicos disponíveis para a Ordem revelam diferentes tendências carioevolutivas neste grupo, com alguns rearranjos estruturais, tais como, fissões cêntricas, fusões e especialmente inversões pericêntricas com ocorrência preferencial em algumas famílias e não em outras (Arai & Katsuyama, 1976; Sá-Gabriel & Molina, 2005).

Enquanto algumas famílias possuem um maior nível de informação citogenética em outras são praticamente desconhecidas sobre este aspecto. Das 33 espécies da família Ostraciidae, apenas cinco foram analisadas quanto aos seus padrões cariotípicos.

Com o incremento dos dados citogenéticos fica evidente uma marcante variação nos valores diplóides dentro desta família, mas com uma disparidade menor no que diz respeito ao número fundamental. Assim, *Lactaria diaphana* apresenta o mais baixo valor diplóide com $2n=36$ ($NF=48$), *Ostracion cubicus* e *O. immaculatus* exibem $2n=50$ ($NF=54$) (Arai & Nagaiwa, 1976; Arai, 1983). Os

números diplóides apresentados por *A. polygonius* e *A. quadricornis* ($2n=52$) indicam o maior valor diplóide já descrito para Ostraciidae, no qual todos os pares cromossômicos se mostraram acrocêntricos ($NF=52$).

Os maiores pares cromossômicos no cariótipo de *A. polygonius* e *A. quadricornis* variam em tamanho de 2,5-4,5 μm , enquanto que os maiores elementos do cariótipo de *L. diaphana*, grandes cromossomos metacêntricos, com aproximadamente 8 μm , apresentam o dobro ou o triplo do tamanho (Arai, 1983). Assim, a variação cromossômica numérica e menor amplitude do número de braços cromossômicos presentes na família indicam ser devidas principalmente a eventos de fissões ou fusões Robertsonianas, complementadas por eventos de inversões pericêntricas.

As regiões organizadoras nucleolares localizadas em posição intersticial no 13º par identificadas através de Ag-RONs e FISH 18S rDNA nos cariótipos dos peixes-cofre Atlânticos, *A. polygonius* e *A. quadricornis* sugerem que se tratem de pares homeólogos. Este padrão de RONS simples, presente em um único par cromossômico é considerado um caráter comum não só para os teleósteos, como também para a maioria das espécies de vertebrados (Ameniya & Gold, 1986). A associação entre RONS e heterocromatina CMA_3^+ , observada em ambas as espécies analisadas, é freqüentemente descrita em peixes (Ameniya & Gold 1986; Almeida-Toledo *et al.*, 1996), onde estas regiões mostram-se adjacentes, sobrepostas ou intercaladas às RONS, o que pode favorecer rearranjos nos pares portadores (Vicari *et al.*, 2003). Os sítios ribossomais da subunidade menor 5S foi evidenciado em posição intersticial no 11º par em ambas as espécies. O posicionamento intersticial destes sítios tem sido considerada um caráter plesiomórfico nos peixes (Pendás *et al.*, 1994; Martins & Galleti, 1999; 2001) sugerindo que sua maior freqüência nesta posição se deva a uma maior proteção contra eventos evolutivos, como a transposição ou efeito de posição aleatório, que geralmente atua como mecanismo dispersivo das seqüências localizadas em posições terminais nos cromossomos (Noletto *et al.*, 2007).

Sítios 5S rDNA não sintênicos com a subunidade 18S rDNA constitui o padrão mais comumente encontrado nos vertebrados (Lucchini *et al.*, 1993; Susuki *et al.*, 1996; Martins & Galleti 2001). Esta situação também já foi evidenciada em outras espécies de Tetraodontiformes, como em *Chilomycterus*

spinosus (Diodontidae), e nas espécies de Tetraodontidae, *Sphoeroides greeleyi*, *S. testudineus* (Noletto *et al.*, 2007), *Tetraodon fluviatilis* (Mandrioli *et al.*, 2001) e *T. nigroviridis* (Fischer *et al.*, 2000). Embora os dados sobre posição e frequência dos sítios ribossomais em *A. polygonius* e *A. quadricornis* sugira indicar para ambos uma condição plesiomórfica, inexistem outros dados em Ostraciidae que permitam realizar comparações.

As regiões heterocromáticas são altamente variáveis entre os organismos (Brutlag, 1980), dada esta característica, ela desempenha um rol chave na evolução dos cariótipos dos peixes, estando relacionada a polimorfismos, já sejam intra-individuais (exemplo *Gymnothorax vicinus*, Vasconcelos & Molina, 2009), intra-populacionais (exemplo *Astyanax scabripinnis*, Mantovani *et al.*, 2000), inter-populacionais como em *Hoplias malabaricus* (Jacobina *et al.*, 2009) e *Leporinus elongatus* (Molina *et al.*, 2008) ou a diversificação inter-específica (Vasconcelos & Molina, 2009).

Geralmente os polimorfismos em peixes são discretos, envolvendo alguns pares cromossômicos, podendo estar relacionados entre outras situações com o tamanho dos blocos (Martinez *et al.*, 1991; Jankun *et al.*, 1995) ou como resultado da associação das regiões heterocromáticas e RONS polimórficas (Hartley, 1988). Contudo, existem casos nos quais os polimorfismos são extensivos a um grande número de pares cromossômicos, como em *A. scabripinnis* (Mantovani *et al.*, 2000). Contrastando com este quadro de plasticidade evolutiva, a ausência de diferenciações numéricas, de posição e composicionais das porções heterocromáticas dos cromossomos das duas espécies pelas técnicas empregadas é surpreendente, sobretudo devido ao dinamismo normalmente identificado envolvendo estas regiões nos peixes.

Nestas espécies, as porções heterocromáticas pericentroméricas exibiram uma composição GC-rica bem como em porções teloméricas que apresentavam intensidade através do bandamento C. Esta situação tem sido descrita para outras espécies de peixes e vertebrados (Mayr *et al.*, 1986; Caputo *et al.*, 2003; Fernandez-Garcia *et al.*, 1998).

As similaridades cromossômicas entre os dois cariótipos foram realçadas pelas respostas aos tratamentos com as endonucleases de restrição empregadas. Assim, os grandes blocos heterocromáticos se mostraram seletivamente preservados da ação das enzimas *AluI*, *TaqI* e *Hinfi*, e não

discriminados das regiões eucromáticas pela *PstI*. Entretanto, as heterocromatinas intersticiais C+ observadas nos pares 12° e 21° indicam uma origem distinta, por não apresentarem resposta CMA₃⁺. Estas regiões que foram degradadas em sua totalidade pelas *TaqI*, *Hinfl* e *PstI* reforça esta hipótese e de forma menos intensa pela enzima *AluI*. Digestões por *EcoRI* proporcionaram bandas longitudinais, já tendo sido observada em outras espécies de peixes marinhos como *Apogon americanus* (Perciformes) no qual o padrão de digestão pela enzima *EcoRI* foi similar ao das bandas de replicação (Araujo *et al.*, *in press*). Os sítios de corte desta enzima podem estar atrelados a características funcionais da replicação cromossômica.

A ocorrência de grande conteúdo heterocromático com mesmas características composicionais propicia inferências sobre uma origem comum em decorrência de eventos em concerto de heterocromatinização.

Às seqüências repetitivas centroméricas têm sido atribuído um papel funcional importante (Redi *et al.*, 1990; Garrido-Ramos *et al.*, 1995; Splijepcevic *et al.*, 1997; Canapa *et al.*, 2002), bem como às teloméricas (Garagna *et al.*, 1995; Nanda *et al.*, 1995; Slijepcevic *et al.*, 1997; Canapa *et al.*, 2002) e não meramente neutra. A HC realiza inúmeras funções essenciais levando consigo genes que podem estar relacionados à viabilidade e fertilidade, e assim sendo uma característica conservada na evolução dos genomas dos eucariotos (Corradini *et al.*, 2007).

O caráter repetitivo das regiões centroméricas e teloméricas pode influir na freqüência de re-ordenamentos estruturais nas regiões circundantes, sendo pontos críticos para a inserção ou retenção de seqüências repetitivas. Estas áreas mostram alterações radicais no ordenamento de genes e são os sítios preferenciais de translocações recíprocas. Algumas análises dos pontos de fusão dos cromossomos que sofreram translocações Robertsonianas (Rb) mostram que os centros de ruptura encontram-se dentro do DNA satélite. Tem sido proposto que a atividade da proteína de união ao DNA centromérico CENP-B facilita estes tipos de re-ordenamentos (Garagna *et al.*, 2001; Kipling & Warburton, 1997).

Caso a grande quantidade de heterocromatinas pericentroméricas e teloméricas dos cromossomos dos Ostraciidae seja um relicto de antepassados Tetraodontiformes, sua ação conjunta deve ter desempenhado um papel

fundamental por meio de diferentes rearranjos cromossômicos ocorridos na modelagem dos cariótipos atuais das diversas linhagens de Tetraodontiformes. Uma vez que as pressões seletivas sobre tais regiões tendem a ser menores, podem ter agido como sítios facilitadores de diferentes tipos de rearranjos como fusões, fissões e inversões cromossômicas, freqüentes em algumas famílias da Ordem.

O grau de condensação das heterocromatinas nas regiões do centrômero pode promover ou prevenir eventos de fusões (Slijepcevic *et al.*, 1997), que por sua vez, parecem ser influenciados pelas seqüências GC-ricas. Regiões centroméricas AT-ricas podem controlar a curvatura do DNA (Canapa *et al.*, 2002), e observou-se que uma maior curvatura do DNA promove a espiralização da cromatina mais rápido (Radic *et al.*, 1987) o que reduz a possibilidade de fusões cêntricas (Garrido-Ramos *et al.*, 1995). Por outro lado regiões GC-ricas são propensas a uma alta taxa de recombinação e poderia favorecer fusões ou fissões cêntricas (Redi *et al.*, 1990). Este parece ser o caso das espécies analisadas de *Acanthostracion*.

Os Tetraodontiformes constituem um grupo pós-Perciformes nos quais controvérsias com respeito a sua filogenia ainda persistem, sobretudo sobre a posição filogenética de Ostraciidae (Holcrof, 2004; Yamanoue *et al.*, 2008), em parte porque apresenta um mosaico morfológico (combinando características de Tetraodontidae, Balistidae e Triacanthoidea). Análises filogenéticas, utilizando todo o genoma mitocondrial, indicaram um relacionamento mais próximo de Ostraciidae com as famílias Triacanthodidae e Triodontidae, membros da subordem Triacanthoidei (Yamanoue *et al.*, 2008), grupos sobre os quais dados cariotípicos e do tamanho do genoma são inexistentes.

Nossos dados em relação à similaridade na localização e composição da porção heterocromática entre os cariótipos das duas espécies de *Acanthostracion* sugerem uma origem comum, e não o resultado de uma evolução convergente que levou a um mero aumento de DNA repetitivo nestas espécies. Tais regiões agindo em concerto poderiam ser responsáveis pela marcante redução genômica experimentada por alguns grupos Tetraodontiformes.

Referências Bibliográficas

- Almeida-Toledo LF, Stocker AJ, Foresti F & Almeida Toledo-Filho S (1996) Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chromosome Research*, 4: 301-305.
- Ameniya, CT & Gold, JR (1986) Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions o fish chromosome. *Copeia*, 226-231.
- Arai R & Katsuyama, I (1976) Chromosome of Tetraodontiform Fishes from Japan. *Bulletin National Science Museum*, 2:59-72.
- Arai R & Nagaiwa, K (1976) Chromosomes of Tetraodontiform Fishes from Japan. *Bulletin National Science Museum*, 2: 59-72.
- Arai R (1983) Karyological and osteological approach to phylogenetic systematic of tetraodontiform fishes. *Bulletin National Science Museum*, Tokio, 9: 175-210.
- Araujo WC, Martinez PA & Molina WF (2010) Mapping of ribosomal DNA by FISH, *EcoRI* digestion and replication bands in the cardinalfish *Apogon americanus* (Perciformes). *Cytologia*, *in press*.
- Biemont C (2008) Within-species variation in genome size. *Heredity*, 101: 297-298.
- Brainerd EL, Slutz SS, Hall EK & Phillis RW (2001) Patterns of genome size evolution in tetraodontiform fishes. *Evolution*, 55: 2363–2368.
- Brutlag DL (1980) Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Annual Review Genetics*, 14:121-44.
- Canapa A, Cerioni N, Barucca M, Olmo, E & Caputo, V (2002) A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Research*, 10: 297-304.
- Caputo V, Colomba M, Nisi Cerioni P, Viturri R, Giovannotti M & Olmo E (2003) Chromosome banding and molecular cytogenetic study of two Mediterranean trachinoid fish species (Teleostei: Trachinidae, Uranoscopidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 103:139-143.
- Cau A, Salvadori S, Deiana AM, Bella JL & Mezzanotte R (1988) The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions and *in situ* digestion with restriction endonucleases. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 47: 223–226.
- Chaves R, Guedes-Pinto H, Heslop-Harrison J & Schwarzacher T (2000) The species and chromosomal distribution of the centromeric alpha-satellite I

- sequence from sheep in the tribe Caprini and other Bovidae. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 91: 62-66.
- Corradini N, Rossi F, Giordano E, Caizzi R, Vern F & Dimitri P (2007) *Drosophila melanogaster* as a model for studying protein-encoding genes that are resident in constitutive heterochromatin. *Heredity*, 98: 3-12.
- Fernandez-Garcia JL, Martínez-Trancón M, Rabasco A & Padilla JA (1998) Characterization of the heterochromatic chromosome regions in sheep. *Genes & Genetic Systems*, 73:45-50.
- Fischer C, Ozouf-Costaz C, Crollius HR, Dasilva C, Jaillon O, Bouneau L, Bonillo C, Weissenbach J, Bernot A (2000) Karyotype and chromosomal location of characteristic *tandem* repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88: 50–55.
- Garagna S, Broccoli D, Redi CA, Searle JB, Cooke HJ & Capanna E (1995) Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. *Chromosoma*, 103: 685-692.
- Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Capanna E & Redi CA (2001) Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proceedings of the National Academy Science, USA* 98:171–175.
- Garrido-Ramos MA, Jamilena M, Lozano R, Ruiz Rejón C & Ruiz Rejón M (1995) The *EcoRI* centromeric satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) contains a sequence motive common to other vertebrate centromeric satellite DNAs. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 71: 345-351.
- Gold Jr LC Shipley NS & Powers PK (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563-575.
- Gregory TR (2001) Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 76: 65–101.
- Hartley SE (1988) Cytogenetic studies of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland *Journal of Fish Biology*, 33: 735–740.
- Holcroft NI (2004) A molecular test of alternative hypotheses of tetraodontiform (Acanthomorpha: Tetraodontiformes) sister group relationships using data from the RAG1 gene. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 32:749–760.
- Howell WM & Black DA (1980). Controller silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: a 1 – step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.

- Jacobina UP, Mello Affonso PRA, Carneiro PLS & Dergan JÁ (2009) Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi, Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 7:617-622.
- Jankun M, Klinger M & Woznicki P (1995) Chromosome variability in European vendace (*Coregonus albula* L.) from Poland. *Caryologia* 48(2): 165–172.
- Kipling D & Warburton PE (1997) Centromeres, CENP-B and Tigger too. *Trends Genetics*, 13:141–145.
- Kitayama E & Ojima Y (1984) Preliminary report on the Phylogeny of five balistid fishes in terms of several chromosome banding techniques in combination with a statistical analysis. *Proceeding Japan Academy*, 60: 95-197.
- Lucchini S, Nardi I, Barsacchi G, Batistoni R & Andronico F (1993) Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S+28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome*, 36: 762–773.
- Mandrioli M, Coughi B, Marini M & Manicardi GC (2001) Cytogenetic analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Chromosome Research*, 8: 237-242.
- Mantovani M, Santos Abel LD, Mestriner CA & Moreira-Filho O (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, 109:161-168.
- Martínez P, Viñas A, Bouza C, Arias J, Amaro R & Sánchez L (1991) Cytogenetical characterization of hatchery stocks and natural populations of Sea and Brown Trout from northwestern Spain. *Heredity* 66: 9–17.
- 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
- Mayr B, Rab P & Kalat M (1986) Localisation of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Salmo gairdneri* and *Salmo trutta* (Pisces, Salmonidae). *Theoretical and Applied Genetics*, 71:703-707.
- Molina WF (2001). An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science*, 5: 149 – 152.
- Molina WF, Shibatta O & Galetti Jr PM (2008) Chromosomal evidence of population subdivision in the freshwater fish *Leporinus elongatus* in the Upper Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 270-274.

- Neafsey DE & Palumbi SR (2003) Genome size evolution in pufferfish: A comparative analysis of diodontid and tetraodontid pufferfish genomes. *Genome research*, 13:821-830.
- Nanda I, Schneider-Rasp M, Winking H & Schmid M (1995) Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosome Research*, 3: 399-409.
- Noieto RB, Vicari MR, Cipriano RR, Artoni RF & Cestari MM (2007) Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in *pufferfishes* (Tetraodontiformes). *Genetica*, 130:133–138.
- Noieto RB, Guimarães FSF, Paludo KS, Vicari MR, Artoni RF & Cestari MM (2009) Genome size evaluation in Tetraodontiform fishes from the Neotropical region. *Marine Biotechnology*, 11(6):680-5.
- Pendás, A.M., P. Mórán, J.P. Freije & E. Garcia-Vásquez, 1994. Chromosomal location and nucleotide sequence of two *tandem* repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 67: 31–36.
- Petrov D A (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genetics*, 17:23–28.
- Pinkel D, Straume T & Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy Science, USA*, 83: 2934 – 2938.
- Probst AV & Almouzni G (2008) Pericentric heterochromatin: Dynamic organization during early development in mammals. *Differentiation*, 76:15-23.
- Radic MZ, Lundgren K & Hamkalo BA (1987) Curvature of mouse satellite DNA and condensation of heterochromatin. *Cell*, 50:1101–1108.
- Redi CA, Garagna S & Zuccotti M (1990) Robertsonian chromosome formation and fixation: the genomic scenario. *Biological Journal Linnean Society*, 41: 235-255.
- Rossi F, Moschetti R, Caizzi R, Corradini N & Dimitri P (2007) Cytogenetic and molecular characterization of heterochromatin gene models in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 175: 595-607.
- Sá-Gabriel LG & Molina WF (2005) Karyotype diversification in fishes of the Balistidae, Diodontidae e Tetraodontidae (Tetraodontiformes). *Caryologia*, 58: 229-237.
- Slijepcevic P, Hande MP, Boufer SD, Lansdorp P & Bryant PE (1997) Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. *Chromosoma*, 106: 413-421.

- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304 – 306.
- Sumner AT (2003) *Chromosomes: organization and function*. Blackwell Science, 84-96.
- Suzuki H, Sakurai S & Matsuda Y (1996) Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 72: 1–4.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27(2 - 3): 190-193.
- Vasconcelos AJM & Molina WF (2009) Cytogenetical studies in five Atlantic Anguiliformes fishes. *Genetics and Molecular Biology*, version online.
- Vicari MR, Artoni RF & Bertollo LAC (2003) Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA. A differential pathway among the fish *Hoplias malabaricus* from Southern Brazil. *Cytogenetics and Genome Research*, 101:24-28.
- Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, Katoh M, Sakai H & Nishida Mutsumi. (2008). A new perspective on phylogeny and evolution of tetraodontiform fishes (Pisces: Acanthopterygii) based on whole mitochondrial genome sequences: Basal ecological diversification? *BMC Evolutionary Biology* 8:212.

CAPÍTULO II

Evidências de relacionamento filogenético
entre as famílias Balistidae e Monacanthidae
(Tetraodontiformes),
através de análises citogenéticas



Evidências de relacionamento filogenético entre as famílias Balistidae e Monacanthidae (Tetraodontiformes), através de análises citogenéticas

Pablo Ariel Martinez, Lorena Bezerra de Lima & Wagner Franco Molina

Resumo

Dentre a grande variedade de peixes marinhos a Ordem Tetraodontiformes destaca-se por sua marcante diversidade. Existem diversos trabalhos examinando as relações filogenéticas dos Tetraodontiformes e em todos os membros das famílias Balistidae e Monacanthidae são considerados grupos irmãos. Embora possua um número representativo de espécies, são poucos os trabalhos citogenéticos envolvendo espécies destas duas famílias, especialmente as insulares. Neste trabalho foram analisadas citogeneticamente as espécies *Cantherhines macrocerus*, *Cantherhines pullus* (Monacanthidae) e *Melichthys niger* (Balistidae). As análises citogenéticas para as três espécies revelaram cariótipo composto de 40 cromossomos, todos acrocêntricos. Ambas possuem apenas um par de RONS e heterocromatina pericentromérica. Estas características, somadas aos dados morfológicos e moleculares sugerem que estas espécies compartilham de um mesmo ramo ancestral, com possível origem monofilética.

Palavras chaves: RONS, heterocromatina, Balistidae, Monacanthidae, cromossomas.

Abstract

Among the great variety of sea fish, the Order Tetraodontiformes stands out for its outstanding diversity. Several works exist examining the phylogenetic relationships of the Tetraodontiformes and all of the members of the families Balistidae and Monacanthidae are considered sister-groups. Although it possesses a representative number of species, there are few cytogenetic studies involving species of these two families, especially the insular ones. In this work, we did cytogenetic analysis of the species *Cantherhines macrocerus*, *Cantherhines pullus* (Monacanthidae) and *Melichthys niger* (Balistidae). The cytogenetic analysis for the three species revealed the cariotype composed of 40 chromosomes, all acrocentrics. Both possess only a pair of NORs and pericentromeric heterochromatin. These characteristics, added to the morphologic and molecular data, suggests that these species share the same ancestral branch, with possible monophyletic origin.

Key words: NORs, heterochromatin, Balistidae, Monacanthidae, chromosomes.

Introdução

Dentre a grande variedade de peixes marinhos, a ordem Tetraodontiformes destaca-se por sua marcante diversidade (Nelson, 2006). Este grupo foi o último ramo da expansão dos Teleósteos, representando uma linhagem pós-Perciformes (Elmerot *et al.*, 2002) e embora seja geralmente reconhecido como um grupo monofilético, as relações de parentesco entre suas famílias e gêneros ainda não estão claramente definidas (Holcroft, 2004).

Existem diversos trabalhos examinando as relações filogenéticas dos Tetraodontiformes em seus vários níveis de organização (para revisão consultar Holcroft, 2005). Com base tanto em similaridades morfológicas (como por exemplo, caracteres osteológicos e miológicos), como em estudos moleculares (com gene mitocondrial RAG1 e dados de conteúdo de DNA), os membros das famílias Balistidae e Monacanthidae, as quais são consideradas grupos irmãos, apresentam uma origem monofilética (Brainerd *et al.*, 2001; Holcroft, 2004; Holcroft, 2005).

Das cerca de 400 espécies de Tetraodontiformes existentes, aproximadamente 60 espécies foram estudadas citogeneticamente (Brum & Galleti, 1997). Entre os Balistidae, 19 espécies foram cariotipadas, sendo a maioria dos trabalhos desenvolvidos para espécies do Pacífico e apenas três espécies da costa do Brasil apresentam cariótipos descritos. Em relação à família Monacanthidae este número torna-se mais reduzido, com oito espécies descritas, sendo uma da costa brasileira (ver Tabela 1).

Neste trabalho foi realizado uma reavaliação dos dados citogenéticos das espécies *Melichthys niger* (Balistidae), *Cantherhines macrocerus* (Monacanthidae) e *Cantherhines pullus* (Monacanthidae) como forma de enriquecer as informações disponíveis para estes grupos analisadas.

Material e métodos

Foram analisados 18 exemplares de *Melichthys niger* (Balistidae), 10 de *Cantherhines macrocerus* (Monacanthidae), coletados no Arquipélago de São Pedro e São Paulo (00° 55'15" N-029°20'60" W), distante 1.010 km da costa do Rio Grande do Norte, Brasil e dois exemplares de *Cantherhines pullus*

(Monacanthidae), coletados no litoral de Salvador (12°58'S, 38°31'W), Bahia, NE do Brasil.

Precedendo a obtenção de cromossomos mitóticos para estas espécies foi realizada a estimulação mitótica, conforme descrito por Molina (2001).

A obtenção de cromossomos mitóticos seguiu a técnica descrita por Gold *et al.*, (1990). Os cromossomos foram classificados de acordo ao tamanho. As regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram identificadas através da técnica preconizada por Howell & Black (1980), e foram corroboradas a partir de FISH com sonda 18S (Pinkel *et al.*, 1986). Para o bandamento C foi utilizado o procedimento clássico descrito por Sumner (1972) e utilizou-se fluorocromos base específicos DAPI-CMA3 de acordo a Schwizer (1980).

Resultados

Determinou-se para *Melichthys niger* um número diplóide $2n=40$ cromossomos. O cariótipo da espécie é constituído por 20 pares de cromossomos acrocêntricos (NF=40). Verificou-se a presença de uma constrição secundária visível em posição intersticial no 2° par cromossômico, correspondentes aos sítios Ag-RONs evidenciados pela coloração com nitrato de prata, esta situação foi corroborada a partir da hibridação *in situ* com a sonda ribossomal 18S (Figura 1a).

As regiões heterocromáticas mostraram-se dispersas em posição pericentromérica na maioria dos pares (Figura 1b), com uma marcação mais intensa sobre o 2° par cromossômico, sobreposto à localização das RONs, região que se mostrou CMA₃ + e DAPI - a partir da dupla coloração com estes fluorocromos (Figura 1a).

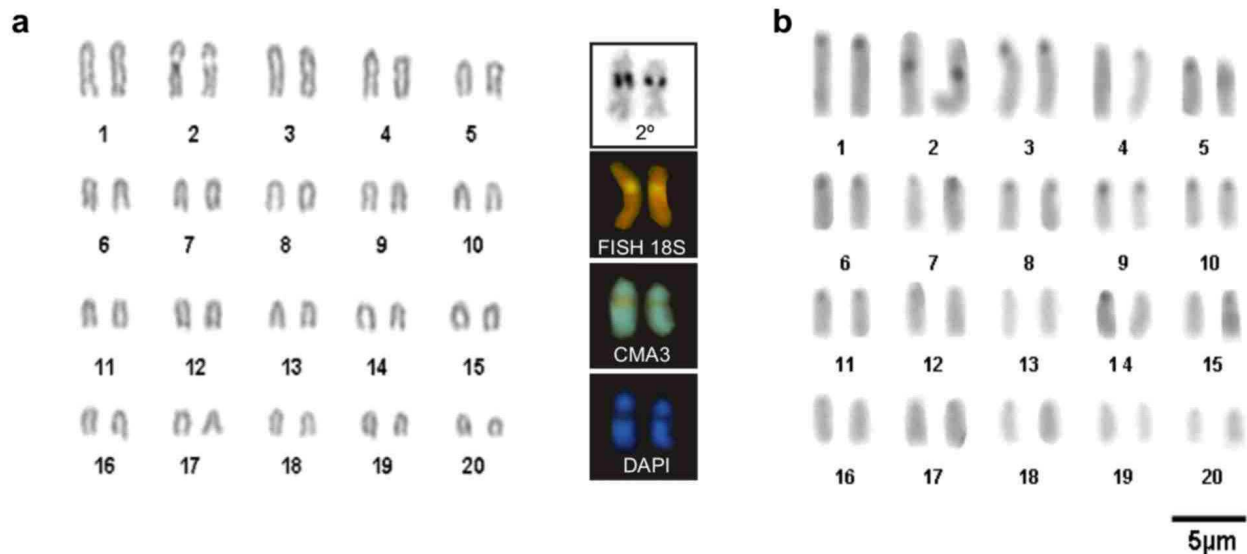


Figura 1. Cariótipos de *Melichthys Niger* a partir de coloração convencional **(a)** e bandamento C **(b)**. Em destaque o par organizador nucleolar (2°) corado com impregnação argêntea, FISH com sonda rDNA 18S, CMA₃ e DAPI; (b) Bandamento C. Barra=5µm.

As análises citogenéticas realizadas em *C. macrocerus* (Monacanthidae) permitiram estabelecer o valor diplóide desta espécie em $2n=40$. O cariótipo é composto de 20 pares de cromossomos, todos acrocêntricos (Figura 2a). Os sítios ribossomais estão localizados intersticialmente em um único par acrocêntrico mediano (7°).

Nas metáfases de *C. macrocerus* tratadas com nitrato de prata, um par cromossômico apresentou marcação positivas, o qual foi corroborado a partir de FISH com sondas de sequências ribossomais 18S (Figura 2a). Quando submetidas ao bandamento C, os cromossomos de *C. macrocerus* revelaram blocos heterocromáticos em posição centromérica na maioria dos pares (Figura 2b).

Em *C. pullus* foram realizadas contagens cromossômicas que permitiram identificar o número diplóide desta espécie igual a $2n=40$, onde o cariótipo é constituído por 20 pares de cromossomos acrocêntricos (Figura 3a).

As regiões organizadoras do nucléolo foram identificadas como marcações simples no 5° par do complemento, em posição pericentromérica, as quais foram também identificadas com FISH 18S (Figura 3a). As regiões heterocromáticas nesta espécie estão distribuídas em posição pericentromérica em todos os cromossomos. No 5° par cromossômico, além da marcação

pericentromérica, observou-se uma marcação positiva congruente às RONS (Figura 3b), a qual ao ser analisadas com fluorocromos DAPI-CMA3 mostraram-se G-C ricas (Figura 3a).

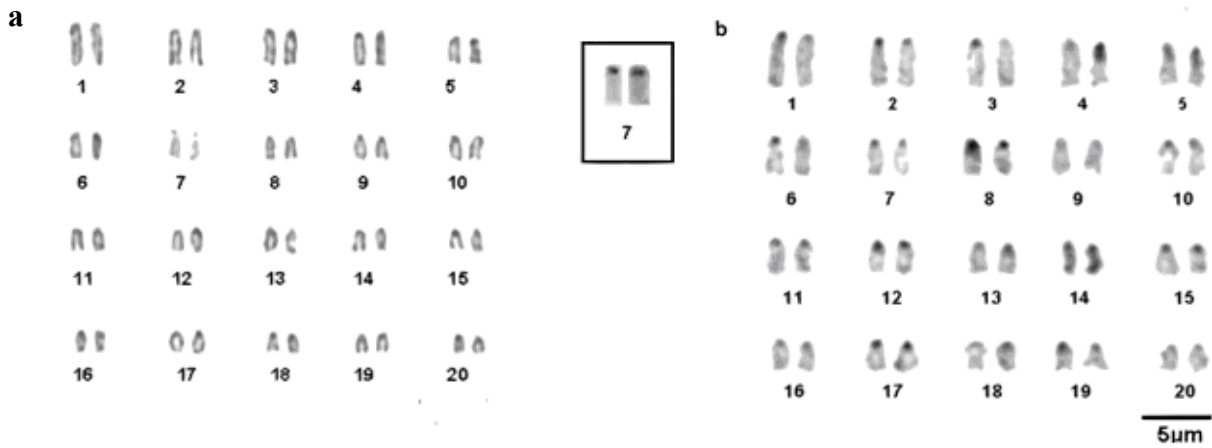


Figura 2. Cariótipos de *Cantherhines macrocerus* a partir de coloração convencional (a) e bandamento C (b). Em destaque o par organizador nucleolar (7º par). Barra=5µm.

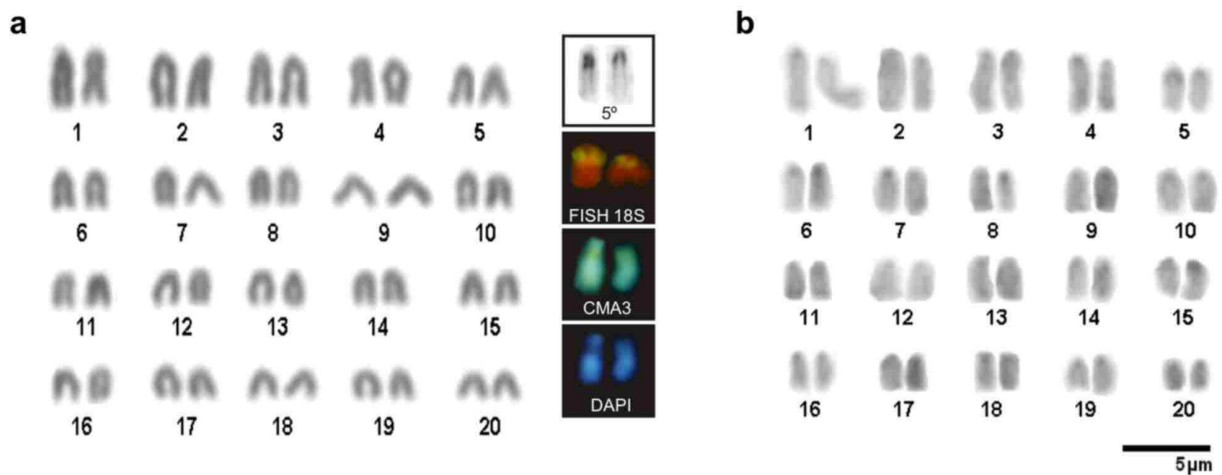


Figura 3. Cariótipo de *Cantherhines pullus* a partir de coloração convencional (a) e bandamento C (b). Em destaque o par organizador nucleolar (5º) corado com impregnação argêntea, FISH com sonda de rDNA 18S, DAPI e CMA3. Barra=5µm.

Discussão

Na família Monacanthidae até o momento existem oito espécies cariotipadas, das quais seis possuem números diplóides variando de 33 a 36 cromossomos (ver Tabela 1). Apenas as espécies *Navodon modestus* e *Cantherhines pardalis* possuem número diplóide igual a 40 cromossomos. Neste sentido, as espécies *C. macrocerus* e *C. pullus* demonstra conservadorismo em relação ao padrão descrito para o gênero *Cantherhines* ($2n=40$ acrocêntricos). Porém, este número diplóide é elevado quando comparado às demais espécies da família que já foram analisadas ($2n$ 33-36) (ver Tabela 1). Estes dados situam *C. macrocerus* e *C. pullus*, que embora pertençam à família Monacanthidae, a uma condição mais próxima daquela encontrada na família Balistidae.

Tabela 1. Dados cariotípicos disponíveis para as famílias Balistidae e Monacanthidae.

FAMÍLIA	ESPÉCIES	2n	FÓRMULA CROMOSSÔMICA	NF	REFERÊNCIAS
BALISTIDAE					
	<i>Balistapus undulatus</i>	42	42st/a	42	Takai e Ojima, 1987
	<i>Balistes vetula</i>	44		44	Sá-Gabriel e Molina, 2005
	<i>Balistoides conspicillum</i>	44	44st/a	44	Takai e Ojima, 1987
	<i>B. viridescens</i>	44	2m + 2sm +40st/a	48	Takai e Ojima, 1988
	<i>Carolinensis gmelin</i>	44	44a	-	Thode, <i>et al.</i> , 1994
	<i>Melichthys niger</i>	40		40	Sá-Gabriel e Molina, 2005
	<i>M. vidua</i>	40	40st/a	40	Kytayama e Ojima, 1984
	<i>Odonus niger</i>	42	42st/a	42	Kitayama e Ojima, 1984
	<i>Parika scaber</i>	40	40st/a	40	Murofushi <i>et al.</i> , 1989
	<i>Pseudobalistes flavimarginatus</i>	44	2sm + 42st/a	46	Arai e Nagaiwa, 1976
	<i>Rhineacanthus aculeatus</i>	44	44st/a	44	Arai e Nagaiwa, 1976
	<i>R. echarpe</i>	44	44st/a	44	Kitayama e Ojima, 1984
	<i>R. verrucosus</i>	44	44st/a	44	Arai e Nagaiwa, 1976
	<i>Rucanus arcodas</i>	36	36st/a	36	Arai e Nagaiwa, 1976
	<i>Sufflamen chysopterus</i>	46	46st/a	46	Arai e Nagaiwa, 1976
	<i>S. traenatus</i>	46	46st/a	46	Takai e Ojima, 1987
MONACANTHIDAE					
	<i>Cantherhines pardalis</i>	40	40st/a	40	Arai e Nagaiwa, 1976
	<i>Navodon modestus</i>	40	40st/a	40	Murofushi e Yosida, 1979
	<i>Stephanolepis cirrhifer (F)</i>	34	34st/a	34	Murofushi <i>et al.</i> , 1980
	<i>S. cirrhifer (M)</i>	33	33st/a	34	Murofushi <i>et al.</i> , 1980
	<i>S. hispidus (M)</i>	33	33st/a	34	Sá-Gabriel e Molina, 2005
	<i>S. hispidus (F)</i>	34	34st/a	34	Sá-Gabriel e Molina, 2005
	<i>S. japonicus</i>	34	34st/a	34	Murofushi e Yosida, 1979
	<i>Paramonacanthus japonicus</i>	34	34st/a	34	Murofushi e Yosida, 1979
	<i>Rudarius ercodes</i>	36	36st/a	36	Arai e Nagaiwa, 1976
	<i>Oxymonacanthus longirostris</i>	36	36st/a	36	Arai e Nagaiwa, 1976

Os dados citogenéticos obtidos para a população de *C. macrocerus* do Arquipélago de São Pedro e São Paulo são coincidentes com as observadas por Pauls *et al.*, (1993) para exemplares desta espécie coletados no estado do Rio de Janeiro (sudeste do Brasil), apesar destas populações estarem separadas por cerca de 2.000Km. A maioria dos peixes recifais apresenta ciclos de vida que em se alternam adultos sedentários com larvas pelágicas, onde durante o período larval ocorre a dispersão destas espécies, colonizando novas regiões, próximas ou distantes dos locais de desova (Galetti *et al.*, 2006). Assim, a manutenção da constância cariotípica encontrada nas populações de *C. macrocerus* talvez se deva pelo favorecimento do fluxo gênico através das correntes oceânicas (Rocha, 2003; Feitoza *et al.*, 2005).

Sá-Gabriel & Molina (2005) determinaram para a espécie *Melichthys niger* número diplóide e fundamental iguais a 40 cromossomos, todos acrocêntricos, com regiões organizadoras do nucléolo (RONs) situadas em posição intersticial no 5° par. As análises realizadas neste trabalho confirmam o número diplóide e o número fundamental obtidos anteriormente, mas demonstrou um resultado discordante no que diz respeito à localização das RONs. Os dados obtidos neste estudo revelaram que as regiões organizadoras do nucléolo estão situadas na constrição secundária presente no 2° par do cariótipo, o qual foi confirmado com hibridação *in situ* com sonda ribossomais 18S. Este trabalho observou através do bandamento C uma marcação positiva nesta constrição, demonstrando que as RONs coincidem com as regiões heterocromáticas nesta espécie. Esta variação na identificação do par organizador nucleolar pode ser devido a diferentes níveis de condensação cromossômica existentes entre o material analisado pelos autores.

Os cístrons ribossomais correspondem às seqüências dos genes que codificam o RNA ribossomal 5S e o precursor 45S dos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5,8S. Estas seqüências ocorrem em tandem (série de repetições seqüenciais), podendo estar distribuídas por um ou mais pares cromossômicos. Uma característica importante das seqüências 5S e 45S é que são muito conservadas evolutivamente, o que significa que elas são muito similares em todos os eucariotos. As RONs são freqüentemente utilizadas como marcadores citotaxonômicos na citogenética de peixes, onde a distribuição dos sítios cromossômicos de DNAr 45S tem sido amplamente estudada por intermédio da

impregnação com nitrato de prata, a qual se associa a proteínas nucleolares envolvidas com a atividade transcricional dos genes ribossomais e não diretamente ao DNAr, sendo por isso considerado um método indireto de localização das RONS, mostrando a funcionalidade das RONS (Santani *et al.*, 2002) e a localização com sondas FISH 18S permitiria uma localização estrutural da seqüências.

Em *M. niger* observou-se um polimorfismo das regiões organizadoras nucleolares, estes casos são freqüentemente descritos na literatura, ocorrendo, por exemplo, marcações em pares não homólogos, marcações de tamanhos diferentes no mesmo par ou ainda apenas um dos homólogos marcado (Martins & Galetti, 2001; Diniz & Bertollo, 2006). Um dos motivos seria a própria natureza das RONS. Apesar da seqüência de rDNA 45s ser conservada em geral, o tamanho destas é extremamente variável, devido ao fato de serem formadas por repetições em *tandem*, onde o número de vezes que estão presentes em um cromossomo pode variar, alterando conseqüentemente o seu tamanho. Heteromorfismos das RONS também podem ser resultado de *crossing-over* desigual envolvendo os sítios de rDNA, favorecido, por exemplo, por seqüências como elementos de transposição que atuam como *hot-spots* de recombinação com o DNAr (Mandrioli, 1999). Outro fator a ser considerado é a presença de heterocromatina associada às RONS. Foi demonstrado em *M. niger* que os sítios ribossomais são coincidentes com as regiões heterocromáticas. A associação entre RONS e heterocromatina é freqüentemente descrita em peixes, onde estas regiões mostram-se adjacentes às RONS, sobrepondo-se ou intercalando-se à elas nos cromossomos, favorecendo rearranjos nos pares portadores destas regiões (Vicari *et al.*, 2003).

As características citogenéticas descritas neste trabalho para *C. macrocerus*, *C. pullus* e *M. niger*, como presença de RONS simples e heterocromatina pericentromérica, representam o fenótipo mais comum para a maioria das espécies de Tetraodontiformes analisadas (Grützner *et al.*, 1999; Mandrioli, 2000; Fischer *et al.*, 2000; Sá-Gabriel e Molina, 2005; Noleto *et al.*, 2006), somando-se aos inúmeros resultados já descritos para outras Ordens de peixes, como Perciformes (Nirchio *et al.*, 2007), Mugiliformes (Nirchio *et al.*, 2009) Beryciformes (Galetti *et al.*, 2000), Salmoniformes (Porto-Foresti *et al.*,

2004), corrobora a proposição de que estas são características plesiomórficas para Teleostei.

Em *M. niger* foi observada um segmento heterocromático na constrição secundária do 2° par cromossômico. Uma vez que a heterocromatina em peixes localiza-se preferencialmente nos centrômeros e que a heterocromatina constitutiva é frequentemente associada com a diversificação cariotípica (Molina, 1995; Mantovani *et al.*, 2000; Molina & Oliveira, 2006). Kytayama & Ojima (1984) descreveram resultados semelhantes para uma espécie do mesmo gênero, *Melichthys vidua*. Esta espécie possui número diplóide e fundamental iguais a 40, com uma constrição secundária em dois dos pares grandes e que também apresentou marcação positiva ao tratamento de banda C. Segundo estes autores, isto seria resultado de uma fusão em *tandem* envolvendo estas regiões. Desta forma, este mecanismo parece ter sido importante na diferenciação destas espécies de Balistidae. A redução numérica observada tanto em Balistidae como em Monacanthidae, quando estabelecida um parentesco filogenético basal com os Perciformes, parece demonstrar que eventos de fusões em tandem, constituem um dos principais mecanismos de evolução cariotípica para estes grupos pós-Perciformes.

Entre os Perciformes, a presença de RONS simples e em posição intersticial é uma situação freqüente, representando uma condição basal. Da mesma forma, a presença de heterocromatina restrita às regiões centroméricas também é um traço característico neste grupo (Molina & Galetti, 2002). Os dados obtidos para RONS e regiões heterocromáticas para *C. macrocerus*, *C. pullus* e *M. niger* estão de acordo com os resultados disponíveis para as espécies de Perciformes analisadas, demonstrando um aparente conservadorismo destes caracteres.

Estes dados sustentam a hipótese de que os processos de fusões e fissões foram predominantes para o estabelecimento dos cariótipos de Balistidae e Monacanthidae (Kitayama & Ojima, 1984; Sá-Gabriel & Molina, 2005).

Estudos comparativos utilizando dados morfológicos e moleculares sugerem que as famílias Balistidae e Monacanthidae formam a superfamília Balistoidea (Brainerd *et al.*, 2001; Neafsey & Palumbi, 2003; Holcroft, 2004; Holcroft, 2005). Esta proposição parece ser corroborada também pelos dados

citogenéticos disponíveis na literatura e obtidos no presente trabalho, que demonstram as similaridades cariotípicas existentes entre estas famílias, dando indicações de que Monacanthidae e Balistidae possuem maior afinidade filogenética entre si do que com os demais grupos da Ordem Tetraodontiformes.

Referências bibliográficas

- Arai R & Nagaiwa K (1976) Chromosomes of tetraodontiform fishes from Japan. *Ibid.*, 2: 59-72.
- Brainerd, EL, Slutz, SS, Hall, EK & Phillis, RW (2001) Patterns of genome size evolution in tetraodontiform fishes. *Evolution*, 55: 2363–2368.
- Brum MJJ & Galetti Jr. PM (1997) Teleostei ground plan karyotype. *Journal of Computational Biology*, 2:91-102.
- Diniz D & Bertollo LAC (2006) Intra- and inter-individual chromosome variation in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). A population study from the Brazilian São Francisco river basin. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 453-458.
- Elmerot C, Arnason U, Gojobori T & Janke A (2002) The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. *Gene* 295, 163–172.
- Feitoza BM, Rosa RS & Rocha LA (2005). Ecology and zoogeography of deep-reef fishes in northeastern Brazil. *Bulletin of Marine Science*, 76(3): 725–742.
- Fischer C, Ozouf-Costaz C, Crollius HR, Dasilva C, Jaillon O, Bouneau L, Bonillo C, Weissenbach J & Bernot A (2000) Karyotype and chromosomal location of characteristic tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88:50–55.
- Galletti Jr. P, Aguilar CT & Molina WF (2000) Na overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia*, 420:55-62.
- Galetti Jr. PM, Molina WF, Affonso PRAM & Aguilar CT (2006) Assessing genetic diversity of Brazilian reef fishes by chromosomal and DNA markers. *Genetica*, 126:161-177.
- Gold Jr, LC, Shipley NS & Powers PK (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal Fish Biology*. 37: 563-575.

- Grützner F, Lütjens G, Rovira C, Barnes DW, Ropers H-H & Haaf T (1999) Classical and molecular cytogenetics of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Chromosome Research*, 7:655–662.
- Holcroft NI (2004) A molecular test of alternative hypotheses of tetraodontiform (Acanthomorpha: Tetraodontiformes) sister group relationships using data from the RAG1 gene. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 32:749–760.
- Holcroft NI (2005) A molecular analysis of the interrelationships of tetraodontiform fishes (Acanthomorpha: Tetraodontiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 525-544.
- Howell WM & Black DA (1980). Controller silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: a 1 – step method. *Experientia*. 36: 1014-1015.
- Kitayama E & Ojima Y (1984) Preliminary report on the Phylogeny of five balistid fish in terms of several chromosome banding techniques in combination with a statistical analysis. *Proceedings of the Japan Academy Series. B*, 60(3): 95-197.
- Mandrioli M, Manicardi GC, Bizzaro D & Bianchi U (1999) NOR heteromorphism within a parthenogenetic lineage of the aphid *Megoura viciae*. *Chromosome Research*, 7: 157-162.
- Mandrioli M (2000) Cytogenetic analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes) *Chromosome Research*, 8: (3) 237-242.
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA & Moreira-Filho O (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica (The Hague)*, 109: 161-168.
- Martins C & Galetti Jr. PM (2001) Two 5S rDNA arrays in neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica (The Hague)*, 111:439-446.
- Molina WF (1995) Cromossomos Sexuais e Polimorfismo Cromossômico no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Master's Thesis. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, Brazil.
- Molina WF (2001). An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science*, 5: 149 – 152.
- Molina WF & Galetti Jr. PM (2002) Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4):373-377.
- Molina WF & Oliveira TB (2006) Themis Oliveira de Freitas . Structural and numerical chromosomal variation in marine Perciformes (Priacanthidae and Gerreidae). *Cytologia, Japão*, 71(3): 237-242.

- Murofushi M, Nakatsubo T & Smith PJ (1989) Karyological study on the New Zealand leather jacket, *Perika scaber*, fish of the order Tetraodontiformes. *Bulletin of Biogeographic Society Japan*, 44: 35-58.
- Murofushi M & Yosida TH (1979) Cytogenetical studies on fishes. Karyotypes of four filefishes. *Japan of Journal Genetic*, 54: 191-195.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the World*. John Willey and Sons Inc., New York. Fourth edition. 601p.
- Neafsey DE & Palumbi SR (2003) Genome size evolution in pufferfish: a comparative analysis of diodontid and tetraodontid pufferfish genomes. *Genome Research*, 5: 821-30.
- Nirchio M, Gaviria JI, Oliveira C, Ferreira IA & Martins C (2007) Cytogenetic analysis of three species of the *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita Island, Venezuela. *Genetica* 131:135-140.
- Nirchio M, Oliveira C, Ferreira IA, Martins C, Rossi AR & Sola L (2009) Classical and molecular cytogenetic characterization of *Agonostomus monticola*, a primitive species of Mugilidae (Mugiliformes). *Genetica*, 135:1-5.
- Noletto RB, Vicari MR, Cipriano RR, Artoni RF & Cestari MM (2006) Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). *Genetica*, 133-138.
- Pauls E (1993) *Estudos citogenéticos em peixes marinhos visando o melhoramento genético*. Thesis. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.
- Pinkel D, Straume T & Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *PNAS*, 83: 2934 – 2938.
- Porto-Foresti F, Oliveira C, Gomes EA, Tabata YA, Rigolino MG & Foresti F (2004) A lethal effect associated with polymorphism of the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Genetics and Molecular Biology*, 27, pp. 51–54.
- Rocha LA (2003) Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *Journal of Biogeography*, 30:1161-1171.
- Sá-Gabriel LG & Molina WF (2005) Karyotype diversification in fishes of the Balistidae, Diodontidae e Tetraodontidae (Tetraodontiformes). *Caryologia*, 58: 229-237.
- Santani A, Raudsepp T & Chowdhary BP (2002) Interstitial telomeric sites and NORs in Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*) chromosomes. *Chromosome Research* 10:527–534.

- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27(2 - 3): 190-193.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304 – 306.
- Takai A & Ojima Y (1987) Comparative chromosomal studies in three balistid fishes. *Kromosomo (Tokyo)*, 7-48.
- Thode G, Amores A & Martinez G (1994) The Karyotype Of Balistes: *Carolinensis gmelin* (Pisces, Tetraodontiformes) A Specialized Species. *Caryologia*, 47 (3-4): 257-263.
- Vicari MR, Artoni RF & Bertollo LAC (2003) Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA. A differential pathway among the fish *Hoplias malabaricus* from Southern Brazil, *Cytogenetic and Genome Research* 101:24–28.

CAPÍTULO III

**Sítios ribossomais simples, condição plesiomórfica
na diversificada família Tetraodontidae
(Osteichthyes, Tetraodontiformes)**



Sítios ribossomais simples, condição plesiomórfica na diversificada família Tetraodontidae (Osteichthyes, Tetraodontiformes)

Pablo Ariel Martinez & Wagner Franco Molina

Resumo

A família Tetraodontidae tem sido apontada como modelo para evolução genômica em vertebrados. Este grupo de peixes caracteriza-se pela relativa constância de valores diplóides dentro dos gêneros e diversificação da sua macroestrutura cariotípica. Ainda existem grandes lacunas sobre características cromossômicas basais para esta família. Aqui são apresentadas as descrições cariotípicas de duas espécies consideradas basais dentro da família *Lagocephalus laevigatus* e *Colomesus psittacus*, através de coloração convencional, impregnação com nitrato de prata (Ag-RONs) e bandamento C. O cariótipo de *L. laevigatus* apresentou $2n=44$ cromossomos (12m+16sm+16a) (NF=72), com sítios Ag-RONs simples, heterocromáticos, evidenciados em posição intersticial do 15º par. O padrão de distribuição da heterocromatina no cariótipo desta espécie revelou pequena quantidade de heterocromatina restrita a regiões centroméricas de alguns cromossomos. *C. psittacus* apresentou $2n=56$ (16m+8sm+28st+4a) (NF=108), com RONS múltiplas localizadas no braço curto de dois pares cromossômicos (10º e 24º). Blocos de heterocromatina estavam presentes nas regiões centroméricas da maioria dos pares cromossômicos e nos braços curtos e regiões teloméricas de alguns cromossomos. A grande diversificação cromossômica desta família, possivelmente está atrelada a sua relação com os diferentes habitats que ocupam, sobretudo, à alta produtividade, complexidade espacial e ecológica dos recifes de coral. A disseminada ocorrência de sítios ribossomais simples e presença de pouca heterocromatina, algumas vezes concentrada em alguns pares cromossômicos, nas espécies mais basais, indicam possivelmente que tais caracteres refletem características simplesiomórficas para esta família.

Palavras chaves: Tetraodontidae, citogenética de peixes, Ag-RONs, redução genômica.

Abstract

The family Tetraodontidae has been the model of genomic evolution in vertebrates. This group is characterized by the relative constancy of the diploids values into the genres and the diversification of its karyotypic macrostructure. Despite these facts, there are gaps concerning the researches about the basal characteristics of this family. Hence, in the present study are showed the karyotypic descriptions of two basal species (*Lagocephalus laevigatus* and *Colomesus psittacus*) into the family utilizing usual coloration, silver nitrate impregnation (Ag-RONs) and C-band. *Lagocephalus laevigatus* karyotype was $2n = 44$ chromosomes (12m + 16sm + 16a) (NF = 72), simple Ag-RONs sites, heterochromatic, in evidence on the interstitial position of the pair 15°. The heterochromatin standard distribution on this specie karyotype revealed a small

quantity of heterochromatin restricted to centromeric regions of some chromosomes. *Colomesus psittacus* was $2n = 56$ (16m + 8sm + 28st + 4a) (NF = 108) with multiples RONS localized on the short arm of two chromosomal pairs (10° e 24°). Heterochromatin blocks were presents on the centromeric regions of the majority chromosomes pairs, on the shorts arms and telomeric regions of some chromosomes. The great chromosomal diversification in the Tetraodontidae family probably is explained by the range of habits that this family inhabits, especially, the high productivity and spatial and ecological complexity of coral reefs. Disseminated occurrence of simple ribosomal sites and the presence of little heterochromatin on the basal species, sometimes concentrated in some chromosomes pairs, denote probably characters concerning simplesiomorphic characteristics to this family.

Keys words: Tetraodontidae, fish cytogenetics, Ag-NORs, genome reduction.

Introdução

Estudos citogenéticos têm contribuído amplamente na taxonomia dos peixes neotropicais. Entre as informações citogenéticas mais abundantemente disponíveis e importantes para inferências citotaxonômicas e filogenéticas (Bertollo *et al.*, 1986; 2000) se destacam a localização e freqüência dos cístrons ribossomais ativos e o conteúdo e distribuição dos segmentos heterocromáticos no cariótipo condições polimórficas inter e intra-específicas (Amemiya & Gold, 1988; Cestari & Galetti Jr. 1992; Galetti Jr. 1998; Almeida-Toledo, 2000; Mantovani *et al.*, 2000; entre outros).

Os *pufferfishes* possuem os menores genomas entre os vertebrados (Noleto *et al.*, 2009), no qual estão presentes pequenos íntrons e ausentes grandes grupos de seqüências repetitivas e pseudogenes (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 1997). Apesar das grandes modificações genômicas sofridas pelo grupo, suas informações citogenéticas ainda são escassas e provenientes em grande parte de descrições citogenéticas desenvolvidos nos anos 70' e 80', oferecendo portanto poucas informações a respeito de sua composição heterocromática e as regiões organizadoras nucleolares das diferentes espécies.

Em peixes tendências gerais de conservadorismo ou diversificação cromossômica tem sido observadas. Assim, em alguns grupos a evolução cromossômica demonstrou ser pouco divergente, nestes casos, famílias

inteiras, ou mesmo agrupamentos de famílias podem compartilhar a mesma estrutura cariotípica básica e igual número cromossômico. Em contraste, vários grupos de peixes mostram uma evolução cromossômica extremamente divergente, tanto quanto ao valor diplóide quanto a macroestrutura cariotípica (Galetti *et al.*, 1994; Molina, 2007). Fazendo parte desta última condição encontram-se os membros da família Tetraodontidae, nos quais observam-se espécies com $2n=28$ até $2n=46$, e $NF=36$ até $NF=78$ (para revisão ver Sá-Gabriel & Molina, 2005).

Visando contribuir no estabelecimento de padrões cromossômicos basais em Tetraodontidae foram analisadas as espécies *Lagocephalus laevigatus* e *Colomesus psittacus*, através de coloração convencional, impregnação com nitrato de prata (Ag-RONs) e bandamento C.

Materiais e métodos

Os exemplares analisados são provenientes de diferentes localidades do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. As amostras consistiram de três indivíduos de *Lagocephalus laevigatus*, dois da praia de Ponta Negra (1 macho e 1 fêmea) - Natal ($5^{\circ}52'S$, $35^{\circ}10'O$) e um de Barra do Cunhaú (1 macho) ($6^{\circ}18'S$, $35^{\circ}01'O$), e cinco indivíduos de *Colomesus psittacus*, coletados na desembocadura do Rio Potengi (1 macho) – Natal ($5^{\circ}45'S$, $35^{\circ}12'O$), Tibau do Sul (1 fêmea) ($6^{\circ}11'S$, $35^{\circ}05'O$) e de Barra do Cunhaú (2 machos e 1 fêmea) ($6^{\circ}18'S$, $35^{\circ}01'O$). Após a coleta os indivíduos foram submetidos à estimulação mitótica, *in vivo*, com aplicação intramuscular e peritoneal de Munolan® (complexo de antígenos bacterianos e fúngicos) ou Aminovac® na razão de um comprimido diluído em 0,5 ml de água na proporção de 100g de peso do animal overnight (Molina, 2001; Molina *et al.*, em preparação). As preparações cromossômicas seguiram a metodologia preconizada por Gold *et al.* (1990). As Ag-RONs foram detectadas de acordo a técnica de Howell & Black (1980) e a banda C foi realizada a partir do protocolo de Sumner (1972).

Resultados

A espécie *L. laevigatus* apresentou um número diplóide $2n=44$, com fórmula cariotípica de $12m+16sm+16a$ (NF=72). O cariótipo apresenta cromossomos de tamanho reduzido, com o maior par cromossômico (7º par, sm) apresentando cerca de 2,5 μm . As RONS localizam-se na constrição secundária intersticial do 15º par acrocêntrico, abrangendo metade do braço maior (Figura 1). Blocos heterocromáticos estão localizados nas regiões centroméricas de alguns pares cromossômicos, assim como na constrição secundária do par organizador nucleolar (15º par).

C. psittacus exibiu um valor diplóide igual a $2n=56$ ($16m+8sm+28st+4a$) e NF=108. As RONS localizaram-se em dois pares cromossômicos, nos braços curtos do 10º par submetacêntrico e do 24º par subtelocêntrico. O bandamento C, revelou blocos heterocromáticos nas regiões centroméricas de todos os cromossomos, estendendo-se nos braços curtos de vários pares, bem como marcações teloméricas no braço longo do 23º par (Figura 2).

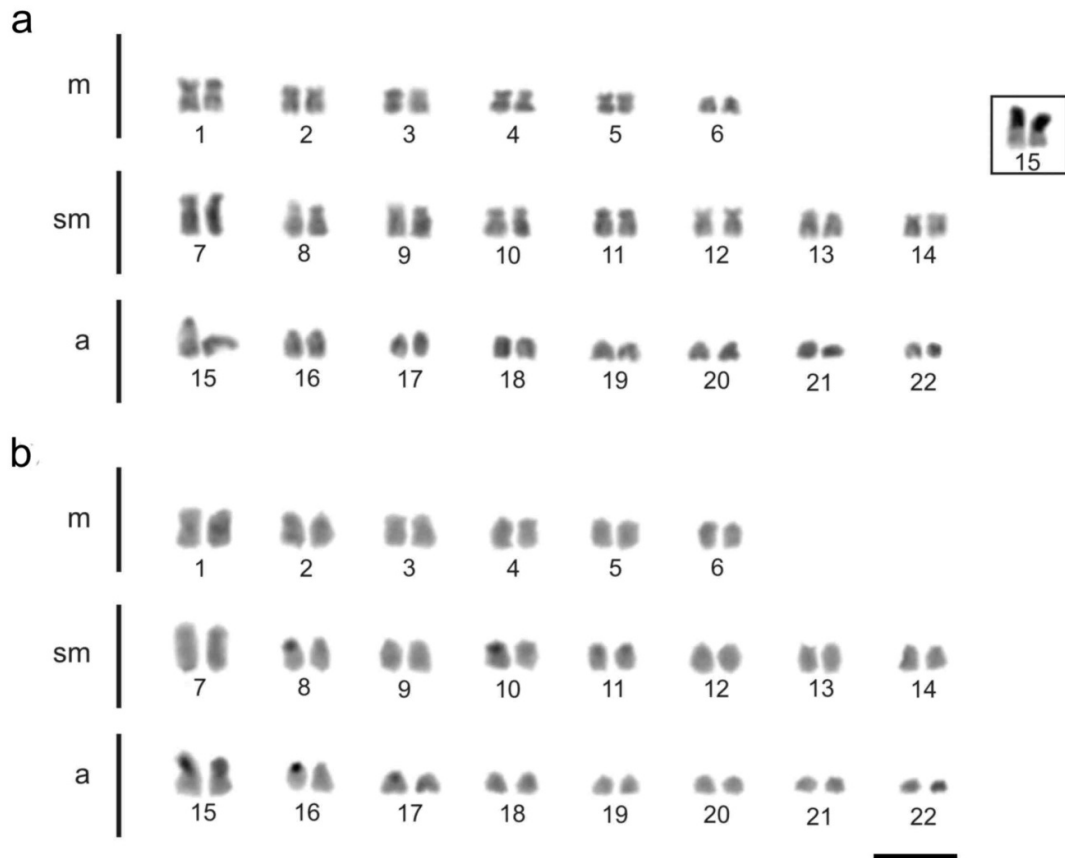


Figura 1. Cariótipo de *Lagocephalus laevigatus* a partir de **(a)** coloração convencional e **(b)** bandamento C. Em destaque se observam as regiões organizadoras nucleolares. Barra=5µm.

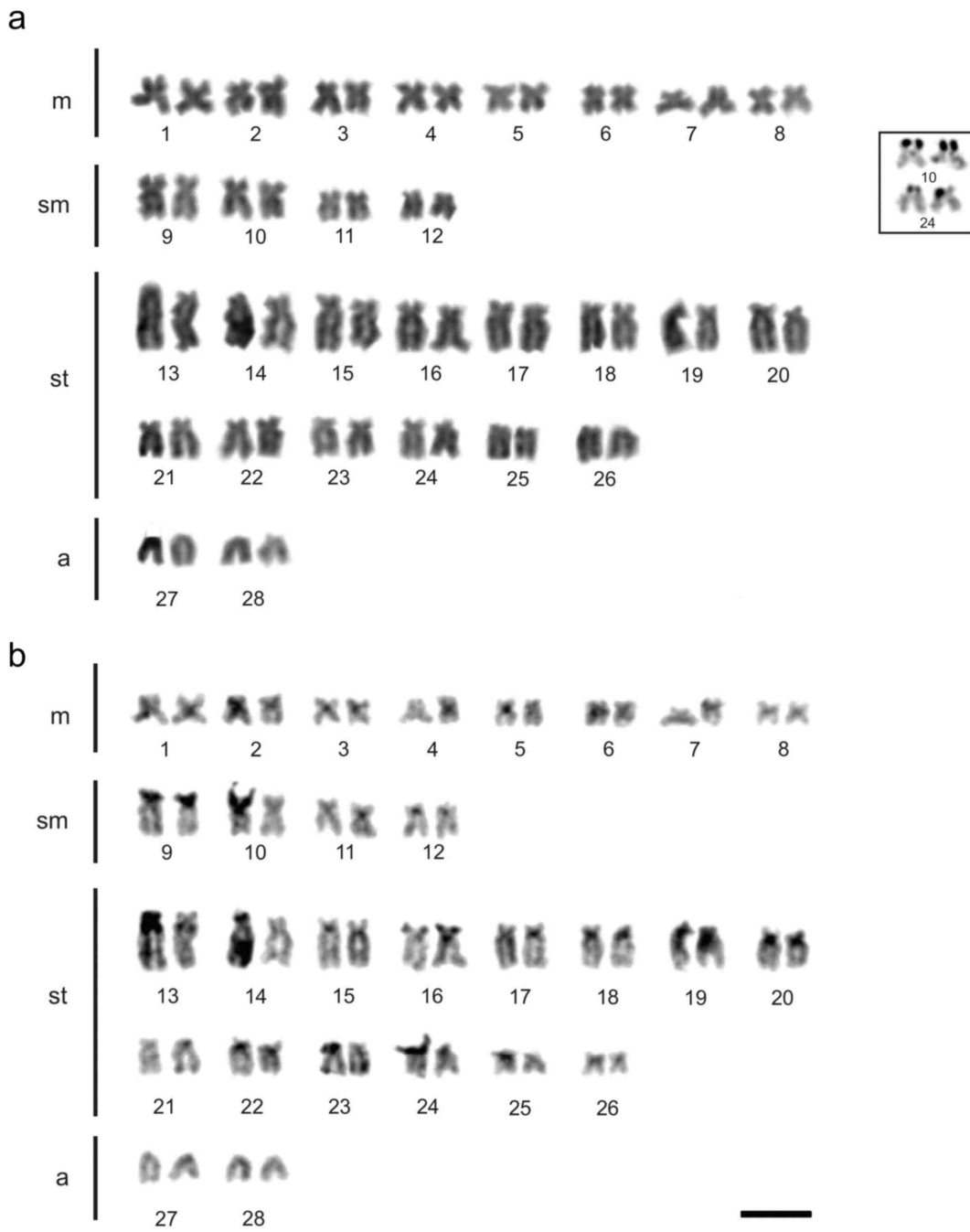


Figura 2. Cariótipo de *Colomesus psittacus* a partir de **(a)** coloração convencional e **(b)** bandamento C. Em destaque se observam as regiões organizadoras nucleolares. Barra=5µm.

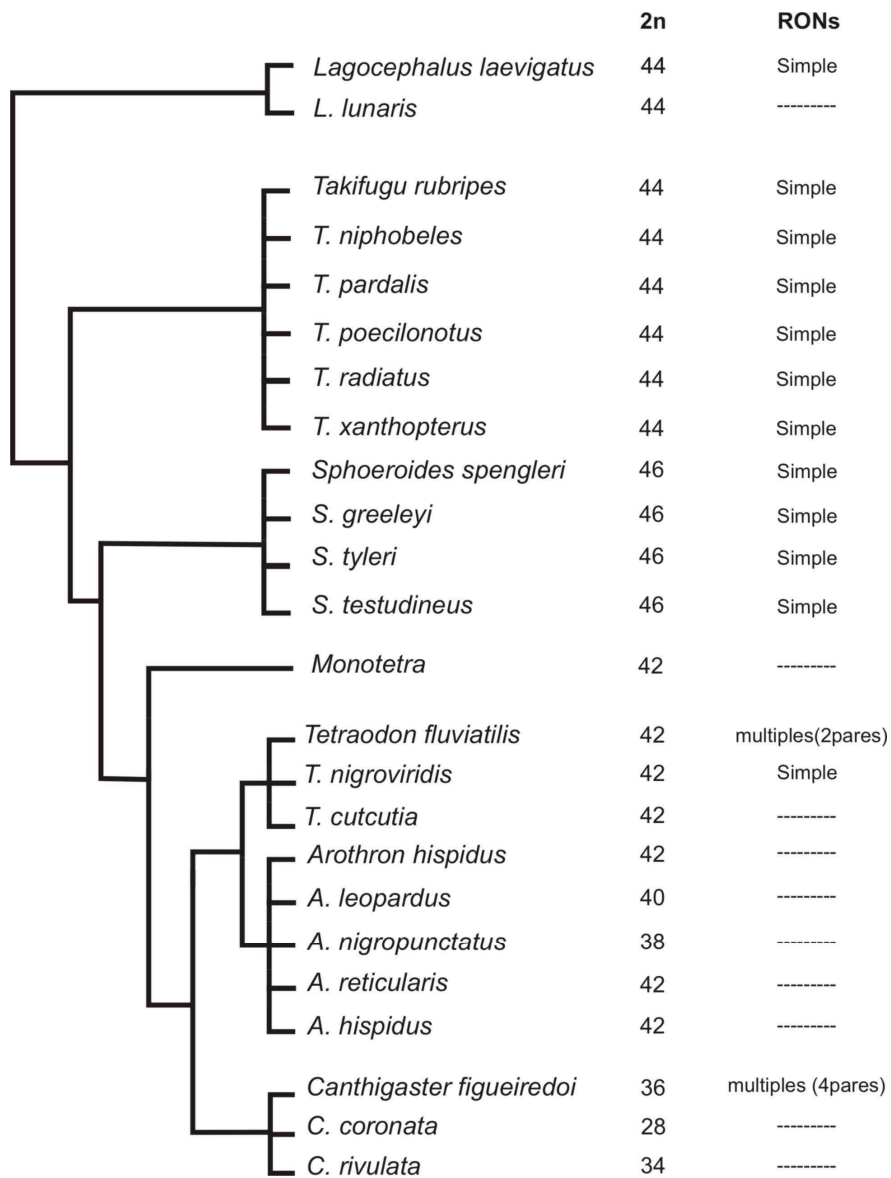


Figura 3. Filogenia baseada na árvore de Maximum likelihood de Alfaro *et al.* (2007) combinado com os dados citogenéticos.

Discussão

No presente estudo *Lagocephalus laevigatus* apresentou $2n=44$ (NF=72), o qual é comparável aos dados cariotípicos da outra espécie descrita deste gênero, *L. lunaris*, que apresenta o mesmo número cromossômico, mas número fundamental menor (NF=68) (Choudhury *et al.*, 1982). Estas diferenças podem ser atribuídas a eventos de inversões pericêntricas, mesmo levando-se em conta a dificuldade de estabelecer a morfologia dos cromossomos destas espécies dado o pequeno tamanho.

Nas diferentes filogenias moleculares disponíveis da família Tetraodontidae as espécies do gênero *Lagocephalus* e *Takifugu* são colocadas em condição mais basal e estreitamente relacionadas (Alfaro *et al.*, 2007; Holcroft, 2004; Yamanaue *et al.*, 2008). Quando estes dados são sobrepostos com as informações citogenéticas para os gêneros, pode-se observar que as espécies de *Takifugu*, *T. niphobeles*, *T. pardalis*; *T. peocilonotus*; *T. radiatus*; *T. rubripes* e *T. xanthopterus*, todas compartilham um mesmo valor diplóide ($2n=44$), embora exibam uma pequena variação quanto ao número fundamental (NF=64-66) (Miyaki *et al.*, 1995). A manutenção cromossômica numérica observada demonstra uma maior afinidade filogenética entre si que com as demais espécies da família (Figura 3).

As regiões organizadoras nucleolares localizadas em posição intersticial sobre um único par cromossômico, em *L. laevigatus*, representa uma simplesiomorfia para os Tetraodontiformes, sendo encontrado em espécies da família Ostraciidae (Capítulo I), Balistidae (Sá-Gabriel & Molina, 2005; Capítulo II), Monacanthidae (Capítulo II), Diodontidae (Sá-Gabriel & Molina, 2005; Brum, 2000) e Tetraodontidae (Sá-Gabriel & Molina, 2005; Noletto *et al.*, 2007).

Os padrões heterocromáticos presentes nos cromossomos de ambas as espécies, demonstra que este se encontra limitado a pequenos blocos localizados nas regiões centroméricas de alguns pares cromossômicos e associado às regiões organizadoras nucleolares. Esta situação já foi observada na maioria das espécies de Tetraodontidae, como em *Sphoeroides testudineus* (Sá-Gabriel & Molina, 2005; Noletto *et al.*, 2007), *S. greeleyi* (Noletto *et al.*,

2007), *Tetraodon fluviatilis* (Mandrioli *et al.*, 2000, 2001) e *T. nigroviridis* (Fischer *et al.*, 2000).

A falta de pequenas bandas C em alguns pares cromossômicos, como observado em alguns pares cromossômicos de *L. laevigatus*, não indica a ausência de heterocromatina, já que o tamanho crítico para a detecção de regiões heterocromáticas pelo bandamento C é de 10,5-17,5 Mb (Weichenhan *et al.*, 1998), além de que a heterocromatina é fundamental já que, entre outros aspectos, representa um componente indispensável na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento (Redi *et al.*, 2001).

Nas demais famílias da Ordem, a situação é diferente, observando-se grandes blocos pericentroméricos e intersticiais nas espécies de Ostraciidae (Capítulo I) o mesmo em seu grupo irmão Diodontidae, onde se observa um substancial conteúdo heterocromático (Sá-Gabriel & Molina, 2005; Noletto, 2009). Sob esta perspectiva pode se considerar o baixo conteúdo de heterocromatina, um caráter sinapomórfico da família Tetraodontidae. Grande conteúdo heterocromático possivelmente se perdeu na linhagem ancestral desta família. Esta labilidade histórica pode estar relacionada a menores pressões seletivas sobre tais regiões. Tal consideração torna-se evidente em comparações entre os cariótipos das diferentes famílias de Tetraodontiformes e a notável diferença no tamanho dos cromossomos.

A ausência de outras descrições cariotípicas para o gênero *Colomesus*, além da aqui apresentada para *Colomesus psittacus*, limita maiores considerações evolutivas. Da mesma forma nas diferentes filogenias moleculares (Alfaro *et al.*, 2007; Holcroft, 2004; Yamanaue *et al.*, 2008) não foram incluídos representantes deste gênero para ter uma noção de sua posição filogenética. Entretanto, uma filogenia baseada em caracteres morfológicos, situou as espécies de *Colomesus* numa posição relativamente basal (Arai, 1983), sugerindo que este gênero poderia ser grupo irmão dos Diodontidae.

Nossos dados mostram que *C. psittacus* é a espécie com o maior número diplóide já descrito para a família ($2n=56$). Seu valor diplóide é compatível aos encontrados para as espécies da família Diodontidae, que apresentam números cromossômicos elevados em relação à média dos Tetraodontidae (Arai & Nagaiwa, 1976; Brum, 2000; Sá-Gabriel & Molina,

2005). Associado a isto, o padrão de distribuição da heterocromatina no cariótipo de *C. psittacus*, evidenciando grandes blocos heterocromáticos ocupando os braços curtos de vários pares cromossômicos, situação que já foi observada em diferentes espécies de Diodontidae, como *Chilomycterus antennatus* (Sá-Gabriel & Molina, 2005) e *C. spinosus* (Noletto, 2009), estas evidências citogenéticas reforçam o relacionamento deste gênero com os Diodontidae.

Sítios ribossomais em dois pares cromossômicos, como observado em *C. psittacus*, já foi registrado também em outras espécies da família, como *Tetraodon fluviatis* (Mandrioli *et al.*, 2000, 2001), ou mesmo em maior número, como em *Canthigaster figueiredoi*, onde foram observados quatro pares portadores das regiões organizadoras nucleolares (Capítulo IV) (Figura 1 e 2).

Os principais mecanismos que explicam a variação do número de RONS é a recombinação ectópica entre as regiões terminais dos cromossomos (Hanson *et al.*, 1996; Pedroza-Harand *et al.*, 2006) e a transposição de DNAr, atuando como elementos móveis, ocasionando variações em tamanho, número e posição nos cromossomos (Shishido *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2006; Datson & Murray, 2006). Os sítios Ag-RONS múltiplos representam uma condição considerada como derivada no cariótipo da maioria das espécies de peixes (Molina & Bacurau, 2006). Assim, RONS múltiplas representam caracteres que surgiram em diferentes momentos por eventos evolutivos independentes, podendo ser consideradas características apomórficas das espécies *C. psittacus*, *T. fluviatis* e *C. figueiredoi*.

O tamanho do genoma varia amplamente entre os eucariotas, a questão desta variação do tamanho em alguns casos continua pouco esclarecida (Prokopovich *et al.*, 2003). O conteúdo de DNA nuclear e o número de genes codificantes não têm nenhuma relação entre si (conhecido como o paradoxo do valor C) (Gregory, 2001). No entanto, a variação do tamanho pode ser atribuída à diferença presença de elementos não codificantes, como pseudogenes, elementos de transposição, e outras seqüências repetitivas. O pequeno genoma dos Tetraodontidae, possivelmente, foi estabelecido em algum momento depois da separação de Diodontidae, que ocorreu entre 50-90m.a (Tyler & Sorbini, 1996), sofrendo a partir de então modificações evolutivas mediadas por esta condição.

As análises cariotípicas em *C. psittacus*, revelam que mesmo apresentando o maior número cromossômico dentro dos Tetraodontidae, também possuem os maiores tamanhos cromossômicos dentro da família, com os maiores cromossomos alcançando 6 µm. Possivelmente nesta espécie, contrariamente ao afirmado por Brainerd (2001) o tamanho do genoma nem sempre se manteve baixo desde a separação com os Diodontidae, podendo ter sido incrementado através de eventos independentes de heterocromatinização.

Um fator decisivo para a grande diversificação cromossômica que esta família apresenta, parece estar relacionada aos seus múltiplos habitats. A maioria dos membros dos Tetraodontidae habita recifes de corais, cuja alta produtividade (Fraser & Currie, 1996), elevada complexidade espacial (Lingo & Szedlmayer, 2006) e a complexidade ecológica tem sido implicada nos altos níveis de diversidade nos recifes (Bellwood & Wainwright, 2002). Estes fatores levam a uma alta taxa de cladogênese que aliados a fatores extrínsecos como os eventos vicariantes paleogeográficos favorecem a especiação dos peixes residentes (Alfaro *et al.*, 2007). Parece plausível que o potencial para ocupação e diversificação de habitats (pelágicos, bentônicos; recifais, ou habitantes de fundos arenosos; marinhos, estuarinos e ou dulcícolas) pelos Tetraodontidae, sem equivalência entre as outras famílias, tenha sido decisivo para a implementação das profundas modelagens cariotípicas evolutivamente fixadas nesta família.

Referências Bibliográficas

- Alfaro ME, Santini F & Brock CD (2007) Do reefs drive diversification in marine Teleosts? Evidence from the pufferfishes and their allies (Order Tetraodontiformes). *Evolution*, 61-9: 2104–2126.
- Almeida-Toledo LF (2000) Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. *Chromosome Today*, 13:169-182.
- Amemiya CT & Gold JR (1988) Chromosomal NORs taxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes. *Genetica*, 76:81-90.
- Arai R & Nagaiwa, K (1976) Chromosomes of Tetraodontiform fishes from Japan. *Bulletin National Science Museum*, 2: 59-72.

- Arai R (1983) Karyological and osteological approach to phylogenetic systematic of Tetraodontiform fishes. *Bulletin National Science Museum, Tokio*, 9: 175-210.
- Bellwood DR & Wainwright PC (2002) The history and biogeography of fishes on coral reefs. Pp. 5–32 in P. F. Sale, ed. *Coral reef fishes*. Academic Press, San Diego, CA.
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti Jr PM (1986) Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 28:153-159.
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS & Moreira-Filho O (2000) A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8:603-613.
- Brainerd, EL, Slutz, SS, Hall, EK & Phillis, RW (2001) Patterns of genome size evolution in tetraodontiform fishes. *Evolution*, 55: 2363–2368.
- Brum MJL (2000) Cytogenetic studies in Tetraodontiforms *Sphoeroides tyleri* (Tetraodontiformes) and *Chilomycterus spinosus* (Diodontidae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Chromosome Science*, 4:103-105.
- Cai Q, Zhang DM, Liu ZL & Wang XR (2006) Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobis* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Annul Botany* 97: 715-722.
- Cestari MM & Galetti Jr. PM (1992) Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguay rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. *Copeia* 1992(1): 108-112.
- Choudhury RC, Prasad R & Das CC (1982) Karyological studies in five tetraodontiform fishes from the Indian Ocean. *Copeia*, 728-732.
- Crnogorac-Jurcevic T, Brown JR, Lehrach H, Schalkwyk LC (1997) *Tetraodon fluviatilis*, a New Puffer Fish Model for Genome Studies. *Genomics*, 41:177–184.
- Datson PM & Murray BG (2006) Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research*, 14: 845-857.
- Fischer C, Ozouf-Costaz C, Roest Crollius H, Dasilva C, Jaillon O, Bouneau L, Bonillo C, Weissenbach J & Bernot A (2000) Karyotype and chromosome location of characteristic tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88:50-55.

- Fraser RH & Currie DJ (1996) The species richness-energy hypothesis in a system where historical factors are thought to prevail: coral reefs. *American Natural*, 148:138–159.
- Galetti Jr PM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (1994) Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. *Caryologia*, 47: 289-298.
- Galetti Jr PM (1998) Chromosome diversity in neotropical fish. NOR studies. *Italian Journal of Zoology*, 65:53-56.
- Gold Jr LC Shipley NS & Powers PK (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563-575.
- Gregory TR (2001) Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 76: 65–101.
- Hanson RE, IslamFaridi MN, Percival EA *et al.* (1996) Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105: 55-61.
- Holcroft NI (2004) A molecular test of alternative hypotheses of tetraodontiform (Acanthomorpha: Tetraodontiformes) sister group relationships using data from the RAG1 gene. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 32:749–760.
- Howell WM & Black DA (1980). Controller silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: a 1 – step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Lingo ME & Szedlmayer ST (2006) The influence of habitat complexity on reef fish communities in the northeastern Gulf of Mexico. *Environment Biological Fishes*, 76:71–80.
- Mandrioli M, Coughi B, Marini M & Manicardi GC (2000) Cytogenetic analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Chromosome Research*, 8:237-242.
- Mandrioli M & Manicardi GC (2001) Cytogenetics and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Genetica*, 111:433–438.
- Miyaki KO, Tabela O & Kayano H (1995) Karyotype in 6 species of pufferfishes genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). *Fisheries Science*, 61, 594-598.
- Molina WF (2001). An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science*, 5:149–152.

- Molina WF (2007) Chromosome changes and stasis in marine fish groups. In: Eva Pisano; Catharine Ozouf-Costaz; Fausto Foresti; B. G. Kapoor. (Org.). Fish Cytogenetics. 1 ed. Enfield: Science Publisher, v. 1, p. 1-52.
- Molina WF & Bacurau TO (2006) Structural and numerical chromosomal variation in marine Perciformes (Priacanthidae and Gerreidae). *Cytologia*, Japão, 71(3): 237-242.
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA & Moreira-Filho O (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* (The Hague), 109: 161-168.
- Noleto RB, Vicari MR, Cipriano RR, Artoni RF & Cestari MM (2007) Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). *Genetica*, 130:133–138.
- Noleto RB, Guimarães FSF, Paludo KS, Vicari MR, Artoni RF & Cestari MM (2009) Genome Size Evaluation in Tetraodontiform Fishes from the Neotropical Region. *Marine Biotechnology*, p.
- Pedrosa-Harand A, de Almeida CCS, Mosiolek M, Blair M, Schweizer & Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 924-933.
- Prokopowich CD, Gregory TR & Crease TJ (2003) The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 46-48-50.
- Redi CA, Garagna S, Zacharias H, Zuccotti M & Capanna E (2001) The other chromatin. *Chromosome*, 110(3):136-147.
- Sá-Gabriel LG & Molina WF (2005) Karyotype diversification in fishes of the Balistidae, Diodontidae and Tetraodontidae (Tetraodontiformes). *Caryologia*, 58:229-237.
- Shishido R, Sano Y & Fukui K (2000) Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. *Molecular and General Genetics*, 263:586-591.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75:304-306.
- Tyler JC & Sorbini L (1996) New superfamily and three new families of tetraodontiform fishes from the upper Cretaceous: the earliest and most morphologically primitive plectognaths. *Smith. Contr. Paleobiology*, 83:1–59.

Weichenhan D, Kunze B, Traut W & Winking H (1998) Evolution by fusion and amplification: the murine Sp100-rs gene cluster. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 80:226-231.

Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, Katoh M, Sakai H & Nishida Mutsumi. (2008). A new perspective on phylogeny and evolution of tetraodontiform fishes (Pisces: Acanthopterygii) based on whole mitochondrial genome sequences: Basal ecological diversification? *BMC Evolutionary Biology* 8:212.

CAPÍTULO IV

Polimorfismo de heterocromatina, RONS múltiplas e cromossomos Bs em *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontiformes)



Polimorfismo de heterocromatina, RONS múltiplas e cromossomos Bs em *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontiformes)

Pablo Ariel Martinez & Wagner Franco Molina

Resumo

Os Tetraodontiformes se destacam por constituírem uma das principais linhas de irradiação dos teleósteos, sendo um grupo altamente especializado. A família Tetraodontidae, por exemplo, apresenta o menor conteúdo DNA/célula entre os vertebrados, constituindo um modelo adequado para estudos de evolução genômica. Com o objetivo de ampliar a base de dados citogenéticos desta família, foram analisados citogeneticamente 11 indivíduos de *C. figueiredoi* a partir de coloração convencional, Ag-RONS, bandamento C, fluorocromos base-específicos DAPI-CMA₃ e hibridação *in situ* com sonda rDNA 18S. Os indivíduos analisados revelaram 2n=36 (10m+6sm+20a; NF=52). Sítios Ag-RONS múltiplos (CMA₃⁺) foram detectados sobre quatro pares (3, 4, 8 e 11). Blocos heterocromáticos estão presentes nas regiões centroméricas da maioria dos pares, bem como se estendendo sobre o braço curto de alguns cromossomos. Polimorfismos heterocromáticos foram identificados em alguns indivíduos, na posição telomérica do 6° par cromossômico, podendo estar presente em um ou ambos os homólogos do par. A análise seqüencial DAPI-CMA₃ revelou que as regiões heterocromáticas da espécie são ricas em seqüências GC. Em uma das fêmeas analisadas estavam presentes microcromossomos Bs heteromórficos, que apresentaram variação intra-individual de 0-3 Bs, os quais se mostraram totalmente heterocromáticos. A ocorrência de polimorfismos heterocromáticos, RONS múltiplas, polimorfismos heterocromáticos e cromossomos Bs observados em *C. figueiredoi* constituem eventos raros para peixes marinhos, estando possivelmente associados à marcante reestruturação e redução genômica sofrida por esta família.

Palavras chaves: cromossomos Bs; pufferfish; redução genômica; polimorfismo heterocromático.

Abstract

The Tetraodontiformes stand out for constitute one of the main lines of teleost irradiation, being one very high specialized group. The family Tetraodontidae, for example, presents the lower DNA/cell content among the vertebrates, being one suitable model for studies about genomic evolution. With the objective of enlarging the cytogenetic database of this family, we analyzed 11 individuals of *C. figueiredoi* from a conventional colouring Ag-NORs, C-banding, base-specific fluorochrome DAPI-CMA₃ and *in situ* hybridization with rDNA 18S probes. The analyzed individuals show 2n=36 (10m+6sm+20a; NF=52).

Multiples Ag-NORs sites (CMA₃⁺) were detected on four pairs (3, 4, 8 e 11). Heterochromatic blocks were detected in the centrometric regions in the most pairs, as well as extending on the short arm of some chromosomes. Heterochromatic polymorphisms were identified in some individuals, in the telomeric position of the 6^o chromosome pair, could be present in one or both homologues of the pair. The sequential analyzes with DAPI-CMA₃ revealed that the heterochromatic regions of *C. figueiredoi* are rich in GC sequences. In one of the females we analyzed, heteromorphic microchromosomes Bs were present, that presents intraindividual variation of 0-3 Bs, the ones which shown totally heterochromatic. The occurrence of heterochromatic polymorphisms, multiples RONS and Bs chromosomes found in *C. figueiredoi* constitute rare events for marine fishes, being possibly associated to the outstanding structuring and genomic reduction suffered for this family.

Key words: B-chromosome; pufferfish; genome reduction; heterochromatic polymorphism.

Introdução

Peixes neotropicais mostram uma alta diversidade cariotípica, incluindo variações no número diplóide, presença de cromossomos sexuais, cromossomos supranumerários ou Bs, triploides naturais, e polimorfismo de heterocromatina e regiões organizadoras nucleolares (RONS) (Galetti, 1998).

Na grande diversidade de peixes marinhos, a Ordem Tetraodontiformes se destaca por ser uma das principais linhas de irradiação dos teleosteos (Lauder & Liem 1983; Nelson, 2006), como também ser um grupo altamente especializado, apresentando dentre os seus componentes, a família Tetraodontidae a menor quantidade de DNA por célula entre os vertebrados (Neafsey & Palumbi, 2003). Uma extensa diversidade cariotípica caracteriza este grupo, representada por espécies com padrões típicos da Ordem Perciformes (cariótipo composto por 48 cromossomos acrocêntricos), como em Triacanthidae (Choudhury *et al.*, 1982), até cariótipos derivados, com números diplóides variando de 28-52 nas outras famílias (Balistidae, Ostraciidae, Tetraodontidae e Diodontidae) (Galetti *et al.*, 2006). Dentro dos mecanismos de diversificação cariotípica encontram-se os cromossomos sexuais, os quais podem ter um papel importante na especiação nos ambientes marinhos, contribuindo para o isolamento reprodutivo de populações. Em peixes marinhos, a pesar do grande número de espécies viventes, a aparição de cromossomas sexuais citologicamente diferenciados parece ser rara

(Morescalchi *et al.*, 1992), mas na Ordem Tetraodontiformes já foram descritos sistemas simples e múltiplos em algumas espécies (Sá-Gabriel & Molina, 2004).

Os cromossomos Bs, também conhecidos como supranumerários ou cromossomos acessórios, são cromossomos prescindíveis presentes em alguns indivíduos ou populações. Sua possível origem está associada a rearranjos nos cromossomos A, apresentando a partir de então uma via evolutiva própria (Beukeboom 1994).

Tem sido descrito para um grande número de espécies de plantas e animais (Jones & Rees, 1982; Camacho *et al.*, 2000), sendo observados em mais de 40 espécies de peixes continentais (Oliveira *et al.*, 2000). Em peixes marinhos o cenário é diferente, com poucas descrições de cromossomos supranumerários restritas as espécies, *Upeneus parvus* (Mullidae, Perciformes) (Pauls *et al.*, 1996), *Sphoeroides spengleri* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes) (Alves *et al.*, 2008; Noletto, 2009) e *Chilomycterus spinosus* (Diodontidae) (Noletto, 2009).

Entre os Tetraodontidae a subfamília Canthigasterinae se destaca por ser a mais derivada, apesar disto seus dados citogenéticos são escassos. Visando ampliar as informações citogenéticas deste grupo específico de peixes e da Ordem, o presente estudo realizou a caracterização cariotípica da espécie *Canthigaster figueiredoi*, a partir de coloração convencional, impregnação argêntea, bandamento C e fluorocromos DAPI/CMA₃. Além disso, aqui são descritas a ocorrência de RONS múltiplas, um polimorfismo heterocromático possivelmente relacionado com o sexo e a presença de cromossomos Bs na espécie.

Material e métodos

Um total de 11 indivíduos *Canthigaster figueiredoi* analisados citogeneticamente (4 fêmeas, 7 indivíduos juvenis), foram coletados no litoral da Bahia, NE do Brasil (13°00'S, 38°32'O). Os exemplares sofreram estimulação mitótica através da técnica preconizada por Molina (2001), por um período de 24 a 48 horas. Decorrido este tempo, os exemplares foram anestesiados com Clove oil (Eugenol) e sacrificados para extração do rim

cefálico. As preparações dos cromossomos mitóticos foram obtidas de acordo à metodologia descrita por Gold *et al.* (1990). Para a detecção dos sítios ribossomais ativos, se utilizou a técnica de impregnação pela prata de Howell & Black (1980), padrões heterocromáticos foram determinados utilizando o método de bandamento C descrito por Summer (1972), enquanto que a coloração com fluorocromos DAPI/CMA₃ seguiu o protocolo preconizado por Schweizer (1980). A técnica de hibridação *in situ* fluorescente com sondas 18S rDNA foi realizada com base no procedimento adotado por Pinkel *et al.* (1986), com pequenas alterações. As sondas foram marcadas com biotina-11-dATP, através de nick translation, utilizando o kit Bionick™ Lablling System (Gibco.BRL), seguindo as especificações do fabricante.

Os cromossomos foram classificados quanto à posição do centrômero, em submetacêntricos (sm), subtlocêntricos (st) e acrocêntricos (a), e ordenados em ordem decrescente de tamanho.

Resultados

As análises citogenéticas em *C. figueiredoi* evidenciaram um número diplóide $2n=36$ cromossomos, com uma fórmula cariotípica constituída por $10sm+6st+20a$ (NF=52). A partir da impregnação argêntea se evidenciaram 4 pares portadores de regiões organizadoras nucleolares (3^o, 4^o, 8^o e 11^o par) (Figura 1), condição que foi confirmada a partir da hibridação *in situ* com sondas rDNA 18S (Figura 2). A partir do bandamento C observaram-se regiões heterocromáticas na maioria dos centrômeros, além disso, os pares subtlocêntricos portadores das RONS mostraram os braços curtos totalmente heterocromáticos (Figura 3).

Adicionalmente, observou-se no cariótipo das quatro fêmeas um bloco heterocromático em um dos homólogos na região telomérica no braço curto do 6^o par cromossômico. Nos outros indivíduos (juvenis) o bloco heterocromático estava presente tanto em apenas um dos homólogos, como nos dois elementos do par. Este bloco heterocromático mostrou ser rico em bases GC nas análises pelos fluorocromos DAPI/CMA₃ (Figura 4). Além disso, em dois indivíduos a região correspondente ao bloco heterocromático mostrou-se heteropicnótica mesmo sob coloração convencional com Giemsa (Figura 1).

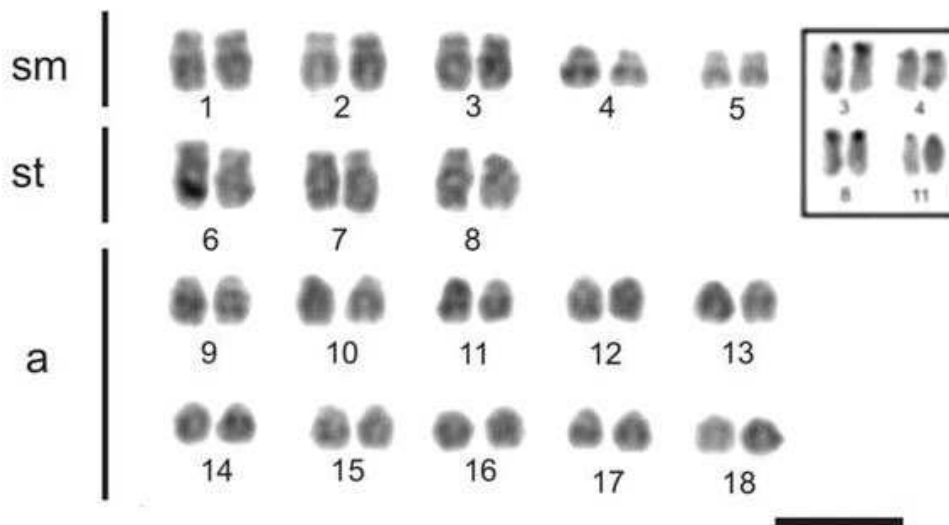


Figura 1. Cariótipo de fêmea partir de coloração convencional de *Canthigaster figueiredoi*, $2n=36$. Em destaque os pares organizadores nucleolares. Barra=5 μ m.

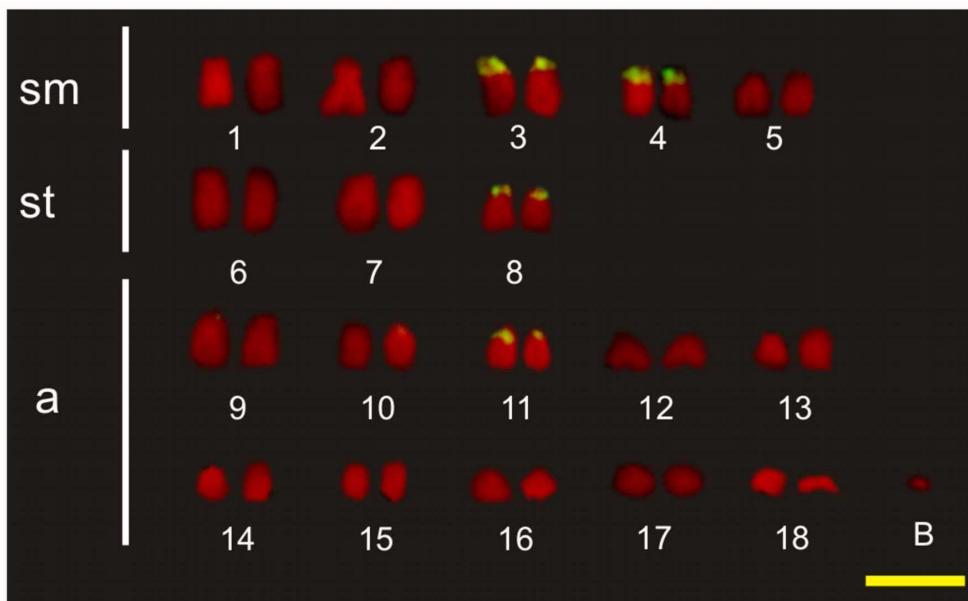


Figura 2. Cariótipo a partir de hibridação *in situ* com sonda rDNA 18S de *Canthigaster figueiredoi*. Barra=5 μ m.

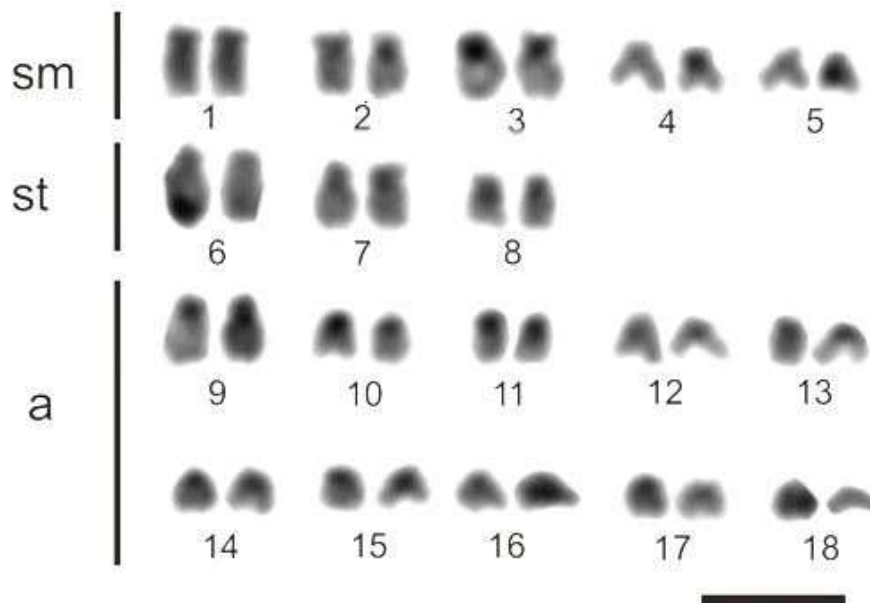


Figura 3. Cariótipo de fêmea a partir da banda C de *Canthigaster figueiredoi*. Barra=5µm.

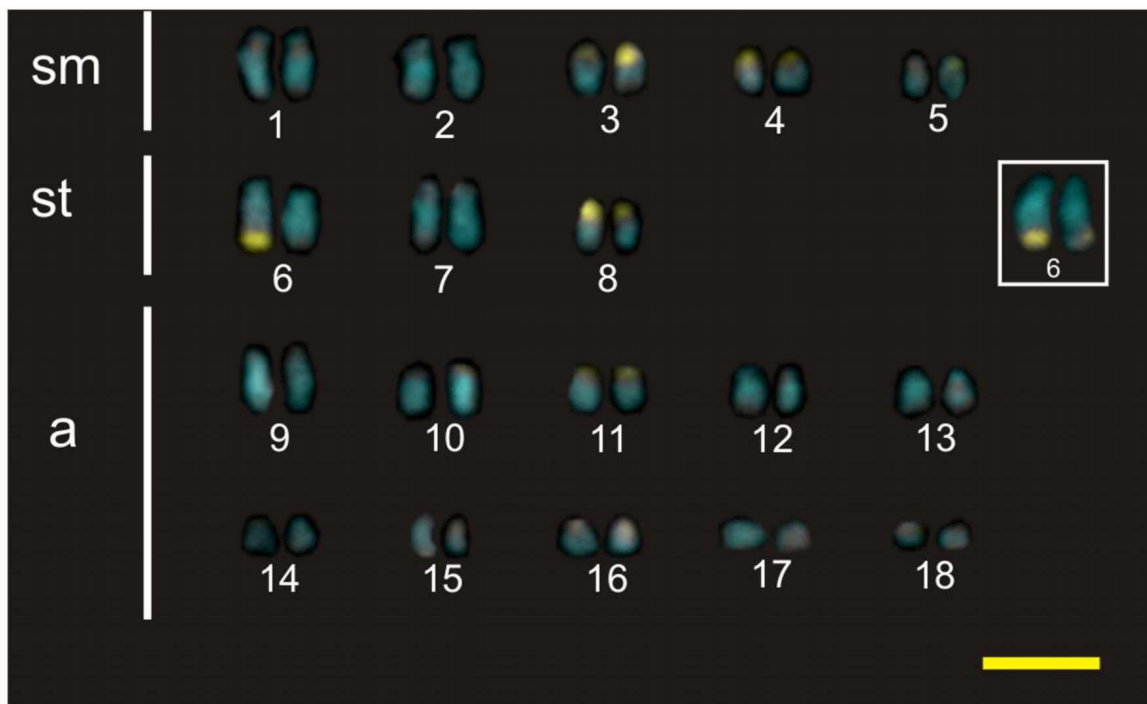


Figura 4. Cariótipo a partir de dupla coloração DAPI/CMA₃ de uma fêmea, evidenciando o polimorfismo heterocromático. Em destaque o sexto par homocigota para o polimorfismo heterocromático. Barra=5µm.

Em uma das fêmeas analisadas foram encontrados microcromossomos Bs heteromórficos, que apresentaram variação intra-individual de 0 a 3 Bs

(Figura 5). Quanto à frequência 47% das células metafásicas não exibiam cromossomos Bs, 33% apresentavam um, 14% dois e 6% três cromossomos Bs. Estruturalmente os cromossomos Bs revelaram-se pequenos cromossomos acrocêntricos de tamanhos diferentes, que quando submetidos ao bandamento C revelavam-se totalmente heterocromáticos (Figura 5), os mesmos não apresentaram seqüências ribossomais (Figura 2).

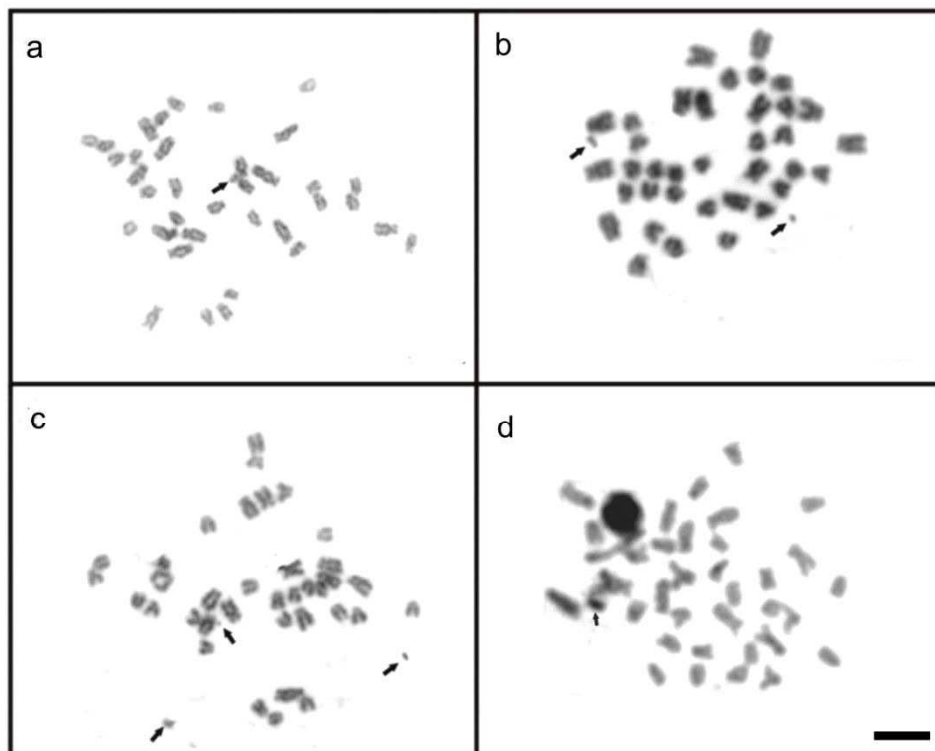


Figura 5. Metáfases de *C. figueiredoi*. **a.** metáfase com um cromossomo Bs, **b.** presença de dois cromossomos Bs heteromórficos, **c.** metáfase exibindo três cromossomos Bs heteromórficos, **d.** Bandamento C exibindo o padrão heterocromático observado para o cromossomo Bs As setas indicam os cromossomos Bs. Barra=5 μ m.

Discussão

Na Ordem Tetraodontiformes tem sido observada uma grande diversidade cariotípica, desde espécies da família Triacanthidae com $2n=48$ e $NF=48$ (Rishi, 1973; Choudhury *et al.*, 1982), padrão considerado basal e largamente difundido entre os Perciformes, bem como outras famílias mais derivadas, tais como Balistidae, Monacanthidae, Ostraciidae, Tetraodontidae e Diodontidae (Holcroft, 2005), com cariótipos exibindo diferentes tendências evolutivas, com valores diplóides variando de 28 a 52 cromossomos (Galetti *et al.*, 2006). Estudos realizados com espécies do gênero *Canthigaster* mostraram números diplóides baixos em relação aos demais membros da Ordem, como *C. coronata*, com $2n=28$ (Arai, 1983), *C. rivulata*, $2n=34$ (Arai & Nagaiwa, 1976) e no presente estudo *C. figueiredoi* com $2n=36$. Estes dados reforçam as evidências da filogenia molecular que indicam a subfamília Canthigasterinae como uma das mais derivadas entre os Tetraodontiformes (Holcroft, 2005).

A coincidência de Ag-RONs+, C+, CMA₃+, FISH 18S é frequentemente reportado em peixes (Amemiya & Gold, 1986; Phillips *et al.*, 1988; Sola *et al.*, 1992), onde a heterocromatina se está adjacente ou intercala-se às RONS nos cromossomos, o que pode favorecer rearranjos nos pares portadores destas regiões (Vicari *et al.*, 2003). A presença desta característica em teleósteos inferiores e superiores mostram que este caráter é plesiomorfo e conservado evolutivamente. Associação de genes repetidos em *tandem*, tais como as histonas ou DNAr, com regiões heterocromáticas tem sido demonstrado numa variedade de eucariotos, como por exemplo, *Drosophila* (Fitch *et al.*, 1990), *Xenopus* (Pardue *et al.*, 1973) e o tritão *Notophthalmus* (Stephenson *et al.*, 1981). A partir destas observações, se tem sugerido que os genes associados à seqüências de DNA altamente repetitivo estão sujeitos a um aumento do número de cópias pelos freqüentes intercâmbios desiguais entre seqüências repetitivas adjacentes.

A presença de quatro pares portadores das RONS, é o primeiro registro em Tetraodontiformes. Dois principais mecanismos foram propostos para explicar a variação no número de RONS intraespecíficos e interespecíficos: i) recombinação ectópica entre regiões terminais dos cromossomos (Hanson *et al.*, 1996; Pedroza-Harand *et al.*, 2006) e ii) transposição de DNAr, atuando

como elementos móveis, variando em tamanho, número e posição nos cromossomos (Shishido *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2006; Datson & Murray, 2006). É senso comum que sítios Ag-RONs múltiplos representam uma condição derivada no cariótipo da maioria das espécies de peixes (Molina, 2006).

Polimorfismos de heterocromatina são comumente descritos em peixes (com envolvimento de um ou mais pares de cromossomos), sugerindo uma variação no número de cópias repetidas de segmentos ou sequências. Normalmente estão relacionados com o tamanho dos blocos (Martinez *et al.*, 1991; Junkun *et al.*, 1995) ou ser o resultado de uma associação entre as regiões heterocromáticas e RONS polimórficas (Hartley, 1988; Amores *et al.*, 1993).

As seqüências de DNA repetitivo compreendem uma fração substancial do genoma de muitos eucariotos (Charlesworth *et al.*, 1994), e podem estar dispersas ou situadas em repetições em *tandem*. O DNA repetitivo organizado em *tandem* é conhecido como DNA satélite. O tamanho das unidades de repetição das diferentes famílias de DNA satélite é muito variável, oscilando desde vários pares de bases até vários centos de nucleotídeos (Koehler *et al.*, 1997). Esta classe de DNA encontra-se principalmente em regiões centroméricas e teloméricas (Franck *et al.*, 1991), achando-se associados a regiões heterocromáticas (Stephan & Cho, 1994). Considera-se que tanto o câmbio morfológico, como a heterocromatinização, aparece como o primeiro passo na diferenciação dos cromossomas sexuais (Ohno, 1976), por isso as técnicas de bandamento C, como os fluorocromos base-específicos DAPI/CMA₃ têm sido amplamente utilizados para confirmar cromossomos sexuais em diferentes espécies de peixes (Cano *et al.*, 1996; Bertollo *et al.*, 1997).

No presente estudo, as fêmeas mostraram-se heterozigotas quanto ao polimorfismo heterocromático da região telomérica do braço curto do 6º par cromossômico, sugerindo que possa estar relacionado a um sistema cromossômico de determinação do sexo tipo ZZ-ZW, o que representaria um dos poucos registros de este sistema de determinação cromossômica do sexo em Tetraodontiformes.

A ocorrência de cromossomos Bs em peixes marinhos tem se mostrado rara, no entanto, este é o terceiro relato na família Tetraodontidae. Este fato

pode estar associado à marcante reestruturação (Mandrioli & Manicardi, 2001; Sá-Gabriel & Molina, 2005) e redução genômica que esta família sofreu (Neafsey & Palumbi, 2003), apresentando aproximadamente o mesmo complemento de genes que outros vertebrados (Brenner *et al.*, 1993). A redução genômica neste grupo presumivelmente foi resultado da perda de DNA repetitivo ou outro DNA não codificante (Neafsey & Palumbi, 2003), tendo como resultado uma grande similaridade no tamanho dos éxons com os humanos e uma marcada diferença no tamanho dos íntrons (Jaillon *et al.*, 2004). Do ponto de vista tradicional, que segue amplamente aceito, que os cromossomos Bs derivam dos cromossomos A (Jones & Rees 1982), sob esta perspectiva poderíamos considerar a origem dos cromossomos Bs como um subproduto da evolução do cariótipo normal, podendo derivar de fragmentos de fusões cêntricas ou ampliações de fragmentos de regiões paracêntricas de cromossomos A (Camacho *et al.*, 2000).

A análise molecular dos cromossomos Bs tem revelado que em sua maioria são compostos por DNA satélite, o qual é coerente com sua natureza heterocromática. Embora alguns DNA satélites sejam específicos dos cromossomos Bs, outros são compartilhados com os cromossomos A (Hackstein *et al.*, 1996).

Em *C. figuereidoi* o cromossomo Bs se mostraram totalmente heterocromáticos como na maioria das espécies de peixes neotropicais dulcícolas nos quais são mais frequentemente detectados. Esta parece ser uma condição estabilizadora para a existência e manutenção destes cromossomos, seja pela inativação ou neutralidade funcional das seqüências que possuem ou pelas características intrínsecas da heterocromatina (estrutura, capacidade de manutenção de seqüências centroméricas e ou teloméricas). Contudo, em alguns casos, cromossomos supranumerários podem se apresentar eucromáticos (Oliveira & Foresti, 1993). Exemplos disso foram encontrados em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Foresti *et al.*, 1989), *Steindachnerina insculpta* (Oliveira & Foresti, 1993), *Iheringichthys labrosus* (Visotto *et al.*, 1999), *Characidium cf. cebra* (Venere *et al.*, 1999), *Rhamdia quelen* (Moraes *et al.*, 2007), entre outros.

Os intensos rearranjos cromossômicos sofridos na redução do genoma dos Tetraodontidae poderiam ter propiciado um ambiente favorável para a formação e manutenção dos cromossomos Bs nesta família, podendo representar rélictos de processos passados de perda seletiva de segmentos heterocromáticos, condição evolutiva pouco aventada para ordens essencialmente dulcícolas.

A baixa frequência com que foram encontrados na amostra de *C. figueiredoi* sugere uma condição diferente de quando presentes em pequenas populações isoladas (Artoni *et al.*, 1994) cuja disseminação parece ser favorecida. Caracteristicamente populações marinhas tendem a possuir efetivos populacionais maiores favorecendo um maior tamponamento evolutivo do cariótipo das espécies (Molina, 2006).

Uma distribuição em mosaico de cromossomos supranumerários, similar a que ocorre em *C. figueiredoi*, já havia sido identificada no peixe marinho *Upeneus parvus* (Mullidae) que apresentava uma variação de 0 a 4 microcromossomos Bs por célula (Pauls *et al.*, 1996). Esta condição reflete a ausência de um padrão de segregação mendeliana nestes cromossomos.

A origem dos cromossomas Bs nas espécies de peixes marinhos ainda é desconhecida, mas em Tetraodontidae parece ter seguido uma via evolutiva resultado de redução genômica não usual aos processos já descritos para peixes continentais. A presença de espécies nesta família com o menor conteúdo de DNA conhecido entre os vertebrados tem alçado tais espécies à condição de modelo de estudos evolutivos do genoma e cariótipo (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 1997; Bradford, *et al.*, 1997; Fisher, 2000; Mandrioli, 2000).

Cromossomos sexuais em peixes marinhos parecem ser pouco comuns, mas na Ordem Tetraodontiformes já foram descritas sistemas simples do tipo XX-XY em *Rhinecanthus verrucosus* e *R. aculeatus* (Ojima, 1985), em Balistidae, como assim também o sistema XX-XO, em *Triacanthus brevirostris* (Choudhury *et al.*, 1982), na família Triacanthidae, e o sistema múltiplo $X_1X_1X_2X_2-X_1X_2Y$, em *Stephanolepis hispidus* (Sá-Gabriel & Molina, 2004) e *S. cirrhifer* (Murofushi, 1980), na família Monacanthidae. Em Tetraodontidae existe apenas um registro de cromossomos sexuais diferenciados, múltiplos, do tipo $X_1X_1X_2X_2-X_1X_2Y$, em *Arothron nigropunctatus* (Ojima, 1985). Ante este cenário, na qual se observa uma grande variedade de sistemas cromossômicos de

determinação do sexo dentro da Ordem, é possível pensar que o polimorfismo heterocromático achado nas fêmeas esteja relacionado a um sistema do tipo ZZ-ZW, o qual seria o primeiro registro para a Ordem.

A ocorrência de polimorfismos heterocromáticos, RONS múltiplas e cromossomos Bs observados em *C. figueiredoi* constituem eventos raros para peixes marinhos, estando possivelmente associados à marcante reestruturação e redução genômica que esta família sofreu.

Referências bibliográficas

- Alves LA, Porto-Foresti F, Oliveira C & Foresti F (2008) Supernumerary chromosomes in the pufferfish *Sphoeroides spengleri* – First occurrence in marine Teleostean Tetraodontiformes fish. *Genetics and Molecular Biology*, 31:243-245.
- Amemiya CT & Gold JR (1986) Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia*, 1986: 226–231.
- Amores A, Martinez G, Reina J & Alvarez MC (1993) Karyotype, C-banding, and Ag-silver NOR analysis of *Diplodus bellottii* (Sparidae, Perciformes): intra-individual polymorphism involving heterochromatic regions. *Genome* 36(4): 672–675.
- Arai R & Nagaiwa K (1976) Chromosomes of tetraodontiform fishes from Japan. *Ibid.*, 2: 59-72.
- Arai R (1983) Karyological and osteological approach to phylogenetic systematics of tetraodontiform fishes. *Bulletin of the National Museum of Natural Science Museum Tokyo Serie A*, 9:175-210.
- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC & Beukeboom O (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity* 73, 328-336.
- Bertollo, LAC, Fontes MS, Fenocchio AS & Cano J (1997) The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G, C and chromosome replication banding. *Chromosome Research*. 5: 493–499.
- Beukeboom LW (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity*, 73:328–336
- Bradford CS, Milller AE, Tourmadje A, Nishiyama K, Shirahata S & Barnes DW (1997) Characterization of cell cultures derived from *Fugu*, the japanese pufferfish. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6(4): 279 - 288.

- Brenner S, Elgar G, Sandford R, Macrae A, Venkatesh B, & Aparicio S (1993) Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* 366: 265–268.
- Brum MJ (1996) Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. *Brazilian Journal of Genetica* 19: 421–427.
- Camacho JPM, Sharbel TF & Beukeboom LW (2000) B chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society. B* 355: 163–178.
- Cai Q, Zhang DM, Liu ZL & Wang XR (2006) Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobilus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Annals of Botany* 97: 715–722.
- Cano J, Pretel A, Melendez S, Garcia F, Caputo V, Fenocchio AS & Bertollo LAC (1996). Determination of early stages of sex chromosome differentiation in the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Pisces: Perciformes). *Cytobios* 87:45–59.
- Charlesworth B, Sniegowski P & Wolfgang S (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371:215–220.
- Choudhury RC, Prasad R & Das CC (1982) Karyological studies in five tetraodontiform fishes from the Indian Ocean. *Copeia*: 728–732.
- Crnogorac-Jurcevic T, Brown JR & Schalkwyk LC (1997) *Tetraodon fluviatilis*, a new puffer fish model for genome studies. *Genomics*, 41:177–184.
- Datson PM & Murray BG (2006) Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research*, 14: 845–857.
- Fischer C, Ozouf-Costaz C, Crollius HR, Dasilva C, Jaillon O, Bouneau L, Bonillo C, Weissenbach J & Bernot A (2000) Karyotype and chromosomal location of characteristic tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88:50–55.
- Fitch DH, Strausbaugh LD & Barrett V (1990). On the origins of tandemly repeated genes: does histone gene copy number in *Drosophila* reflect chromosomal location? *Chromosoma* 99: 118–124.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF & Toledo SA (1989) Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* 79:107–114.
- Franck JPC, Harris AS, Bentzen P, Wright EMD & Wright JM (1991) Organization and evolution of satellite, minisatellite and microsatellite DNAs in teleost fishes. *Oxford Surveys on Eukaryotic Genes*, Vol. 7. Oxford University Press.

- Galetti Jr., P.M., 1998. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. *Italian Journal of Zoology*. 65 Suppl.: 53–56.
- Galetti Jr. PM, Molina WF, Affonso PRAM & Aguilar CT (2006) Assessing genetic diversity of Brazilian reef fishes by chromosomal and DNA markers. *Genetica*, 126:161-177.
- Gold Jr, LC, Shipley NS & Powers PK (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal Fish Biology*. 37: 563-575.
- Hackstein JHP, Hochstenbach R, Hauschteck-Jungen E & Beukeboom LW (1996) Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? *BioEssays* 18(4): 317--323.
- Hanson RE, IslamFaridi MN, Percival EA et al. (1996) Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105: 55-61.
- Hartley SE (1988) Cytogenetic studies of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *Journal Fish Biology*, 33: 735–740.
- Holcroft NI (2005) A molecular analysis of the interrelationships of tetraodontiform fishes (Acanthomorpha: Tetraodontiformes). *Molecular phylogenetics and evolution*, 34:525-544.
- Howell WM & Black DA (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36, 1014-1015.
- Jaillon O, Aury JM, Brunet F, et al. (61 co-authors) (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*. 431:946–957.
- Jones RN & Rees H (1982) B chromosomes. Academic Press, New York.
- Jankun M, Klinger M & Woznicki P (1995) Chromosome variability in European vendace (*Coregonus albula* L.) from Poland. *Caryologia* 48(2): 165–172.
- Koehler MR, Haaf T, Guttenbach M, Scharl M & Schmid M (1997) Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). II. Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. *Chromosome Research*. 5: 325–331.
- Lauder CV & Liem KF (1983) The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bulletin Museum Comparative Zoology*. 150: 95–197.

- Mandrioli M, Coughi B, Marini M & Manicardi GC (2000) - Cytogenetic analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Chromosome Research*, 8: 237-242.
- Mandrioli M & Manicardi GC (2001) Cytogenetics and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Genetica*, 111:433–438.
- Martínez, P, Viñas A, Bouza C, Arias J, Amaro R & Sánchez L (1991) Cytogenetical characterization of hatchery stocks and natural populations of Sea and Brown Trout from northwestern Spain. *Heredity* 66: 9–17.
- Molina WF (2001) An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science*, 5:149-152.
- Molina WF & Bacurau TO (2006). Structural and numerical chromosomal variation in marine Perciformes (Priacanthidae and Gerreidae). *Cytologia*, 71:237-242.
- Moraes VPO (2007) Análise citogenética comparativa de diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). Master Thesis. Universidade Estadual de Londrina, Brazil.
- Morescalchi A, Hureau JC, Olmo C, Ozouf-Costaz E, Pisano E & Stanyon R (1992). A multiple sex-chromosome system in antarctic ice-fishes. *Polar Biology*, 11:655-661.
- Murofushi M (1980) Cytogenetical studies on fishes: III. Multiple sex chromosome mechanism in the filefish, *Stephanolepis cirrhifer*. *Japan Journal Genetics*, 35:127– 132.
- Neafsey DE & Palumbi SR (2003) Genome size evolution in pufferfish: a comparative analysis of diodontid and tetraodontid pufferfish genomes. *Genome Research*, 5: 821-30.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the World*. John Willey and Sons Inc., New York. Fourth edition. 601p.
- Noletto RB (2009) Cariótipo e mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas em peixes marinhos com ênfase em Tetraodontiformes do litoral Paranaense. Tese de doutorado, UFPR.
- Ohno S (1974a) Sex chromosomes and sex determining mechanisms. In John, B. (ed.), *Animal Cytogenetics* 4. Gebrüder Borntraeger, Berlin: 46–63.
- Ojima Y (1985). Cited in Rishi KK Current status of fish cytogenetics. In: Das & Jhingram (Eds.), *Fish Genetics in India*. Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi, India. Chromosome Data Retrieval System.

- Oliveira C & Foresti F (1993) Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios*, 76:183–186.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF & Foresti F (2000) Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: VIII Simposium de Citogenética e Genética de Peixes, 2000, Manaus.
- Pardue ML, Brown DD & Birnstiel ML (1973) Location of the genes for 5S ribosomal RNA in *Xenopus laevis*. *Chromosoma*, 42:191–203.
- Pauls E, Affonso PRAM, Netto MRC & Pacheco ML (1996). Supernumerary chromosomes on marine fish *Upeneus parvus* (Poy 1853, Mullidae) from Atlantic Ocean. *Archivos de Zootecnia*, 45:295–299.
- Pedrosa-Harand A, de Almeida CCS, Mosiolek M, Blair M, Schweizer & Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 924-933.
- Phillips RB, Pleyte KA & Hartley SE (1988) Stock-specific differences in the number and chromosome positions of the nucleolar organizer regions in arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Cytogenetic Cell Genetic*, 48: 9-12.
- Pinkel D, Straume T & Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *PNAS*, 83: 2934 – 2938.
- Rishi KK (1973) A preliminary report on the karyotypes of eighteen marine fishes. *Res. Bull (N.S.) Panjaba Universtiy*, 24: 161–162.
- Sá-Gabriel L & Molina WF (2004) Inferências sobre a Evolução cariotípica em Balistidae, Diodontidae, Monacanthidae e Tetraodontidae (Pisces, Tetraodontiformes). Exemplo de extensa diversificação numérica. Master's Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brazil.
- Sá-Gabriel L & Molina WF (2005) Karyotype diversification in fishes of the Balistidae, Diodontidae and Tetraodontidae (Tetraodontiformes). *Caryologia*, 58:229–237.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27(2 - 3): 190-193.
- Shishido R, Sano Y & Fukui K (2000) Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. *Molecular and General Genetics*, 263: 586-591.
- Sola L, Rossi AR, Iaselli V et al. (1992) Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer

regions in *Poecilia mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A₃, and silver staining. *Cytogenetic Cell Genetic*, 60: 229-235.

Stephan W & Cho S (1994) Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics* 136:333–341.

Stephenson EC, Erba HP & Gall JG (1981) Histone gene clusters of the newt *Notophthalmus* are separated by long tracts of satellite DNA. *Cell*, 24: 639-647.

Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research.*, 75:304-306.

Venere PC, Miyazawa CS & Galetti Jr. PM (1999) New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genetic and Molecular Biology*, 22 (3):345-349.

Vicari MR, Artoni RF & Bertollo LAC (2003) Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenetics Genome Research*, 101:24-28.

Vissotto PC, Foresti F & Oliveira C (1999) Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science*, 3: 9–13.

5. CONCLUSÕES

- Nos Ostraciidae, rearranjos Robertsonianos, constituem um dos principais mecanismos de diferenciação cromossômica ao longo da evolução do grupo;
- A grande quantidade de heterocromatina encontrada na família Ostraciidae pode ter facilitado eventos evolutivos em concerto, responsáveis pela extensa variação do conteúdo genômico exibida nas diferentes famílias de Tetraodontiformes;
- Cariótipos similares entre as espécies de Balistidae e Monacanthidae, somadas aos dados morfológicos e moleculares sugerem que estas espécies compartilham um ramo ancestral, com possível origem monofilética;
- A redução numérica observada tanto em Balistidae como em Monacanthidae, sugere que eventos de fusões em tandem, constituem um dos principais mecanismos de evolução cariotípica para estes grupos pós-Perciformes;
- Sítios ribossomais simples e pouca heterocromatina restrita as regiões pericentroméricas nas espécies mais basais, indicam possivelmente que tais caracteres refletem características simplésiomórficas para os membros da família Tetraodontidae;
- A grande diversificação cromossômica da família Tetraodontidae, possivelmente está atrelada a seu potencial para ocupar diferentes habitats;
- A presença de RONS múltiplas nas espécies *Colomesus psittacus*, *Tetraodon fluviatis* e *Canthigaster figueiredoi* podem ser consideradas características apomórficas das espécies;
- RONS múltiplas, polimorfismos heterocromáticos e cromossomos Bs em *C. figueiredoi* podem estar associados à marcante reestruturação e redução genômica sofrida por esta família.
- Diferentes tendências carioevolutivas foram observadas nas famílias estudadas. Eventos de orthoseleção cariotípica parece ser o principal mecanismo na modelagem dos cariótipos dos Tetraodontiformes, levando aos diferentes linhagens à fixação preferencial de alguns tipos de rearranjos cromossômicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida-Toledo LF, Stocker AJ, Foresti F & Almeida Toledo-Filho S (1996) Fluorescence in situ hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chromosome Research*, 4: 301-305.
- Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MF, Lopes CE, Toledo-Filho AS (2000) Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an X₁X₂Y sex chromosome system in Gymnotiformes. *Chromosome Research*, 8:335–340
- Almeida-Toledo LF & Foresti F (2001) Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica* 111:91–100.
- Alfaro ME, Santini F & Brck CD (2007) Do reffs drive diversification in marine Teleosts? Evidence from the pufferfishes and their allies (Order Tetraodontiformes). *Evolution* 61-9: 2104–2126.
- Alves AL & Martins-Santos I (2002) Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax scabripinnis* with 2n = 48 chromosomes (Teleostei, Characidae). *Cytologia* 67:117-122.
- Alves LA, Porto-Foresti F, Oliveira C & Foresti F (2008) Supernumerary chromosomes in the pufferfish *Sphoeroides spengleri* – First occurrence in marine Teleostean Tetraodontiformes fish. *Genetics and Molecular Biology*, 31:243-245.
- Amemiya CT & Gold JR (1986) Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia*, 1986: 226–231.
- Amores A, Martinez G, Reina J & Alvarez MC (1993) Karyotype, C-banding, and Ag-silver NOR analysis of *Diplodus bellottii* (Sparidae, Perciformes): intra-individual polymorphism involving heterochromatic regions. *Genome* 36(4): 672–675.
- Aria R & Katsuyama, I (1976) Chromosome of Tetraodontiform Fishes from Japan. *Bulletin National Science Museum*, 2:59-72.
- Arai R & Nagaiwa K (1976) Chromosomes of tetraodontiform fishes from Japan. *Ibid.*, 2: 59-72.
- Arai R (1983) Karyological and osteological approach to phylogenetic systematics of tetraodontiform fishes. *Bulletin of the National Museum of Natural Science Museum Tokyo Serie A*, 9:175-210.
- Araujo WC, Martinez PA & Molina WF (2010) Mapping of ribosomal DNA by FISH, *EcoRI* digestion and replication bands in the cardinalfish *Apogon americanus* (Perciformes). *Cytologia*, *in press*.

- Artoni RF, Vicari MR, Endler AL, Cavallaro ZI, Jesus CM, Almeida MC & Beukeboom O (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity* 73, 328-336.
- Bertollo LAC, Moreira-Filho O, Galetti Jr PM (1986) Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 28:153-159.
- Bertollo, LAC, Fontes MS, Fenocchio AS & Cano J (1997) The X1X2Y sex chromosome system in the fish *Hoplias malabaricus*. I. G, C and chromosome replication banding. *Chromosome Research*. 5: 493–499.
- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS & Moreira-Filho O (2000) A biodiversity approach in the Neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. *Chromosome Research*, 8:603-613.
- Beukeboom LW (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1st B-chromosome conference. *Heredity*, 73:328–336
- Biemont C (2008) Within-species variation in genome size. *Heredity*. 101:297-298.
- Bradford CS, Milller AE, Tourmadje A, Nishiyama K, Shirahata S & Barnes DW (1997) Characterization of cell cultures derived from *Fugu*, the japanese pufferfish. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6(4): 279 - 288.
- Brainerd EL (1984) Pufferfish inflation: functional morphology of postcranial structures in *Diodon holocanthus* (Tetraodontiformes). *Journal of Morphology*, 220:243–261.
- Brainerd EL & Patek SN (1998) Vertebral column morphology, C-start curvature, and the evolution of mechanical defenses in tetraodontiform fishes. *Copeia*, 1998:971–984.
- Brainerd, EL, Slutz, SS, Hall, EK & Phillis, RW (2001) Patterns of genome size evolution in tetraodontiform fishes. *Evolution* 55: 2363–2368.
- Brenner S, Elgar G, Sandford R, Macrae A, Venkatesh B, & Aparicio S (1993) Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* 366: 265–268.
- Brum MJJ (1996) Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. *Brazilian Journal of Genetica* 19: 421–427.
- Brum MJJ & Galetti Jr. PM (1997) Teleostei ground plan karyotype. *Journal of Computational Biology*, 2:91-102.

- Brum MJL (2000) Cytogenetic studies in Tetraodontiforms *Sphoeroides tyleri* (Tetraodontiformes) and *Chilomycterus spinosus* (Diodontidae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Chromosome Science*, 4:103-105.
- Brutlag DL (1980) Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Annual Review Genetics*, 14:121-44.
- Cai Q, Zhang DM, Liu ZL & Wang XR (2006) Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobilus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Annals of Botany* 97: 715-722.
- Camacho JPM, Sharbel TF & Beukeboom LW (2000) B chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society. B* 355: 163–178.
- Camargo M & Maia T (2008) Análise populacional do baiacu, *Colomesus psittacus* (Tetraodontiformes), no estuário o rio Caeté, costa norte do Brasil. *UAKARI*, 4(1):23-28.
- Canapa A, Cerioni N, Barucca M, Olmo, E & Caputo, V (2002) A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Research*, 10:297-304.
- Cano J, Pretel A, Melendez S, Garcia F, Caputo V, Fenocchio AS & Bertollo LAC (1996). Determination of early stages of sex chromosome differentiation in the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Pisces: Perciformes). *Cytobios* 87:45–59.
- Caputo V, Colomba M, Nisi Cerioni P, Viturri R, Giovannotti M & Olmo E (2003) Chromosome banding and molecular cytogenetic study of two Mediterranean trachinoid fish species (Teleostei: Trachinidae, Uranoscopidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 103:139-143.
- Carpenter KE (2002) The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 3: Bony fishes part 2 (Opistognathidae to Molidae), sea turtles and marine mammals. *FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes and American Society of Ichthyologist and Herpetologist Special Publication No. 5*. Rome, FAO, 1375-2127.
- Cau A, Salvadori S, Deiana AM, Bella JL & Mezzanotte R (1988) The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions and *in situ* digestion with restriction endonucleases. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 47: 223–226.
- Cau A, Salvadori S, Deiana AM, Bella JL & Mezzanotte R (1988) The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions and *in situ* digestion with restriction endonucleases. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 47: 223–226.
- Cavalier-Smith T (1985) *The Evolution of Genome Size*. Wiley, Chichester, U.K.

- Cestari MM & Galetti Jr. PM (1992) Chromosome studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Paraná-Paraguay rivers: evolutionary and cytotaxonomic considerations. *Copeia* 1992(1): 108-112.
- Charlesworth B, Sniegowski P & Wolfgang S (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371:215–220.
- Chaves R, Guedes-Pinto H, Heslop-Harrison J & Schwarzacher T (2000) The species and chromosomal distribution of the centromeric alpha-satellite I sequence from sheep in the tribe Caprini and other Bovidae. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 91: 62-66.
- Chen TC, Ormond RFG & Mok HK (2001) Feeding and territorial behavior in juveniles of three co-existing triggerfishes. *Journal of Fish Biology* 59 (3):524-532.
- Choudhury RC, Prasad R & Das CC (1982) Karyological studies in five tetraodontiform fishes from the Indian Ocean. *Copeia*: 728–732.
- Corradini N, Rossi F, Giordano E, Caizzi R, Vern F & Dimitri P (2007) *Drosophila melanogaster* as a model for studying protein-encoding genes that are resident in constitutive heterochromatin. *Heredity*, 98: 3-12.
- Crnogorac-Jurcevic T, Brown JR & Schalkwyk LC (1997) *Tetraodon fluviatilis*, a new puffer fish model for genome studies. *Genomics*, 41:177-184.
- Datson PM & Murray BG (2006) Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research*, 14: 845-857.
- Diniz D & Bertollo LAC (2006) Intra- and inter-individual chromosome variation in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae). A population study from the Brazilian São Francisco river basin. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 453-458.
- Elmerot C, Arnason U, Gojobori T & Janke A (2002) The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. *Gene* 295, 163–172.
- Ewulonu UK, Haas R & Turner BJ (1985) A multiple sex chromosome system in the annual killifish, *Nothobranchius guentheri*. *Copeia*: 503–508.
- Feitoza BM, Rosa RS & Rocha LA (2005). Ecology and zoogeography of deep-reef fishes in northeastern Brazil. *Bulletin of Marine Science*, 76(3): 725–742.
- Fernandez-Garcia JL, Martínez-Trancón M, Rabasco A & Padilla JA (1998) Characterization of the heterochromatic chromosome regions in sheep. *Genes & Genetic Systems*, 73:45-50.

- Fischer C, Ozouf-Costaz C, Crollius HR, Dasilva C, Jaillon O, Bouneau L, Bonillo C, Weissenbach J & Bernot A (2000) Karyotype and chromosomal location of characteristic tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 88:50–55.
- Fitch DH, Strausbaugh LD & Barrett V (1990). On the origins of tandemly repeated genes: does histone gene copy number in *Drosophila* reflect chromosomal location? *Chromosoma* 99: 118–124.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF & Toledo SA (1989) Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* 79:107–114.
- Franck JPC, Harris AS, Bentzen P, Wright EMD & Wright JM (1991) Organization and evolution of satellite, minisatellite and microsatellite DNAs in teleost fishes. *Oxford Surveys on Eukaryotic Genes*, Vol. 7. Oxford University Press.
- Fraser RH & Currie DJ (1996) The species richness-energy hypothesis in a system where historical factors are thought to prevail: coral reefs. *American Natural*, 148:138–159.
- Galetti Jr., P.M., 1998. Chromosome diversity in Neotropical fishes: NOR studies. *Italian Journal of Zoology*. 65 Suppl.: 53–56.
- Galetti Jr PM, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (1994) Trends in chromosome evolution of neotropical characiform fishes. *Caryologia*, 47: 289-298.
- Galetti Jr. P, Aguilar CT & Molina WF (2000) Na overview of marine fish cytogenetics. *Hydrobiologia*, 420:55-62.
- Galetti Jr. PM, Molina WF, Affonso PRAM & Aguilar CT (2006) Assessing genetic diversity of Brazilian reef fishes by chromosomal and DNA markers. *Genetica*, 126:161-177.
- Garagna S, Broccoli D, Redi CA, Searle JB, Cooke HJ & Capanna E (1995) Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. *Chromosoma*, 103:685-692.
- Garrido-Ramos MA, Jamilena M, Lozano R, Ruiz Rejo'n C & Ruiz Rejo'n M (1995) The EcoRI centromeric satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) contains a sequence motive common to other vertebrate centromeric satellite DNAs. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 71: 345-351.
- Gold Jr, LC, Shipley NS & Powers PK (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal Fish Biology*. 37: 563-575.

- Gregory TR (2001) Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 76: 65–101.
- Grützner F, Lütjens G, Rovira C, Barnes DW, Ropers H-H & Haaf T (1999) Classical and molecular cytogenetics of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Chromosome Research* 1999;7:655–662.
- Hackstein JHP, Hochstenbach R, Hauschteck-Jungen E & Beukeboom LW (1996) Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? *BioEssays* 18(4): 317–323.
- Hanson RE, IslamFaridi MN, Percival EA et al. (1996) Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105: 55-61.
- Hartley SE (1988) Cytogenetic studies of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *Journal Fish Biology*, 33: 735–740.
- Hatanaka T & Galetti PM (2004) Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica*, 122(3), 239-244.
- Holcroft NI (2004) A molecular test of alternative hypotheses of tetraodontiform (Acanthomorpha: Tetraodontiformes) sister group relationships using data from the RAG1 gene. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 32:749–760.
- Holcroft NI (2005) A molecular analysis of the interrelationships of tetraodontiform fishes (Acanthomorpha: Tetraodontiformes). *Molecular phylogenetics and evolution*, 34:525-544.
- Howell WM & Black DA (1980). Controlled silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36, 1014-1015.
- Jaillon O, Aury JM, Brunet F, et al. (61 co-authors) (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*. 431:946–957.
- Jacobina UP, Mello Affonso PRA, Carneiro PLS & Dergan JÁ (2009) Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi, Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 7:617-622.
- Jankun M, Klinger M & Woznicki P (1995) Chromosome variability in European vendace (*Coregonus albula* L.) from Poland. *Caryologia* 48(2): 165–172.
- Jones RN & Rees H (1982) B chromosomes. Academic Press, New York.

- Jones RN (1995) Tansley review no. 85: B chromosomes in plants. *New Phytol.* 131: 411-434.
- Kipling D & Warburton PE (1997) Centromeres, CENP-B and Tigger too. *Trends Genetics*, 13:141–145.
- Kitayama E & Ojima Y (1984) Preliminary report on the Phylogeny of five balistid fish in terms of several chromosome banding techniques in combination with a statistical analysis. *Proceedings of the Japan Academy, Series. B*, 60(3): 95-197.
- Koehler MR, Haaf T, Guttenbach M, Scharl M & Schmid M (1997) Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). II. Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. *Chromosome Research*. 5: 325–331.
- Lauder CV & Liem KF (1983) The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bulletin Museum Comparative Zoology*. 150: 95–197.
- Leis JM (1984) Tetraodontiformes: relationships. In: Moser HG, Richards WJ, Cohen DM, Fahay MP, Kendall Jr. AW, Richardson SL (Eds.), *Ontogeny and Systematics of Fishes*. American Society Ichthyology and Herpetology, pp. 459–463 (Spec. Publ. No. 1).
- Lingo ME & Szedlmayer ST (2006) The influence of habitat complexity on reef fish communities in the northeastern Gulf of Mexico. *Environment Biological Fishes*, 76:71–80.
- Lucchini S, Nardi I, Barsacchi G, Batistoni R & Andronico F (1993) Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S+28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Genome*, 36: 762–773.
- Mandrioli M, Manicardi GC, Bizzaro D & Bianchi U (1999) NOR heteromorphism within a parthenogenetic lineage of the aphid *Megoura viciae*. *Chromosome Research*, 7: 157-162.
- Mandrioli M, Coughi B, Marini M & Manicardi GC (2000) - Cytogenetic analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Chromosome Research*, 8: 237-242.
- Mandrioli M & Manicardi GC (2001) Cytogenetics and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). *Genetica*, 111:433–438.
- Martínez P, Viñas A, Bouza C, Arias J, Amaro R & Sánchez L (1991) Cytogenetical characterization of hatchery stocks and natural populations of Sea and Brown Trout from northwestern Spain. *Heredity* 66: 9–17.
- Mantovani M, Abel LDS, Mestriner CA & Moreira-Filho O (2000) Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in

- Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica* (The Hague), 109: 161-168.
- 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* (The Hague), 111:439-446.
- Miyaki KO, Tabela O & Kayano H (1995) Karyotype in 6 species of *pufferfishes* genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). *Fisheries Science*, 61, 594-598.
- Mayr B, Rab P & Kalat M (1986) Localisation of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Salmo gairdneri* and *Salmo trutta* (Pisces, Salmonidae). *Theoretical and Applied Genetics*, 71:703-707.
- Molina WF (1995) Cromossomos Sexuais e Polimorfismo Cromossômico no gênero *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). Master's Thesis. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, Brazil.
- Molina WF (2001) An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science*, 5:149-152.
- Molina WF (2007) Chromosome changes and stasis in marine fish groups. In: Eva Pisano; Catharine Ozouf-Costaz; Fausto Foresti; B. G. Kapoor. (Org.). *Fish Cytogenetics*. 1 ed. Enfield: Science Publisher, v. 1, p. 1-52.
- Molina WF & Galetti Jr. PM (2002) Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4):373-377.
- Molina WF (2006) Chromosome changes and stasis in marine fishes groups. In: Eva Pisano, Catharine Ozouf-Costaz, Fausto Foresti, B. G. Kapoor. *Fish Cytogenetics*. 1ed. Enfield: Science Publisher, v 1, p. 1-52.
- Molina WF & Bacurau TO (2006). Structural and numerical chromosomal variation in marine Perciformes (Priacanthidae and Gerreidae). *Cytologia*, 71:237-242.
- Molina WF & Oliveira TB (2006) Themis Oliveira de Freitas . Structural and numerical chromosomal variation in marine Perciformes (Priacanthidae and Gerreidae). *Cytologia*, Japão, 71(3): 237-242.
- Molina WF, Shibatta O & Galetti Jr PM (2008) Chromosomal evidence of population subdivision in the freshwater fish *Leporinus elongatus* in the Upper Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 270-274.

- Moraes VPO (2007) Análise citogenética comparativa de diferentes populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). Master Thesis. Universidade Estadual de Londrina, Brazil.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC & Galetti Jr PM (1993). Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia*, 46: 115–125.
- Morescalchi A, Hureau JC, Olmo C, Ozouf-Costaz E, Pisano E & Stanyon R (1992). A multiple sex-chromosome system in antarctic ice-fishes. *Polar Biology*, 11:655-661.
- Moura RL & Castro RMS (2002) Revision of Atlantic sharpnose pufferfishes (Tetraodontiformes: Tetraodontidae: Canthigaster), with description of three new species. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 115(1):32-50.
- Murofushi M (1980) Cytogenetical studies on fishes: III. Multiple sex chromosome mechanism in the filefish, *Stephanolepis cirrhifer*. *Japan Journal Genetics*, 35:127– 132.
- Murofushi M, Nakatsubo T & Smith PJ (1989) Karyological study on the New Zealand leather jacket, *Perika scaber*, fish of the order Tetraodontiformes. *Bulletin of Biogeographic Society Japan*, 44: 35-58.
- Murofushi M & Yosida TH (1979) Cytogenetical studies on fishes. Karyotypes of four filefishes. *Japan Journal Genetics*, 54: 191-195.
- Neafsey DE & Palumbi SR (2003) Genome size evolution in pufferfish: a comparative analysis of diodontid and tetraodontid pufferfish genomes. *Genome Research*, 5: 821-30.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the World*. John Willey and Sons Inc., New York. Fourth edition. 601p.
- Nanda I, Schneider-Rasp M, Winking H & Schmid M (1995) Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosome Research*, 3: 399-409.
- Nirchio M, Gaviria JI, Oliveira C, Ferreira IA & Martins C (2007) Cytogenetic analysis of three species of the *Haemulon* (Teleostei: Haemulinae) from Margarita Island, Venezuela. *Genetica* 131:135-140.
- Nirchio M, Oliveira C, Ferreira IA, Martins C, Rossi AR & Sola L (2009) Classical and molecular cytogenetic characterization of *Agonostomus monticola*, a primitive species of Mugilidae (Mugiliformes). *Genetica*, 135:1-5.

- Noletto RB, Vicari MR, Cipriano RR, Artoni RF & Cestari MM (2006) Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). *Genetica*, 133-138.
- Noletto RB, Guimarães FSF, Paludo KS, Vicari MR, Artoni RF & Cestari MM (2009) Genome Size Evaluation in Tetraodontiform Fishes from the Neotropical Region. *Marine Biotechnology*, p.
- Noletto RB (2009) Cariótipo e mapeamento cromossômico de seqüências repetitivas em peixes marinhos com ênfase em Tetraodontiformes do litoral Paranaense. Tese de doutorado, UFPR.
- Ohno S (1974) Sex chromosomes and sex determining mechanisms. In John, B. (ed.), *Animal Cytogenetics 4*. Gebrüder Borntraeger, Berlin: 46–63.
- Ojima Y (1985). Cited in Rishi KK Current status of fish cytogenetics. In: Das & Jhingram (Eds.), *Fish Genetics in India. Today and Tomorrow's Printers and Publishers*, New Delhi, India. Chromosome Data Retrieval System.
- Oliveira C & Foresti F (1993) Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios*, 76:183–186.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF & Foresti F (2000) Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: VIII Simposium de Citogenética e Genética de Peixes, 2000, Manaus.
- Ozouf-Costaz CE, Pisano E, Bonillo C & Williams R (1996) Ribosomal RNA location in the antarctic fish *Champscephalus gunnari* (Notothenioidei, Channichthyidae) using banding and fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Research*, 4: 557:561.
- Pardue ML, Brown DD & Birnstiel ML (1973) Location of the genes for 5S ribosomal RNA in *Xenopus laevis*. *Chromosoma*, 42:191–203.
- Pauls E (1993) Estudos citogenéticos em peixes marinhos visando o melhoramento genético. Thesis. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.
- Pauls E, Affonso PRAM, Netto MRC & Pacheco ML (1996). Supernumerary chromosomes on marine fish *Upeneus parvus* (Poy 1853, Mullidae) from Atlantic Ocean. *Archivos de Zootecnia*, 45:295–299.
- Pedersen RA (1971) DNA content, ribosomal gene multiplicity, and cell size in fish. *Journal Experimental Zoology*, 177:65–78.
- Pedrosa-Harand A, de Almeida CCS, Mosiolek M, Blair M, Schweizer & Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 924-933.

- Pendás, A.M., P. Mórán, J.P. Freije & E. Garcia-Vásquez, 1994. Chromosomal location and nucleotide sequence of two *tandem* repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 67: 31–36.
- Petrov DA (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genetics*, 17:23–28.
- Phillips RB, Pleyte KA & Hartley SE (1988) Stock-specific differences in the number and chromosome positions of the nucleolar organizer regions in arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Cytogenetic Cell Genetic*, 48: 9-12.
- Pinkel D, Straume T & Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *PNAS*, 83: 2934 – 2938.
- Porto-Foresti F, Oliveira C, Maistro EL & Foresti F. (1997) Estimated frequency of B-chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis* paranae in a small stream. *Brazilian Journal Genetics*, 20:377-380.
- Porto-Foresti F, Oliveira C, Gomes EA, Tabata YA, Rigolino MG & Foresti F (2004) A lethal effect associated with polymorphism of the NOR-bearing chromosomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Genetics and Molecular Biology*,. 27, pp. 51–54.
- Probst AV & Almouzni G (2008) Pericentric heterochromatin: Dynamic organization during early development in mammals. *Differentiation*, 76:15-23.
- Prokopowich CD, Gregory TR & Crease TJ (2003) The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 46-48-50.
- Radic MZ, Lundgren K & Hamkalo BA (1987) Curvature of mouse satellite DNA and condensation of heterochromatin. *Cell*, 50:1101–1108.
- Redi CA, Garagna S, Zacharias H, Zuccotti M & Capanna E (2001) The other cromatin. *Chromosome*, 110(3):136-147.
- Redi CA, Garagna S & Zuccotti M (1990) Robertsonian chromosome formation and fixation: the genomic scenario. *Biological Journal Linnean Society*, 41: 235-255.
- Rishi KK (1973) A preliminary report on the karyotypes of eighteen marine fishes. *Res. Bull (N.S.) Panjaba Universtiy*, 24: 161–162.
- Rocha LA (2003) Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef fishes. *Journal of Biogeography*, 30:1161-1171.
- Rossi F, Moschetti R, Caizzi R, Corradini N & Dimitri P (2007) Cytogenetic and molecular characterization of heterochromatin gene models in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 175: 595-607.

- Sá-Gabriel L & Molina WF (2004) Inferências sobre a Evolução cariotípica em Balistidae, Diodontidae, Monacanthidae e Tetraodontidae (Pisces, Tetraodontiformes). Exemplo de extensa diversificação numérica. Master's Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brazil.
- Sá-Gabriel L & Molina WF (2005) Karyotype diversification in fishes of the Balistidae, Diodontidae and Tetraodontidae (Tetraodontiformes). *Caryologia*, 58:229–237.
- Santani A, Raudsepp T & Chowdhary BP (2002) Interstitial telomeric sites and NORs in Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*) chromosomes. *Chromosome Research* 10:527–534.
- Santini F & Tyler JC (2003) A phylogeny of the families of fossil and extant tetraodontiform fishes (Acanthomorpha, Tetraodontiformes), Upper Cretaceous to recent. *Zoological Journal of Linnean Society*, 139:565–617.
- Santini F & Tyler JC (2004) The importance of even highly incomplete fossil taxa in reconstructing the phylogenetic relationships of the Tetraodontiformes (Acanthomorpha : Pisces). *Integrative and Comparative Biological*, 44:349–357.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27(2 - 3): 190-193.
- Shishido R, Sano Y & Fukui K (2000) Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. *Molecular and General Genetics*, 263: 586-591.
- Slijepcevic P, Hande MP, Boufêzer SD, Lansdorp P & Bryant PE (1997) Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. *Chromosoma* 106: 413-421.
- Sola L, Rossi AR, Iaselli V et al. (1992) Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A₃, and silver staining. *Cytogenetic Cell Genetic*, 60: 229-235.
- Stephan W & Cho S (1994) Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics* 136:333–341.
- Stephenson EC, Erba HP & Gall JG (1981) Histone gene clusters of the newt *Notophthalmus* are separated by long tracts of satellite DNA. *Cell*, 24: 639-647.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*., 75:304-306.

- Sumner AT (2003) Chromosomes: organization and function. Blackwell Science, 84-96.
- Suzuki H, Sakurai S & Matsuda Y (1996) Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 72: 1–4.
- Szpilman (2000) Peixes marinhos do Brasil – Guia prático de identificação. Instituto Ecológico Aqualung, Rio de Janeiro, 288p.
- Takai A & Ojima Y (1987) Comparative chromosomal studies in three balistid fishes. *Kromosomo (Tokyo)*, 7-48.
- Thode G, Amores A & Martinez G (1994) The Karyotype Of Balistes: *Carolinensis gmelin* (Pisces, Tetraodontiformes) A Specialized Species. *Caryologia*, 47 (3-4): 257-263.
- Tyler JC (1968) A monograph on plectognath fishes of the superfamily Triacanthoidea. Monograph Academy National Science Philadelphia, 16:1-364.
- Tyler JC (1980) Osteology phylogeny and higher classification of the fishes of the order plectognathi tetraodontiformes. NOAA Technical Report NMFS Circ. 431:1–422.
- Tyler JC & Sorbini L (1996) New superfamily and three new families of tetraodontiform fishes from the upper Cretaceous: the earliest and most morphologically primitive plectognaths. *Smith. Contr. Paleobiology*, 83:1–59.
- Vasconcelos AJM & Molina WF (2009) Cytogenetical studies in five Atlantic Anguiliformes fishes. *Genetics and Molecular Biology*, version online.
- Venere PC, Miyazawa CS & Galetti Jr. PM (1999) New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genetic and Molecular Biology*, 22 (3):345-349.
- Vicari MR, Artoni RF & Bertollo LAC (2003) Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenetics Genome Research*, 101:24-28.
- Vissotto PC, Foresti F & Oliveira C (1999) Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chromosome Science*, 3: 9–13.
- Wainwright PC, Turingan RG & Brainerd EL (1995) Functional morphology of pufferfish inflation: mechanism of the buccal pump. *Copeia*:614–625.
- Wachtel SS & Tiersch TR (1993) Variations in genome mass. *Computational Biochememical Physiology*, 104:207–213.

- Weichenhan D, Kunze B, Traut W & Winking H (1998) Evolution by fusion and amplification: the murine Sp100-rs gene cluster. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 80:226-231.
- White MJD (1973) *Animal Cytology and Evolution*. 3rd ed. Cambridge. Cambridge University Press, 961 p.
- Wiberg UH (1983) Sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*, L.). A hypothesis based on cytogenetic results, correlated with the findings of skewed sex ratios in eel culture ponds. *Cytogenetics and Cell Genetics* 36: 589–598.
- Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, Katoh M, Sakai H & Nishida Mutsumi. (2008). A new perspective on phylogeny and evolution of tetraodontiform fishes (Pisces: Acanthopterygii) based on whole mitochondrial genome sequences: Basal ecological diversification? *BMC Evolutionary Biology* 8:212.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)