

RAFAEL BUENO NOLETO

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM TETRAODONTIFORMES *Sphoeroides greeleyi* e *S. testudineus* (TETRAODONTIDAE) e *Cyclichthys spinosus* (DIODONTIDAE) PERTENCENTES AO LITORAL DO PARANÁ

CURITIBA

2003

RAFAEL BUENO NOLETO

ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM TETRAODONTIFORMES *Sphoeroides greeleyi* e *S. testudineus* (TETRAODONTIDAE) e *Cyclichthys spinosus* (DIODONTIDAE) PERTENCENTES AO LITORAL DO PARANÁ

Monografia apresentada à disciplina BG016 do Departamento de Genética - Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2003

“La tentación permanente del científico es confundir hipótesis con realidades. Su mayor frustración es ver que las realidades destruyen sus hipótesis. Sin embargo, esta frustración es provechosa porque de ella nace la verdad”.

N.O.Bianchi

AGRADECIMENTOS

Mesmo que eu esqueça de alguém, deixo aqui o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que colaboraram para o desenvolvimento deste estudo.

Expresso minha grande consideração e amizade à todos do Laboratório de Citogenética Animal: Cristina, Daniel, Elizabete, Íris, Roger, Roxane, Sabine, Polly, Fátima, Andréa, Deborah, Prof. Ives José Sbalqueiro e a todos os estagiários que estão iniciando. Agradeço da mesma forma aos professores e funcionários do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Meu especial agradecimento a minha orientadora e idealizadora deste projeto, Professora Doutora Marta Margarete Cestari, pelas sugestões fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa mas sobretudo pela amizade, paciência e apoio que foram a mim dedicados.

Ao Prof. Henry Spach do Centro de Estudos do Mar que permitiu minhas coletas oportunistas dentro das suas e que também me ajudou quando o procurei para sanar certas dúvidas que surgiram.

Ao meu ex-orientador, Prof. Dr. Alberto Sérgio Fenocchio, da Universidad Nacional de Misiones e ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, membros da Banca Examinadora, pelas sugestões e críticas apresentadas.

Também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Finalmente agradeço à minha família e a todos os meus amigos, da Universidade (99/1), de outros períodos e os companheiros de bar. Enfim a todos vocês que foram determinantes no progresso e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Características Gerais.....	1
1.2. Aspectos Filogenéticos.....	2
1.2.1. Famílias Diodontidae e Tetraodontidae.....	3
1.2.2. Sistemática do Grupo Teleósteo.....	5
1.3. Genoma dos Tetraodontiformes.....	5
1.4. Citogenética de Peixes.....	7
1.4.1. Regiões Organizadoras de Nucléolo e Heterocromatina.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material.....	14
3.2. Métodos.....	16
3.2.1. Coletas.....	16
3.2.2. Obtenção de Metáfases Mitóticas.....	17
3.2.3. Coloração Convencional – Giemsa.....	17
3.2.4. Bandamento C.....	18
3.2.5. Bandamento RON.....	18
3.2.6. Fluorocromo Cromomicina A ₃	19
3.2.7. Montagem e Análise dos Cariótipos.....	20
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Resultados – Família Tetraodontidae.....	22
4.1.1. <i>Sphoeroides greeleyi</i>	22
4.1.2. <i>Sphoeroides testudineus</i>	25
4.2. Resultados – Família Diodontidae.....	27
4.3. Discussão – Família Tetraodontidae.....	31
4.4. Discussão – Família Diodontidae.....	35
5. CONCLUSÕES.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Aspecto do baiacu quando retirado da água. Neste caso é o ar que promove a inflação.....4
- FIGURA 2: Escala de tamanho de genomas das famílias de Tetraodontiformes (filogenia baseada em caracteres morfológicos).....6
- FIGURA 3: Exemplos de *S. greeleyi* (A) e *S. testudineus* (B). Tamanho aproximado de 13 cm..... 14
- FIGURA 4: Exemplo adulto de *Cylichthys spinosus*, medindo cerca de 12 cm.....15
- FIGURA 5: Localização da Gamboa do Rio Baguaçu (seta branca) na Baía de Paranaguá..... 15
- FIGURA 6: Metodologia empregada na coleta com a rede de arrasto (picaré)..... 16
- FIGURA 7: Cariótipos de *Sphoeroides greeleyi* (A) e *Sphoeroides testudineus* (B), $2n=46$ com (NF=74) e (NF=76) respectivamente.....23
- FIGURA 8: Padrão de bandas C em *S. greeleyi*. Cromossomos com heterocromatina C⁺ localizada nos telômeros (setas vermelhas) e nos centrômeros (setas azuis).....24
- FIGURA 9: Coloração com nitrato de prata em *Sphoeroides greeleyi* indicando as Regiões Organizadoras de Nucléolo (setas).....24
- FIGURA 10: Coloração com CMA₃. As setas indicam os cromossomos portadores de regiões ricas em GC.....25
- FIGURA 11: Bandas C em *Sphoeroides testudineus*. As setas indicam em alguns cromossomos regiões heterocromáticas ocupando todo um braço.....26

FIGURA 12: Metáfase de <i>Spherooides testudineus</i> corada com prata. As setas indicam o par portador das RONS.....	26
FIGURA 13: Cariótipo de <i>C. spinosus</i> com $2n=50$ cromossomos e $NF=84$. Em destaque o par portador das regiões organizadoras de nucléolo após impregnação por nitrato de prata.....	28
FIGURA 14: Metáfases coradas com Giemsa (A) e seqüencialmente com $AgNO_3$ (B). Associação entre os cromossomos portadores das RONS constatada também pelo bandamento C.....	28
FIGURA 15: Coloração com CMA_3 destacando os cromossomos com regiões ricas em bases GC.....	29
FIGURA 16: Bandas C. Segmentos heterocromáticos ocupando todo um braço (setas azuis) e associados às RONS (setas vermelhas).....	29
FIGURA 17: Cromossomos portadores das RONS na espécie <i>C. spinosus</i> após as respectivas técnicas de coloração e bandamento utilizadas.....	30

LISTA DE TABELAS

TABELA I – Dados cariotípicos de representantes da família Tetraodontidae.....	33
--	----

RESUMO

Os complexos estuarinos da região sul-sudeste do Brasil são caracterizados por apresentarem canais no manguezal, chamados de gamboas, que consistem em ecossistemas de extrema importância na reprodução e desenvolvimento de diversas espécies de peixes. Os “baiacus” das famílias Diodontidae e Tetraodontidae são principalmente marinhos, mas várias espécies ocorrem em águas salobras e doces, em regiões tropicais e subtropicais. Estes peixes contêm a tetrodotoxina, encontrada na pele, fígado e gônadas, onde atua como ferormônio. Com relação aos Tetraodontiformes, é característico deste grupo ter a menor relação DNA/célula entre os peixes. Os “baiacus-espinho” da família Diodontidae possuem um genoma estimado em 1,6 a 1,8 picogramas de DNA por célula diplóide. Contudo o genoma dos tetraodontídeos é duas vezes menor (0,7-1,0 pg), sendo portanto o menor de todos os vertebrados, fato que explica seus cromossomos reduzidos e as dificuldades na obtenção de metáfases mitóticas. O objetivo deste estudo foi caracterizar citogeneticamente duas espécies do gênero *Sphoeroides* (Tetraodontidae) e *Cylichthys spinosus* (Diodontidae) oriundos da Baía de Paranaguá – PR: *S. testudineus* (2F e 13M), *S. greeleyi* (10F e 1M) e *C. spinosus* (1F, 2M e 1 imaturo). Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células renais segundo a técnica “air drying”, nitrato de prata foi utilizado para evidenciar as Regiões Organizadoras de Nucléolo, para o estudo de bandas C utilizou-se o tratamento com hidróxido de bário e bandas fluorescentes foram obtidas com CMA₃. Para a família Tetraodontidae foi observado nas duas espécies 2n=46 cromossomos sendo a fórmula cariotípica para *S. testudineus* 30M/SM+16A (NF=76) e para *S. greeleyi* 24M/SM+4ST+18A (NF=74). O cariótipo composto por 2n=46 cromossomos, com a ocorrência de cromossomos M e SM, é considerado básico para as espécies da família Tetraodontidae, embora represente uma condição derivada para a ordem Tetraodontiformes, que tem como cariótipo basal 2n=48 cromossomos. As bandas C positivas evidenciaram para ambas as espécies regiões centroméricas, contudo em *S. greeleyi* houve também marcações teloméricas em alguns pares de cromossomos e em *S. testudineus* todo o braço curto de certos cromossomos. Um padrão de RONS simples foi observado para as duas espécies. *S. testudineus* as apresentou em posição telomérica no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos, e *S. greeleyi* na posição telomérica em um par de cromossomos acrocêntricos, os quais foram também marcados pela CMA₃. O diodontídeo *C. spinosus*, apresentou 2n=50 cromossomos, distribuídos em 4M+18SM+12ST+16A (NF=84). Da mesma forma que nos tetraodontídeos anteriormente, não foi verificado heteromorfismo cromossômico sexual para esta espécie. As Ag-RONS se mostraram positivas na posição terminal do braço curto do par 5 (SM), cuja região foi também corada positivamente pelo bandamento C e CMA₃. Frequentemente foi observada associação destes cromossomos pela região das RONS. Bandas C⁺ foram reveladas nos

centrômeros, associadas às RONS e ocupando todo um braço de um par de cromossomos submetacêntricos. Embora análises adicionais deverão ser realizadas, os resultados do presente estudo acrescentam dados relevantes para abordagens citotaxonômicas e para construção de um cenário consistente da evolução cromossômica para estas famílias e para peixes desta ordem.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os peixes formam o grupo mais numeroso e diversificado entre os vertebrados, distribuindo-se nas águas do mundo em grande variedade morfológica e comportamental. Habitam diversos ambientes, podendo ser encontrados em águas com salinidades variando de 0 a 100%, e temperaturas entre -2 e 44°C (NELSON, 1994). Aproximadamente 58% das espécies viventes são marinhas, 41% dulciaquícolas e 1% são encontradas em ambientes de transição, como os estuários (MOYLE; CECH, 1982). Aproximadamente 78% dos peixes marinhos vivem em águas rasas, de até 200 metros de profundidade, e 13% estão associados às águas oceânicas.

O litoral brasileiro apresenta uma extensão de 8.000 Km, aproximadamente. A costa do Brasil pode ser dividida em ambientes de plataforma continental e estuarinos-lagunares. Os estuários são formados devido a amplitude das marés e ao grande número de desembocaduras fluviais na região tropical. São rodeados por mangues, constituídos de árvores halofíticas e arbustos, sendo habitats pouco estáveis, com grande variação na salinidade e temperatura. Os ecossistemas estuarinos são importantes para o desenvolvimento e reprodução de várias espécies de peixes ditas anádromas, as quais migram para o estuário no período reprodutivo e que geralmente possuem alta capacidade de adaptação às variações abióticas características destes ambientes. Os complexos estuarinos da região sul-sudeste do Brasil são caracterizados por apresentarem canais no manguezal, chamados gamboas, responsáveis pelo grande fluxo de matéria orgânica entre continente e estuário, além de abrigarem adultos e formas juvenis de peixes e crustáceos durante seu desenvolvimento (ROCHA; FAVARO; SPACH, 2002).

1.2. ASPECTOS FILOGENÉTICOS DOS TETRAODONTIFORMES

A divisão Teleostei, é considerada a mais derivada constituinte da Classe Actinopterygii (BRUM; MOTA 2002), representando o mais numeroso e bem sucedido grupo de peixes, devido a sua abundância e diversidade entre os vertebrados. Correspondem a cerca de 96% de todos os peixes existentes, contendo segundo NELSON (1994) cerca de 24.000 espécies distribuídas em 45 ordens e aproximadamente 435 famílias. Este número é mais da metade do número de espécies de vertebrados conhecido. Os teleósteos marinhos são extremamente dispersos, sendo representados principalmente pelos Elopomorpha, Clupeiformes, Stenopterygii, Scopelomorpha, Paracanthopterygii, Beryciformes, Syngnathiformes, Scorpaeniformes, Perciformes, Pleuronectiformes e Tetraodontiformes.

Dentro dos teleósteos destacam-se os Acantopterígios, representando um grupo monofilético caracterizado por algumas estruturas e suas especializações funcionais, tais como aparelho mandibular faríngeo e um mecanismo mandibular próprio, que promove versatilidade na capacidade de protrusão. Formam 13 Ordens e estão divididos em 3 séries, os Atherinomorpha, os Mugilomorpha e os Percomorpha (NELSON, 1994). Na última é que estão incluídos os mais especializados tipos de peixes atuais, como os Perciformes e os Tetraodontiformes.

Os Tetraodontiformes (baiacus e peixe-lua), foram primeiramente reconhecidos como um grupo natural por Cuvier em 1817. Destaca-se na série Percomorpha por representarem um dos principais fins-de-linha da irradiação dos Teleósteos, possuindo peculiaridades morfológicas e genéticas. Com cerca de 330 espécies, quase todas marinhas, são formas circuntropicais e subtropicais, a maioria ocorrendo em águas rasas. Morfologicamente são muito mais diversificados que outros grupos de peixes de comparável número de espécies. Atualmente há um consenso na monofilia do grupo dos tetraodontiformes por compartilharem as seguintes características: a região branquiostegal é coberta por pele com ou sem escamas, a abertura branquial é muito reduzida, não se estendendo para baixo da base da nadadeira peitoral e todos os membros perderam os ossos orbitais, parietais, nasais, os canais sensoriais nos ossos do crânio e o espinho da nadadeira anal (TYLER, 1980).

Com relação ao parentesco dos demais peixes e a Ordem Tetraodontiformes, duas suposições são postuladas: a primeira é que são todos Perciformes, e a outra, que são um subgrupo dos Perciformes. Para PATTERSON (1964) a sub-ordem Acanthuroidea dos Perciformes pode ser o grupo irmão dos Tetraodontiformes, devido à semelhança entre os balistídeos adultos e as larvas de Acanthuroidea, podendo eles terem surgido por pedomorfose dos Acanthuroides. Enquanto que TYLER (1980), os considera derivados do grupo dos pós-perciformes (aceita pela maior parte dos sistematas). Para NELSON (1994) os Tetraodontiformes são grupo irmão dos Perciformes ou Zeiformes sugerido por estudos morfológicos. Conforme Nelson (1994), se reconhece nove famílias dos Tetraodontiformes: Triacanthodidae, Triacanthidae, Monacanthidae, Balistidae, Ostraciidae, Triodontidae, Tetraodontidae, Diodontidae e Molidae.

1.2.1. FAMÍLIAS DIODONTIDAE E TETRAODONTIDAE

Dentre as famílias de Tetraodontiformes, destaca-se Diodontidae e Tetraodontidae, que reúnem os peixes popularmente conhecidos como baiacus. A primeira agrupa os baiacus com apenas duas placas dentárias e recobertos por espinhos, que podem ser permanentemente eretos ou dobrados para baixo quando o animal não está inflado, e a segunda os peixes com 4 placas dentárias na boca e o tegumento liso. Os baiacus são basicamente marinhos, mas várias espécies ocorrem em águas salobras e doces, em regiões tropicais e subtropicais, nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico. De acordo com FIGUEIREDO e MENEZES (2000), *S. testudineus* ocorre desde Nova Jersey (EUA) até o estado de Santa Catarina (Brasil) e *S. greeleyi* de Honduras até o litoral do Paraná. Segundo NELSON (1994), os tetraodontídeos são representados por 9 gêneros e 121 espécies, já a família Diodontidae por 6 gêneros e 19 espécies. No litoral Paranaense a família Tetraodontidae é representada pelas espécies simpátricas *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758) e *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert, 1900).

O estômago desses peixes é altamente modificado de modo a permitir que ele infle a tamanhos notáveis. O processo de inflação ocorre quando o baiacu, assustado ou irritado, engole água para dentro de um divertículo ventral (pequena

bolsa) do estômago. A deflação ocorre ao expelirem a água. Quando retirados da água, a inflação pode ocorrer com o ar (Fig. 1).

No Brasil possuem baixo valor econômico devido à presença da tetrodotoxina (TTX), que pode ser fatal se ingerida, pois age no sistema nervoso central e periférico. No peixe ela se concentra na pele, no fígado e nas gônadas, onde atua como ferormônio (MATSUMURA, 1995 apud ROCHA; FAVARO; SPACH, 2002). Independente deste motivo, estes peixes têm grande importância no equilíbrio trófico de ecossistemas aquáticos apresentando como hábito alimentar invertebrados sésseis.



FIGURA 1 – Aspecto do baiacu quando retirado da água. Neste caso é o ar que promove a inflação.

1.2.2. SISTEMÁTICA DO GRUPO TELEÓSTEO

Posição taxonômica das duas famílias do presente estudo, segundo NELSON (1994):

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Superclasse Gnathostomata

Grade Teleostomi

Classe Actinopterygii

Subclasse Neopterygii

Infra-Classe Halecostomi

Divisão Teleostei

Subdivisão Euteleostei

Superordem Acanthopterygii

Série Percomorpha

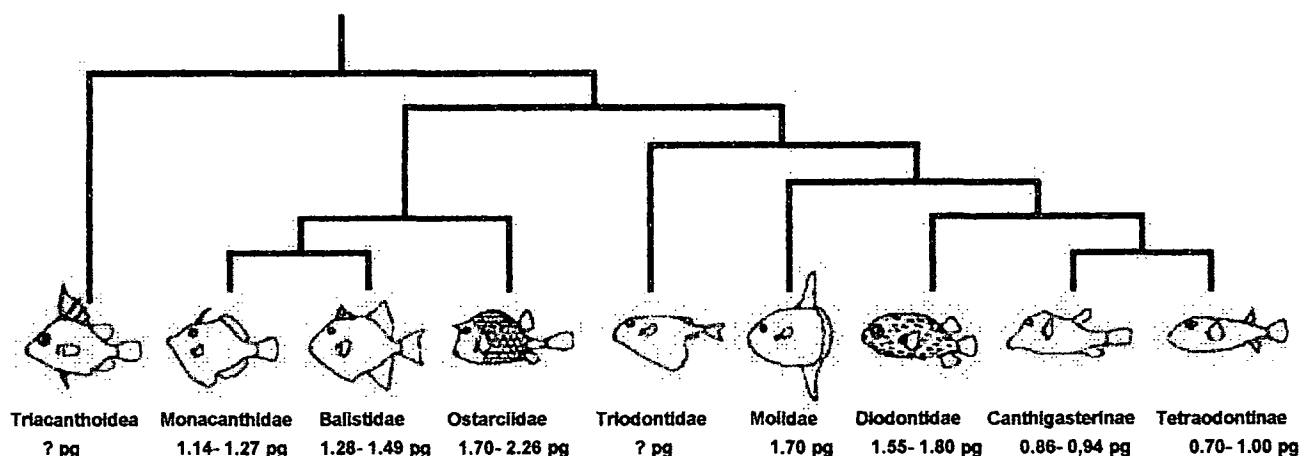
Ordem Tetraodontiformes

Famílias Tetraodontidae e Diodontidae

1.3. GENOMA DOS TETRAODONTIFORMES

As evidências paleontológicas sugerem que a radiação dos teleósteos ocorreu entre 150 e 250 milhões de anos atrás. Uma duplicação do genoma inteiro em um teleósteo ancestral foi proposta como a matéria-prima genética para explicar a radiação dos teleósteos, porém mais evidências são requeridas para confirmar esta hipótese (VENKATESH, 2003). As diferenças quanto ao tamanho do genoma em diversas linhagens sugere que a expansão ou a compressão dos genomas ocorreu independente em cada linhagem. Enquanto a expansão parece ser o resultado de duplicações em tandem de locos, de cromossomos ou do genoma inteiro ou ainda da acumulação de seqüências repetitivas, um genoma compacto é o resultado de deleções acumuladas ou consiste no estado primitivo (VENKATESH; GILLIGAN; BRENNER, 2000).

O tamanho do genoma, medido em picogramas (pg) de DNA por célula diplóide, varia grandemente nos vertebrados, sendo o maior observado em *Protopterus aethiopicus* com 284 pg (PEDERSEN, 1971 apud BRAINERD et al., 2001). Estudos recentes mostraram que os baiacus lisos (família Tetraodontidae) têm o menor genoma de todos os vertebrados estimado em 0,7-1,0 picograma diplóide (~800 Mpb) (HINEGARDNER; ROSEN, 1972), que equivale a oito vezes menor do que o genoma humano. Entretanto, este tamanho minúsculo do genoma não é característico de todos os peixes Tetraodontiformes, nem uniforme para todos os baiacus. Os baiacus espinhos, membros da família Diodontidae (grupo irmão de Tetraodontidae) possuem um genoma que é quase duas vezes maior (1,6-1,8 pg). O tamanho do genoma nos membros de outras famílias de Tetraodontiformes varia extensamente de 1,14 a 2,26 pg (Fig. 2) (BRAINERD et al., 2001). Contudo, mesmo possuindo o menor genoma, os tetraodontídeos têm um repertório similar de genes a de outros vertebrados, que estão densamente organizados em cerca de 6kb por gene, o que é próximo ao encontrado em invertebrados (5kb/gene), devido à redução do número e comprimento dos íntrons (VENKATESH; GILLIGAN; BRENNER, 2000; ELMEROT et al., 2002).



FONTE: BRAINERD et al., 2001

FIGURA 2 – Escala de tamanho de genomas das famílias de Tetraodontiformes (filogenia baseada em caracteres morfológicos).

A diferença no tamanho do genoma entre o tetraodontídeos e os diodontídeos resultou numa perda de DNA nos baiacus lisos em relação a seus primos (Diodontidae) durante os 50-70 milhões de anos, desde sua divergência (TYLER, 1980; BRAINERD et al., 2001; TYLER; SANTINI, 2002 apud NEAFSEY; PALUMBI, 2003). O tamanho do genoma resulta de um contrapeso entre mecanismos que aumentam seu tamanho, tal como as duplicações, inserções, elementos transponíveis e poliploidia, e os que tendem a diminuir o tamanho, tais como mecanismos espontâneos de deleções e reparo do DNA (PETROV, 2001 apud BRAINERD et al., 2001). Partindo destes pressupostos, uma taxa mais elevada de deleções neutralizando as inserções, pode explicar a contração do tamanho do genoma na família Tetraodontidae. Logo, sugere-se que o tamanho do genoma dos baiacus lisos tem diminuído gradualmente em todas as linhagens de Tetraodontidae desde sua divergência dos baiacus espinhos (NEAFSEY; PALUMBI, 2003; BRAINERD et al., 2001).

Neste contexto, os baiacus são particularmente úteis para estudos genômicos. O segundo vertebrado a ter seu genoma totalmente seqüenciado foi o tetraodontídeo *Fugu rubripes*, anunciado em (<http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk>), e o genoma de um outro baiacu, *Tetraodon nigroviridis*, está praticamente seqüenciado. Estas informações revelam a importância em se usar um genoma compacto de vertebrado como referência para genomas complexos, auxiliando desta forma a descobrir genes complexos, regulatórios e a arquitetura genômica. Seus genomas também oferecem um modelo interessante para compreender as forças evolutivas que conduzem a uma redução no tamanho do genoma (NEAFSEY; PALUMBI, 2003; BRAINERD et al., 2001; VENKATESH; GILLIGAN; BRENNER, 2000).

1.4. CITOGENÉTICA DE PEIXES

A citogenética tenta estabelecer relações entre variáveis genéticas e demográficas, onde a partir de dados sobre o número diplóide ($2n$), o número fundamental (NF) e padrões de diversas técnicas de bandamento, se possam elaborar padrões de relacionamento ou filogenias, além da identificação de espécies e/ou possíveis vias de especiação (MATHEY, 1949). O fundamento teórico que

sustenta a existência da citotaxonomia e da citosistemática, reside no fato de que a maioria das espécies possui características citogenéticas únicas.

Os primeiros estudos citogenéticos de peixes foram publicados por RETZIUS e KASTSCHENKO (1890) apud (DENTON, 1973), contudo, até a descoberta e aplicação dos inibidores mitóticos e dos tratamentos hipotonizantes para estudos das células em divisão, muito pouco foi feito nesta área. Com a descoberta de outras técnicas e novos métodos, a partir da década de 70 a citogenética teve um maior desenvolvimento permitindo atualmente o conhecimento dos cariótipos de um número bem maior de espécies. Já foram estudados até o momento em peixes, os cariótipos em coloração convencional de 921 espécies, 252 gêneros e 44 famílias de águas continentais (OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2000). Estes números, quando comparados aos de mamíferos e outros grupos de seres vivos, se tornam bastante reduzidos, devido ao fato dos cromossomos da maioria dos peixes serem bem menores e às técnicas de bandamento não serem tão resolutivas no estudo de cromossomos de peixes (BRUM, 1995). Atualmente acredita-se que isso seja um reflexo da estrutura física diferenciada das alças cromatínicas ao longo do cromossomo metafásico (SAITOH; LAEMMLI, 1994).

Na ictiofauna brasileira, poucos peixes marinhos têm sido cariotipados, quando comparados às espécies de água doce. Até o momento, entre as milhares de espécies existentes, foram cariotipadas aproximadamente 81 distribuídas em 35 famílias e 60 gêneros (OLIVEIRA; ALMEIDA-TOLEDO; FORESTI, 2000), todas da divisão Teleostei. A maioria das espécies estudada é da costa do Rio de Janeiro, e as demais das costas do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Norte.

Os níveis de variação genética inter-populacional de peixes marinhos detectados por diversos métodos moleculares e enzimáticos são, geralmente inferiores aos de peixes dulciaquícolas. Os Teleósteos marinhos apresentam uma pequena variabilidade quanto ao número cromossômico e grande uniformidade cariotípica. Como observado entre os Percomorpha, a maioria das espécies apresenta 48 cromossomos (BRUM; GALETTI Jr., 1997; CORRÊA; GALETTI Jr., 1997; AGUILAR; GALETTI Jr., 1997). Em Perciformes, a maior ordem entre os Teleósteos atuais, o número diplóide $2n=48$ cromossomos aparece em aproximadamente 65% das espécies analisadas até o momento (AFFONSO, 2000). O cariótipo apresentando 48

cromossomos acrocêntricos é considerado o primitivo dos peixes teleósteos e uma herança dos primeiros vertebrados (OHNO, 1970; OHNO, 1974; MURAMOTO; OHNO; ATKIN, 1968; OHNO; WOLF; ATKIN, 1968). Segundo BRUM (1996), o $2n=48$ e $NF=48$ deveria ser considerado uma sinapomorfia dos grupos Euteleostei e Clupeiformes, conservada principalmente nas espécies marinhas. Esta peculiaridade parece estar associada às estruturas populacionais das espécies marinhas, onde o fluxo gênico é menos restrito e a formação de barreiras geográficas é bem inferior à detectada em águas continentais. Com isso tem-se grandes populações em ambiente marinho e uma tendência a homogeneização genética entre elas (BRUM, 1995). Segundo CANO et al. (1982) apud AFFONSO (2000) as inversões pericêntricas estão entre os principais mecanismos envolvidos na evolução do cariótipo em teleósteos, levando a alterações no número de braços cromossômicos. A maioria das opiniões aponta para uma tendência no aumento do número fundamental (NF), seguida da redução de valores $2n$.

Também incluídas na série Percomorpha, as espécies da ordem Tetraodontiformes são as que apresentam os cariótipos mais variáveis, com números diplóides entre 28 e 52 cromossomos, que BRUM e GALETTI Jr. (1997) consideram variações do cariótipo base dos Percomorpha. Esta ordem possui 339 espécies (NELSON, 1994), no entanto existem informações citogenéticas de apenas 53 (BRUM; GALETTI, 1997; BRUM, 2000). Esta carência de estudos provavelmente reside no fato deste grupo de peixes possuírem um genoma compacto, com pequenos íntrons e não muitas seqüências repetitivas (MANDRIOLI et al., 2000 apud BRUM; MOTA, 2002), gerando dificuldade nas análises cromossômicas, principalmente no que se refere a alguns tipos de bandamentos. Com relação aos Tetraodontiformes, este grupo caracteriza-se por ter a menor relação entre DNA/célula dentre os peixes, explicando seus cromossomos reduzidos e as dificuldades na obtenção de metáfases mitóticas (HINEGARDNER; ROSEN, 1972). Os "baiacus lisos" pertencentes à família Tetraodontidae têm o menor genoma de todos os vertebrados estimado em 0,7 a 1,0 picograma de DNA por célula diplóide (BRAINERD et al., 2001). A variação do número diplóide na família é de $2n=28$ em *Canthigaster coronata* à $2n=46$ em *Lagocephalus laevigatus*, evidenciando a grande variabilidade cariotípica do grupo.

1.4.1. HETEROCROMATINA E REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLO

Técnicas citológicas ou moleculares podem gerar bandas específicas em cada região cromossômica. Isto facilita a discriminação entre cariótipos aparentemente similares e revelam mecanismos de rearranjos, sendo úteis na identificação de marcadores para espécies e/ou populações e no estabelecimento de homeologias (OZOUF-COSTAZ; FORESTI, 1992 apud AFFONSO, 2000). Com o desenvolvimento da aplicação de técnicas de bandamento C e detecção de regiões organizadoras de nucléolos (RONs), grande parte dos peixes cariotipados da costa brasileira já foram caracterizados com o uso destas metodologias.

A heterocromatina se manifesta por apresentar heteropichnose positiva ou negativa, que se explica por uma maior ou menor coloração relacionada à condensação da cromatina no cromossomo, porém esta não é uma característica diagnóstica. Geralmente, cada cromossomo eucariótico possui apenas uma pequena fração de heterocromatina, embora possam também ser inteiramente heterocromáticos ou inteiramente eucromáticos. O significado dessa fração heterocromática é um dos pontos críticos da citogenética atual, com várias propriedades sendo atribuídas, como facilitar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, manter a estrutura do núcleo celular, favorecer o pareamento na meiose e proteger regiões geneticamente ativas (HSU; SPIRITO; PARDUE, 1975; BIANCHI, 1977; BABU, 1998), porém nem todas são constantes ou exclusivas, o que faz da heterocromatina um material extremamente complexo e difícil de ser definido. A técnica da banda C em peixes, permite caracterizar regiões heterocromáticas, formadas por DNA altamente repetitivo, sendo que em alguns casos possibilita identificar cromossomos homólogos, polimorfismos na heterocromatina e cromossomos Bs ou sexuais.

Em eucariotos superiores, os genes RNAr são organizados como duas famílias multigênicas distintas. Uma família é composta pelo DNAr 45S que possui uma zona transcrita com uma região codificante altamente conservada para os genes de RNAr 5,8S, 18S e 28S, os quais se localizam nas regiões organizadoras de nucléolo (RONs). São separados por espaçadores transcritos internos e externos seguidos por seqüências espaçadoras não transcritas (NTS) que pode variar grandemente tanto em extensão quanto em seqüência (PENDÁS; MORÁN;

GARCIA-VÁZQUEZ, 1993 apud SWARÇA, 2003). A outra família de genes codifica o RNAr 5S e consiste em uma seqüência altamente conservada de 120 pares de base (pb) onde cada unidade transcricional é separada por espaçadores não transcritos (NTS). As RONS representam uma porção particularmente variável do genoma eucarioto. A caracterização do número e posição das RONS tem sido muito utilizada em peixes e pode constituir um excelente marcador citotaxonômico para alguns grupos (GALETTI et al., 1984; GALETTI, 1998 apud AFFONSO, 2000), porque podem variar de modo inter e intra-específico ou inter e intra-individual quanto ao número, localização, intensidade e tamanho (GOODPASTURE; BLOOM, 1975). Podem estar associadas às constrictões secundárias e são geralmente observadas ao menos em um cromossomo do conjunto haplóide de cada espécie. A presença de uma proteína ácida nas RONS ativas na intérfase anterior à mitose na qual a célula sofreu fixação parece ser responsável pela coloração com nitrato de prata e na sua conseqüente identificação (HSU et al., 1975). Estas diferenças são atribuídas tanto à atividade funcional quanto ao número de cístrons ribossomais. Fluorocromos GC específicos como a cromomicina A₃ (CMA₃) e a mitramicina (MM), formam complexos estáveis com DNA rico nestas bases (BEHR et al., 1969 apud AFFONSO, 2000). Um alto grau de guanina e citosina nas regiões codificadoras dos genes de DNAr (SCHIMD, 1980) ou em seqüências espaçadoras ou repetitivas adjacentes a eles (PENDÁS; MORÁN; GARCIA-VAZQUEZ, 1993 apud SWARÇA, 2003) parece ser responsável pela correlação da marcação destes compostos com as RONS. Este panorama tem sido encontrado extensivamente nas espécies de peixes submetidas a esse tratamento (AMEMIYA; GOLD, 1986; GALETTI; RASCH, 1993) e também em outros vertebrados como os anfíbios (SCHMID, 1980). Contudo marcações GC positivas adicionais aos sítios ribossomais detectados pela prata podem ser encontrados revelando sítios inativos de RONS ou meramente regiões heterocromáticas com altas concentrações de bases GC. Os fluorocromos são ainda informativos para confirmar se os heteromorfismos das RONS são estruturais e não apenas reflexo da atividade do gene (ROSSI et al. 1996 apud AFFONSO, 2000).

Embora mudanças ocorram na microestrutura dos cromossomos, como mutações de ponto e pequenas inversões e/ou deleções, vários grupos de peixes mantêm o padrão de distribuição de heterocromatina e regiões organizadoras de

nucléolo (RONS), que podem ser reveladas por técnicas moleculares tais como a utilização de fluorocromos, enzimas de restrição e hibridização *in situ*.

2. OBJETIVOS

- Este trabalho visa caracterizar citogeneticamente populações naturais de duas espécies de tetraodontídeos e uma de diodontídeo (Tetraodontiformes) provenientes do litoral do Paraná.
- Estudo do bandamento cromossômico para a caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo e da heterocromatina constitutiva pelas metodologias da Ag-RON, bandamento C e de coloração por fluorocromos base-específicos (CMA₃).
- Comparar os resultados obtidos com os já descritos na literatura;
- A partir dos resultados inferir sobre evolução cariotípica e as relações filogenéticas dos Tetraodontiformes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Foram estudados exemplares das espécies de *Sphoeroides greeleyi* (Fig. 3A), *Sphoeroides testudineus* (Fig. 3B) e *Cylichthys spinosus* (Fig. 4), coletados na Gamboa do Rio Baguaçu, baía de Paranaguá, município de Pontal do Paraná, litoral paranaense (Fig. 5).

A)



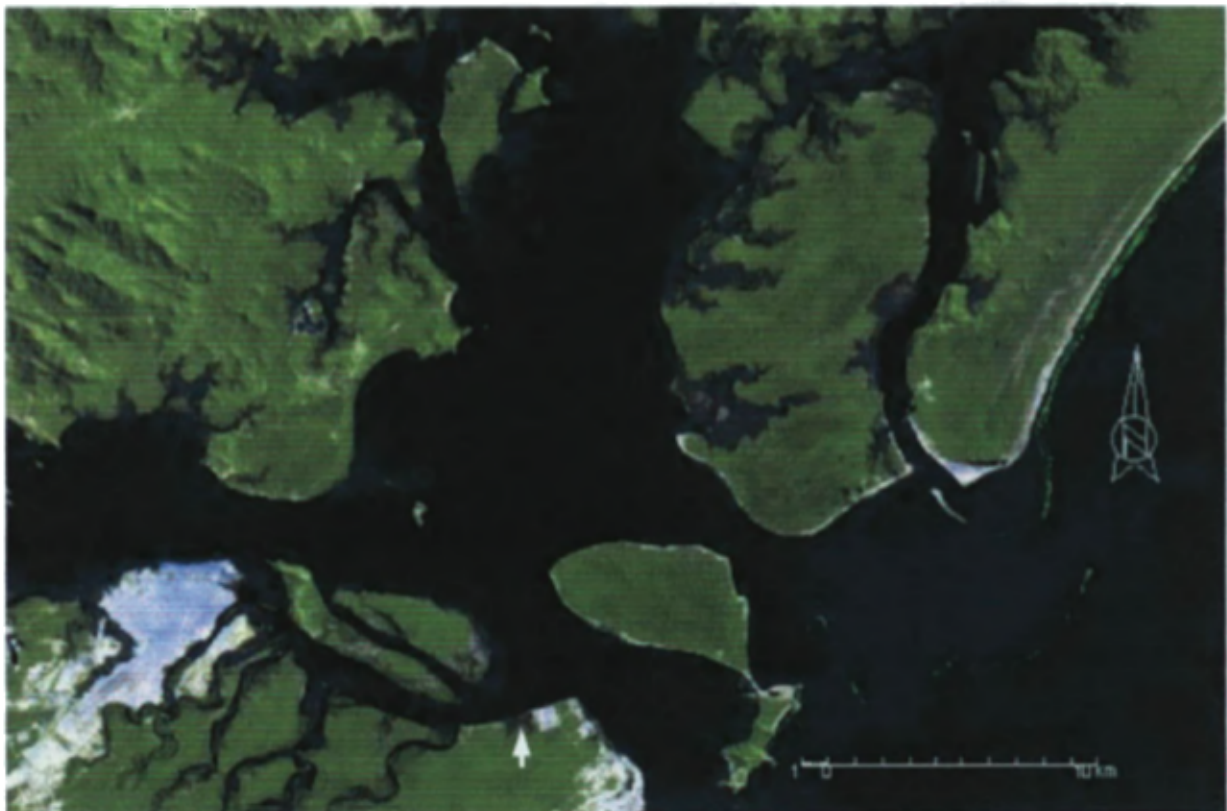
B)



FIGURA 3 – Exemplares de *S. greeleyi* (A) e *S. testudineus* (B). Tamanho aproximado de 13 cm.



FIGURA 4 – Exemplar adulto de *Cyclichthys spinosus*, medindo cerca de 12 cm.



FONTE: Centros de Estudos do Mar (CEM) da Universidade Federal do Paraná.

FIGURA 5 – Localização da Gamboa do Rio Baguaçu (seta branca) na Baía de Paranaguá.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Coletas

Os peixes foram coletados com rede de arrasto com malha de 1,2 cm entre nós, a qual foi estendida em forma de meia lua e em seguida arrastada por duas pessoas até a margem da praia (Fig. 6). Os peixes capturados foram mantidos em recipientes com água devidamente aerados para o transporte ao Laboratório de Citogenética Animal no Setor de Ciências Biológicas – UFPR (Curitiba-PR). No laboratório os animais foram sacrificados e imediatamente protocolados com número, sexo e procedência sendo então tombados em formol no acervo do laboratório. O sexo dos animais foi determinado e catalogado através da análise microscópica de suas gônadas.



FIGURA 6 – Metodologia empregada na coleta com a rede de arrasto (picaré).

3.2.2. Obtenção de metáfases mitóticas

Foi empregada a técnica de cultura de tecidos sólidos de curto tempo (FENOCCHIO et al., 1991) com algumas modificações, que consistiu nas etapas seguintes:

- Retirou-se a porção anterior do rim com aproximadamente 3 mm³ e transferiu-se para uma placa de Petri contendo 5 ml de meio de cultura RPMI (filtrado) com antibiótico e 20% de soro bovino fetal;
- O material foi desagregado com pinças de dissecação e com o auxílio de uma seringa de vidro desprovida de agulha, através de aspirações e expirações suaves sobre o fundo da cuba;
- Incubou-se a cultura celular em estufa à 27°C por 6 horas;
- Ao fim das 6 horas, acrescentou-se uma solução diluída de colchicina 0,025% deixando agir por 1 hora;
- O material foi então transferido para um tubo de ensaio e centrifugado por 10 minutos a 800-900 rpm;
- O material foi descartado e o tubo completado para 10 ml com solução hipotônica (KCl_{aq.} 0,075M). No tubo de centrifuga o material foi mantido à 27°C por 40 minutos;
- Em seguida foi feita a pré-fixação adicionando cerca de 10 gotas de fixador (3 metanol : 1 ácido acético glacial);
- O sobrenadante foi retirado e foram acrescentados 10 ml de fixador ressuspendendo suavemente com pipeta Pasteur.
- O passo anterior foi repetido três vezes, sendo que após a última centrifugação foi deixado 1,5 ml armazenado em microtubo do tipo Eppendorf em freezer à -20°C;
- As preparações cromossômicas foram realizadas pela técnica "air drying" e coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato por 10 minutos.

3.2.3. Coloração Convencional – Giemsa

A coloração tradicional (Giemsa 5% em tampão fosfato, pH 6,8 por 10 minutos), permite a análise do número, morfologia e fórmula cromossômica. Na

preparação, foram pingadas duas gotas do material previamente ressuspendido, em uma lâmina sobre vapor de água a 60°C. Foram montadas para cada protocolo de coloração e bandamentos pelo menos 10 lâminas.

3.2.4. Bandamento C

A técnica utilizada para a identificação de bandas C foi a de SUMNER (1972) com algumas modificações:

- Depois de montadas, as lâminas foram “envelhecidas” em estufa de 45°C por 1 dia.
- As preparações cromossômicas foram mergulhadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2M por 15 minutos a temperatura ambiente, em seguidas lavadas com água destilada;
- Em seguida foram mergulhadas por 50 segundos numa solução de Hidróxido de Bário (Ba(OH)_2) 5% a 60°C;
- A lâmina foi então rapidamente lavada em HCl 1N a 60°C e depois em água destilada;
- A lâmina foi então colocada em solução salina de 2XSSC a 60°C em banho termostático por 1 hora;
- Por fim foi lavada com água destilada e corada com Giemsa a 10% por 20 minutos;

3.2.5. Coloração Ag-RON

Esta técnica foi usada para evidenciar as Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) por impregnação argêntica, conforme HOWELL e BLACK (1980):

- Foram pingadas de 2 a 3 gotas da solução celular, estocadas nos eppendorfes, sobre uma lâmina limpa e em seguida colocada por no mínimo 1 dia em estufa a 45°C (“envelhecimento”).
- Após o “envelhecimento” as lâminas foram mergulhadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2M por 3 minutos e posteriormente lavadas;
- Em seguida foram colocadas sobre o filme celular 2 gotas de Nitrato de Prata (AgNO_3) a 50% e 1 gota de gelatina;

- As gotas foram misturadas suavemente e cobertas em seguida com uma lamínula;
- A lâmina foi colocada dentro de uma câmara úmida e incubada em estufa a 60°C até que a preparação adquiriu uma coloração marrom-dourado;
- Em seguida a lâmina foi lavada com água corrente e deixada secar ao ar;
- Quando necessário, a lâmina foi colocada por 30 segundos com Giemsa 2% em tampão fosfato pH 6,8 para retirar o excesso de brilho do AgNO_3 .

3.2.6. Fluorocromo Cromomicina A_3

A técnica utilizada foi a descrita por SCHMID (1980) com modificações:

Para a obtenção da solução de cromomicina A_3 , foi dissolvido 5,0 mg de CMA_3 em 5 ml de tampão McIlvaine (pH 7,0) e adicionado 0,1 ml de Cloreto de Magnésio (50 mM) + 4,9 ml de água destilada. A Cromomicina foi deixada para dissolver lentamente na geladeira e no escuro por alguns dias, antes de usar.

As etapas foram as seguintes:

- Foram pingadas lâminas e deixadas "envelhecer" por um dia na estufa a 45°C;
- Foi colocado 50 μl da solução de cromomicina A_3 sobre a lâmina, que foi coberta com uma lamínula. O conjunto foi deixado corar por 90 minutos no escuro;
- Escorrer a lamínula e lavar a lâmina, em água corrente, em jatos fortes, por aproximadamente 1 minuto;
- Deixar a lâmina secar ao ar e montá-la com uma nova lamínula, utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso;
- Deixar a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias antes de analisá-la (para aumentar a estabilidade do fluorocromo) em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro 450-490 nm (zona de excitação do azul).

3.2.7. Montagem e Análise dos Cariótipos

As metáfases selecionadas foram fotografadas em microscópio Carl Zeiss, com objetiva 100X de imersão com filtro verde. O filme utilizado foi Imagelink HQ, e para revelação se utilizou Dektol (Kodak) por aproximadamente 2 minutos à 20°C e em seguida fixação (Kodak) por 10 minutos. O filme foi então lavado em água corrente por 60 minutos e deixado secar ao ar. As cópias das fotos foram feitas em papel Kodabromide F3 esmaltado e reveladas em Dektol diluído em água (1:2). As melhores fotos tiveram os cromossomos recortados e montados aos pares em ordem decrescente de tamanho e morfologia. Também se utilizou um sistema de captura de imagens, com microscópio Carl Zeiss Axiophot acoplado a este o sistema Applied Spectral Imagem. As análises cromossômicas foram realizadas no computador através do software Case Data Manager Expo 2.0, e as medições cromossômicas foram feitas com o software Corel Draw 9 para a determinação da relação entre os braços (RB).

Para o cálculo do NF os cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM) e subtelocêntricos (ST) foram considerados como bibraquiais, enquanto que os cromossomos acrocêntricos (A) constituídos por um único braço.

A classificação dos cromossomos quanto à relação entre os braços foi seguida conforme LEVAN, FREDGA e SANDBERG (1964), determinando os tipos a seguir:

Metacêntrico (M)	RB = 1,00 a 1,70
Submetacêntrico (SM)	RB = 1,71 a 3,00
Subtelocêntrico (ST)	RB = 3,01 a 7,00
Acrocêntrico (A)	RB > 7,01

4. RESULTADOS

4.1. FAMÍLIA TETRAODONTIDAE

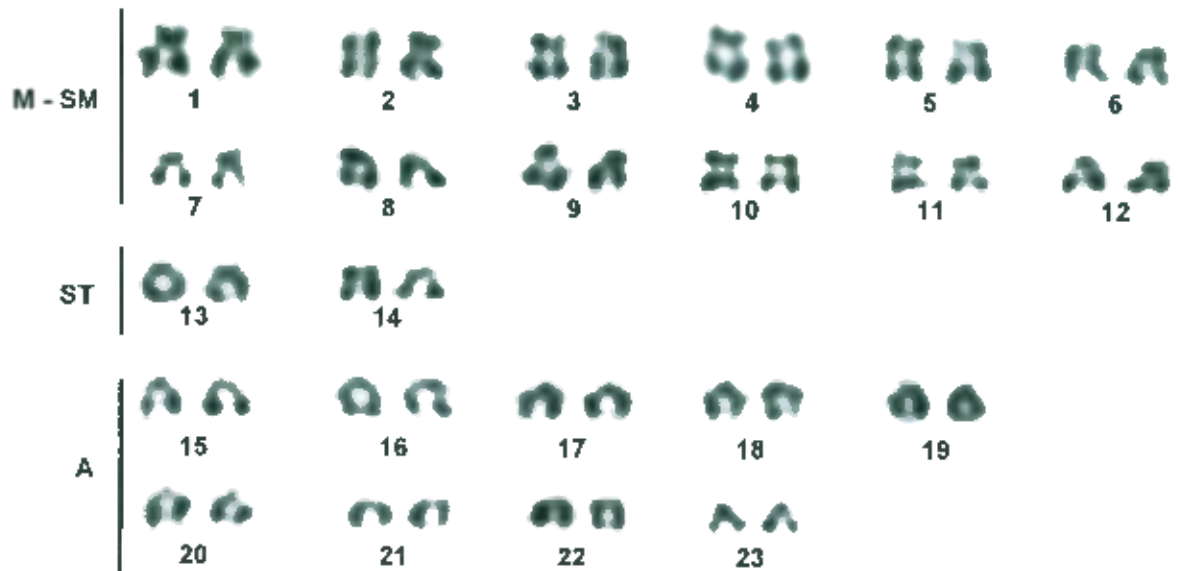
Foram analisados 11 exemplares da espécie *Sphoeroides greeleyi* (10 fêmeas e 1 macho) e 15 de *Sphoeroides testudineus* (2 fêmeas e 13 machos). Com o objetivo de obter resultados satisfatórios para os estudos citogenéticos, foram testados diversos tempos para o meio de cultura, para o inibidor mitótico e para a solução hipotônica. Os melhores resultados foram obtidos em culturas de 8 horas com uma hora de repouso em Colchicina, seguida de solução hipotônica por 40 minutos. Notou-se que quanto maior o tempo de ação da Colchicina maior foi o número de metáfases encontrado, porém o grau de condensação aumenta e a morfologia dos cromossomos se torna mais difícil de ser determinada. Nem todos os espécimes mostraram resultados satisfatórios, devido à contaminação de alguns meios de cultura, aos tempos inadequados nos reagentes ou a outros fatores desconhecidos. Não foram encontradas diferenças cromossômicas entre exemplares machos e fêmeas nas duas espécies em questão.

4.1.1. *Sphoeroides greeleyi*

Dos 11 exemplares coletados, somente quatro apresentaram resultados suficientes para as análises cromossômicas. O cariótipo mostra um número diplóide modal de 46 cromossomos distribuídos em 24 cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (M-SM), 4 cromossomos subtelocêntricos (ST) e 18 acrocêntricos (A) perfazendo um número fundamental (NF) de 74 (Fig. 7A).

Com relação à microestrutura cromossômica observada, as bandas C positivas foram visualizadas nas regiões centroméricas, em sua maioria e teloméricas em alguns pares (Fig. 8). A coloração com nitrato de prata revelou um padrão de RONS simples na posição telomérica em um par de cromossomos acrocêntricos (Fig. 9), o mesmo acontecendo com a aplicação de fluorocromo Cromomicina A₃ GC-específico (Fig. 10).

A)



B)

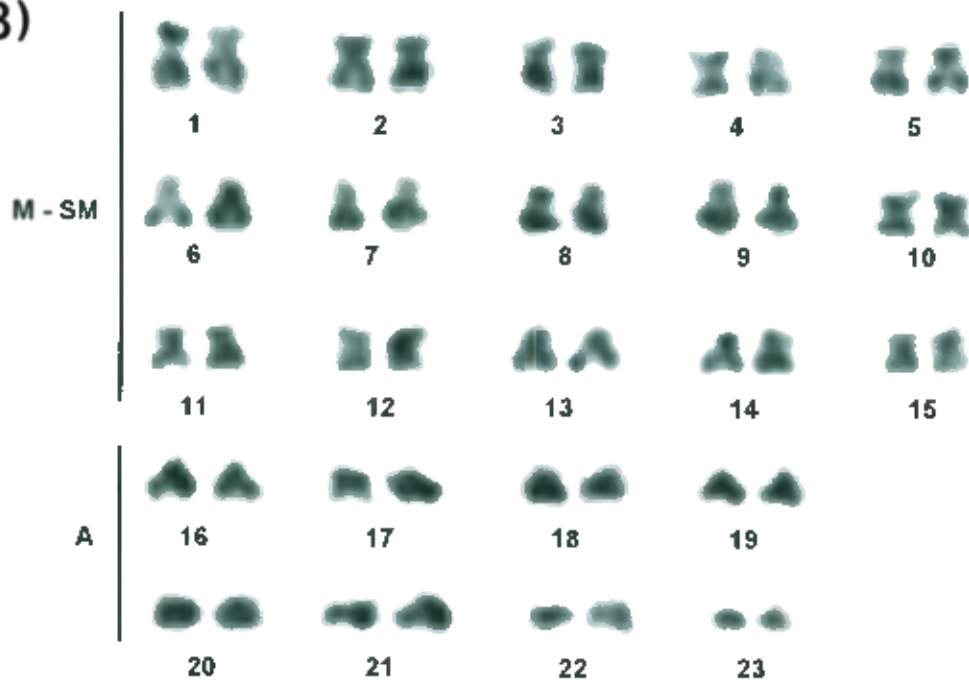


FIGURA 7 – Cariótipos de *Sphaeroides greeleyi* (A) e *Sphaeroides testudineus* (B), $2n=46$ com (NF=74) e (NF=76) respectivamente.

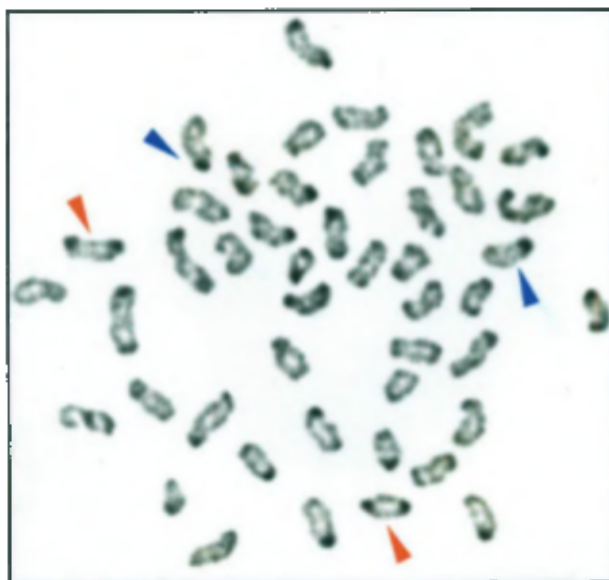


FIGURA 8 – Padrão de bandas C em *S. greeleyi*. Cromossomos com heterocromatina C⁺ localizada nos telômeros (setas vermelhas) e nos centrômeros (setas azuis).

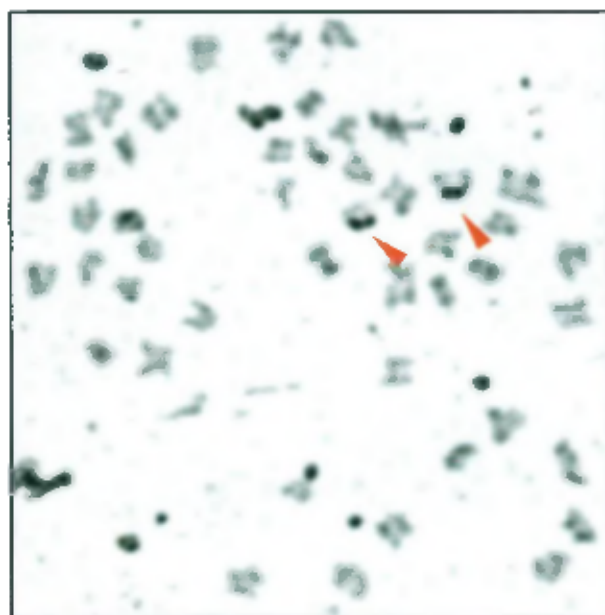


FIGURA 9 – Coloração com nitrato de prata em *Sphaeroides greeleyi* indicando as Regiões Organizadoras de Nucléolo (setas).

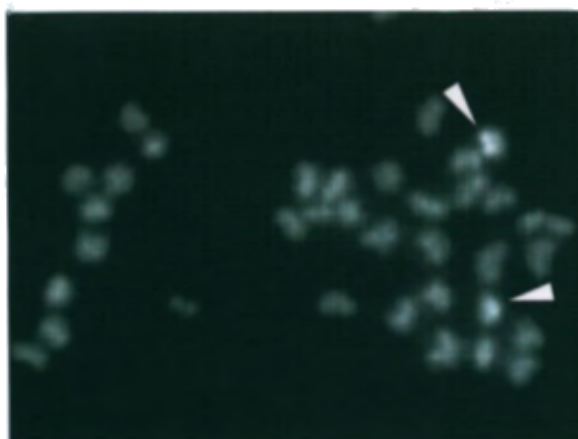


FIGURA 10 – Coloração com CMA₃. As setas indicam os cromossomos portadores de regiões ricas em G-C.

4.1.2. *Sphoeroides testudineus*

Foram analisados 15 exemplares de *Sphoeroides testudineus*, e em apenas cinco foram encontradas metáfases que serviram para se obter o número diplóide e aplicar as técnicas de bandamento C e RON. O número diplóide modal foi de 46 cromossomos e a fórmula cariotípica composta por 30 Meta-Submetacêntricos (S-SM) e 16 acrocêntricos (A), totalizando um número fundamental (NF) de 76 (Fig. 7B). Quanto aos bandamentos cromossômicos, a banda C apresentou marcações heterocromáticas em posições centroméricas na maioria dos cromossomos e em alguns cromossomos com dois braços, os curtos parecem ser totalmente heterocromáticos (Fig. 11). As Ag-RONs se mostraram positivas na posição telomérica do braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos (Fig. 12).

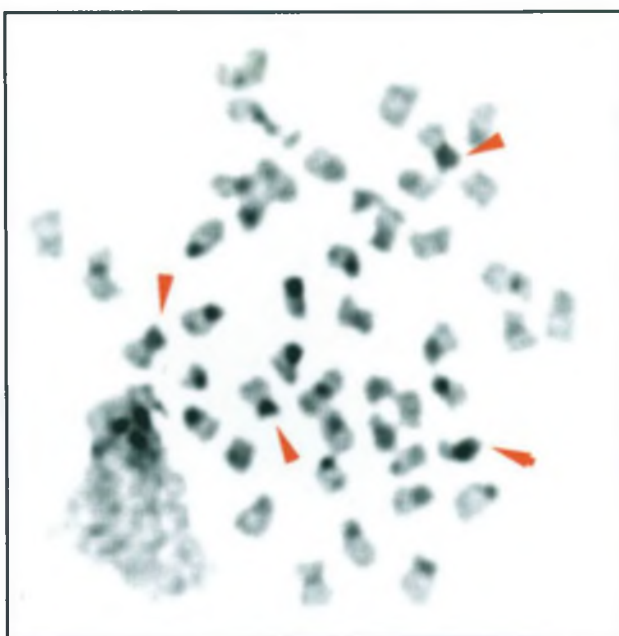


FIGURA 11 – Bandas C em *Spherooides testudineus*. As setas indicam em alguns cromossomos regiões heterocromáticas ocupando todo um braço.

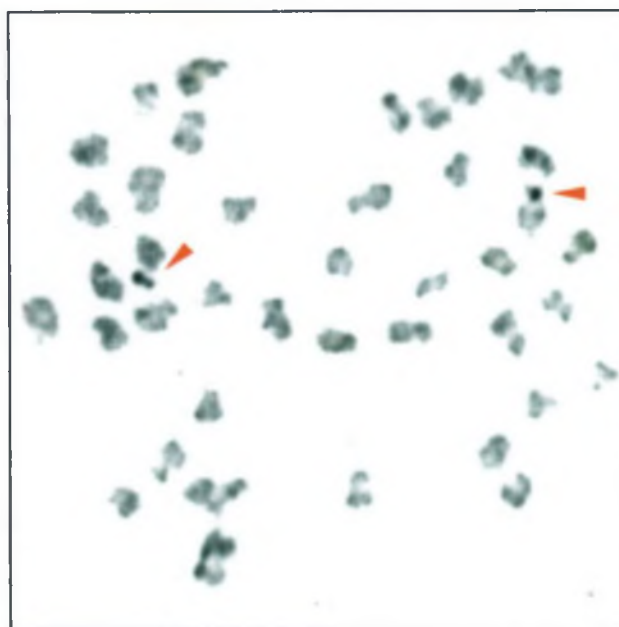


FIGURA 12 – Metáfase de *Spherooides testudineus* corada com prata. As setas indicam o par portador das RONS.

4.2. FAMÍLIA DIODONTIDAE

Foram coletados 4 exemplares da espécie *Cyclichthys spinosus* (1 fêmea, 2 machos e 1 de sexo não identificado). Todos promoveram resultados bastante satisfatórios com os mesmos tempos, na solução hipotônica e colchicina, utilizados para as espécies da família Tetraodontidae.

O número diplóide encontrado foi de 50 cromossomos, sendo o cariótipo constituído por 4 metacêntricos (M), 18 submetacêntricos (SM), 12 subtelocêntricos (ST) e 16 acrocêntricos (A) e um número fundamental (NF) igual a 84 (Fig. 13). Da mesma forma que para as espécies anteriores, não foi verificado sistema de cromossomos sexuais.

Após a impregnação por nitrato de prata, foram observadas marcações positivas em posição terminal no braço curto do terceiro par de cromossomos submetacêntricos (par 5) (Figs. 13, 14 e 17). Frequentemente estes cromossomos estão associados pela região de heterocromatina associada as RONS (Fig. 14). A análise por fluorocromo GC específico em *C. spinosus* revelou sítios CMA_3^+ coincidentes em localização com as Ag-RONS (Fig. 15). Nenhuma região heterocromática além daquela associada às RONS mostrou-se rica em bases GC. Quando submetida ao bandamento C, segmentos heterocromáticos centroméricos, associados às RONS e ocupando todo um braço de um par de cromossomos submetacêntricos foram revelados para esta espécie (Fig. 16).

A figura 17 ilustra de os resultados já apresentados anteriormente no que se refere aos cromossomos portadores das RONS após as diferentes técnicas de coloração e bandamentos empregadas.

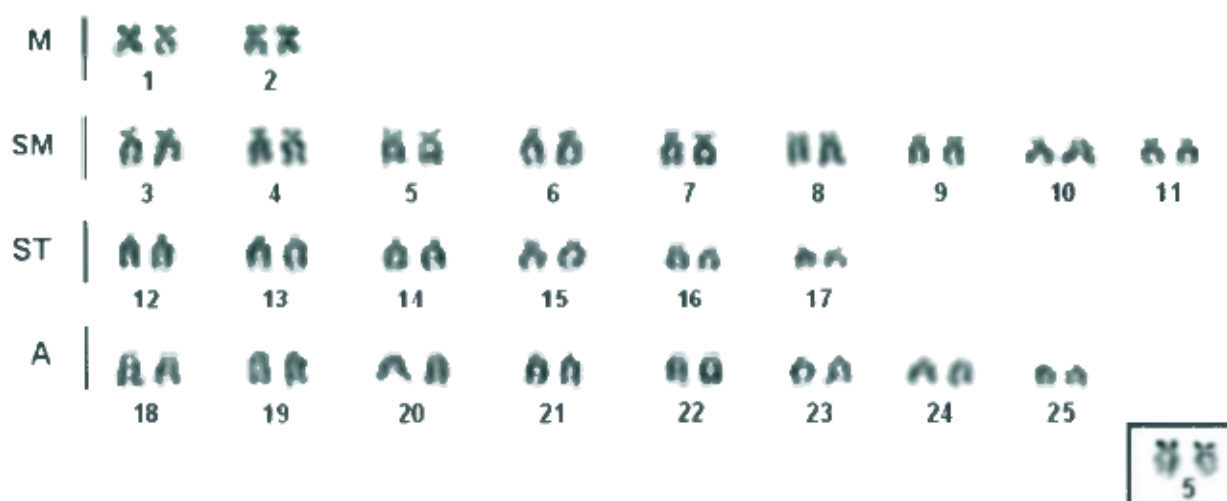


FIGURA 13 – Cariótipo de *C. spinosus* com $2n=50$ cromossomos e $NF=84$. Em destaque o par portador das regiões organizadoras de nucléolo após impregnação por nitrato de prata.

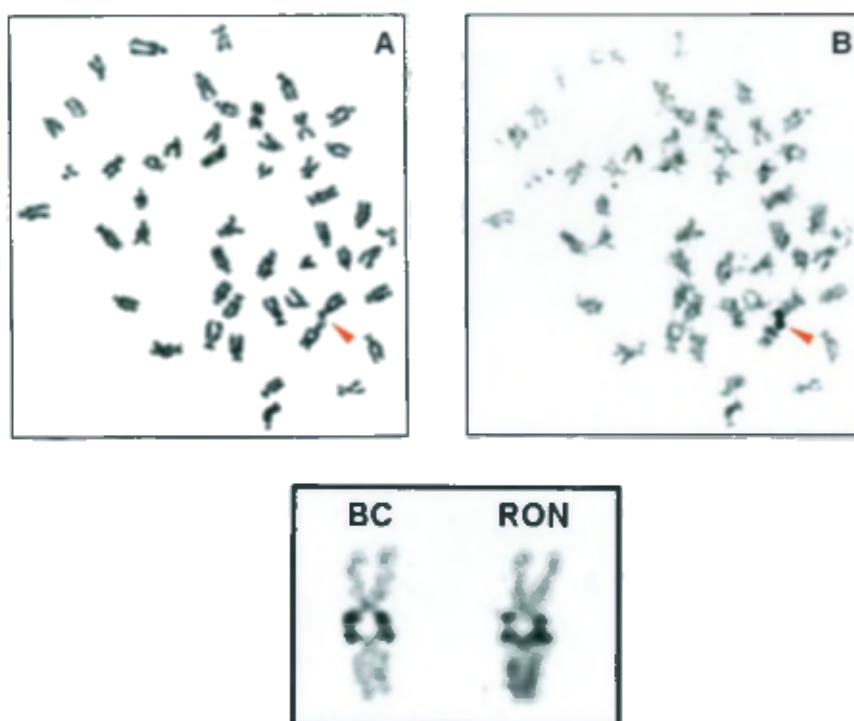


FIGURA 14 – Metáfases coradas com Giemsa (A) e seqüencialmente com $AgNO_3$ (B). Associação entre os cromossomos portadores das RONS constada também pelo bandamento C.

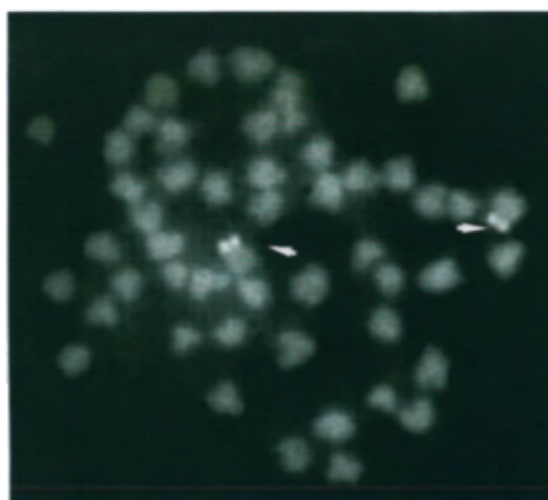


FIGURA 15 – Coloração com CMA₃ destacando os cromossomos com regiões ricas em bases G-C.

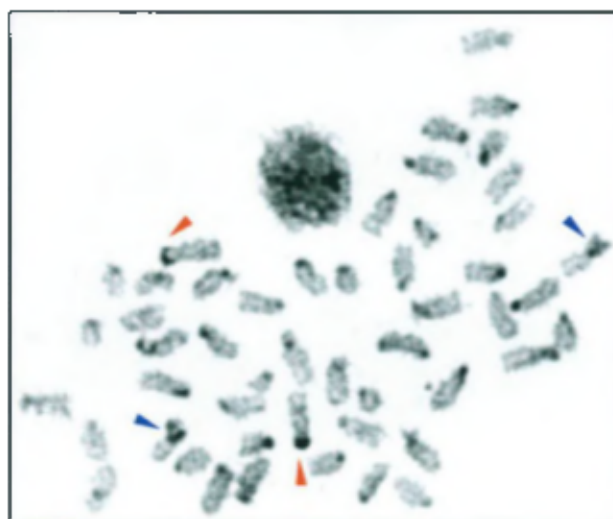


FIGURA 16 – Bandas C. Segmentos heterocromáticos ocupando todo um braço (setas azuis) e associados às RONS (setas vermelhas).

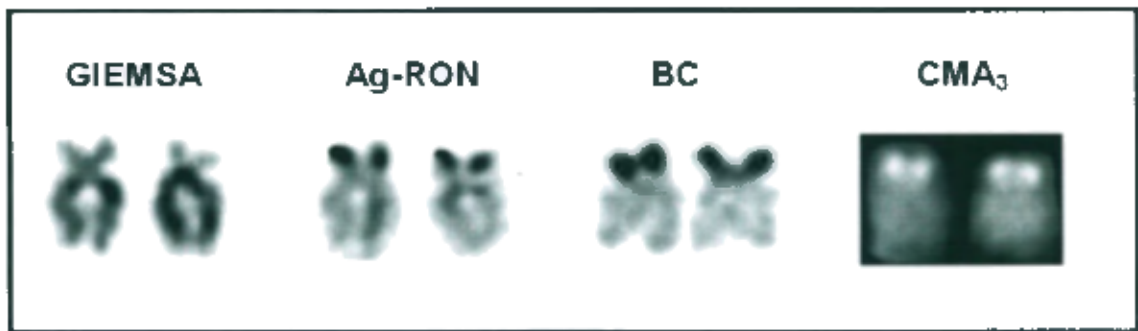


FIGURA 17 – Cromossomos portadores das RONS na espécie *C. spinosus* após as respectivas técnicas de coloração e bandamento utilizadas.

5. DISCUSSÃO

5.1. FAMÍLIA TETRAODONTIDAE

Quanto ao gênero *Sphoeroides*, das espécies que ocorrem no Brasil até o momento foram cariotipadas, *S. tyleri* (BRUM, 2000), *S. spengleri* e *S. greeleyi* (BRUM; OLIVEIRA; GALETTI, 1995), todas da costa do Rio de Janeiro. As três espécies mostraram $2n=46$ cromossomos, porém diferentes valores de NF. Os resultados obtidos por BRUM, OLIVEIRA e GALETTI (1995) para *Sphoeroides greeleyi* mostraram o mesmo número diplóide, e um número fundamental de 70, enquanto que no presente trabalho, o valor do NF é de 74 (Fig. 5A). Esta diferença é explicada pelo fato de que no trabalho supra citado, os cromossomos subtelocêntricos foram considerados como detentores de um braço cromossômico, enquanto que no presente estudo optamos por considerar estes cromossomos como portadores de dois braços, norma esta estabelecida no I Simpósio de Citogenética Evolutiva e Aplicada de Peixes Neotropicais em 1986. Apesar disso, devido ao reduzido tamanho, ao grau de condensação do cromossomo e da qualidade das metáfases nem sempre é possível fazer uma perfeita distinção entre cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos (AFFONSO et al., 2002).

A outra espécie estudada, *Sphoeroides testudineus*, da mesma forma que outros tetraodontídeos, mostra um cariótipo com $2n = 46$ cromossomos perfazendo um número fundamental de 76 (Fig. 5B). Os resultados corroboram com os de FRANCIOSI (2000), que estudaram esta espécie também da costa paranaense, entretanto o valor determinado para o NF foi 78. Esta divergência mostra novamente a dificuldade em estabelecer os tipos cromossômicos nestes peixes, o que faz persistir a dúvida sobre o verdadeiro valor do NF nos cariótipos descritos para o gênero (BRUM; OLIVEIRA; GALETTI, 1995; FISCHER et al., 2000).

As espécies da família Triacanthidae apresentam um cariótipo ($2n=48$, $NF=48$) (CHOUDHURY; PRASAD; DAS, 1982), indicando desta forma que este é o cariótipo basal também para os Tetraodontiformes. Contudo para a família Tetraodontidae, os números diplóides variando de 28 a 46 cromossomos (Tab. I), representam derivações do cariótipo de Triacanthidae (BRUM; OLIVEIRA; GALETTI, 1995). Pode-se então tentar traçar duas linhas evolucionárias para a ordem: (1) a linha Triacanthidae, mais primitiva com $2n=48$; e (2) a linha mais derivada formada

por Balistidae, Diodontidae, Tetraodontidae entre outras, nas quais $2n=46$ pode ser considerada uma condição plesiomórfica (ARAI; NAGAIWA, 1976 apud BRUM; OLIVEIRA; GALETTI, 1995).

A microestrutura cromossômica observada nas duas espécies, concorda com os padrões de bandas C e RONS para peixes marinhos. Entre os peixes, há uma tendência à presença de blocos heterocromáticos centroméricos e teloméricos (GOLD; AMEMIYA; ELLISON, 1986; FORESTI; ALMEIDA-TOLEDO; TOLEDO FILHO, 1989 apud CORTINHAS; CESTARI; FENOCCHIO, 2002). *Sphoeroides greeleyi* no presente trabalho, além das bandas heterocromáticas centroméricas, possui mais de 2 pares de cromossomos com regiões C^+ na posição telomérica (Fig. 6), discordando com o resultado obtido por BRUM e MOTA (2002) para esta espécie do litoral do Rio de Janeiro. Esta diferença pode ser devido à inversões pericêntricas, um rearranjo comum em euteleósteos marinhos (GALETTI et al., 2000; CANO et al., 1982 apud BRUM et al., 2001). As Ag-RONs estão na posição terminal de um par de cromossomos acrocêntricos (Fig. 7), confirmando os resultados já obtidos para esta espécie por BRUM e MOTA (2002). Este padrão de RONS simples, em que apenas 2 cromossomos apresentam marcações é considerado comum não só para os teleósteos, mas para a grande maioria dos vertebrados (SCHMID, 1980 ; AMEMIYA e GOLD, 1986). Fluorocromos específicos como a mitramicina e a cromomicina A_3 , são normalmente utilizados em peixes para detectar algumas regiões heterocromáticas ricas em GC, como também para evidenciar as RONS, pois estas regiões estão associadas a famílias de DNA ricas em GC na maioria das espécies de peixes (PENDÁS; MORÁN; GARCIA-VÁZQUEZ, 1993 apud SWARÇA, 2003). O tratamento com CMA_3 mostrou correspondência entre os sítios Ag-RONs e os sítios CMA_3 positivos. Até o momento não se tem descrito, para o gênero *Sphoeroides*, resultados utilizando fluorocromos base específicos.

TABELA I – Dados cariotípicos de representantes da família Tetraodontidae

Família	Espécie	2n	NF	Referência
	<i>Arothron hispidus</i>	42	78	Natarajan e Subrahmanjan 1974
	<i>A. immaculatus</i>	42	72	Arai e Nagaiwa 1976
	<i>A. immaculatus</i>	42	68	Choudhury et al. 1982
	<i>A. leopardus</i>	40	68	Choudhury et al. 1982
	<i>A. nigropunctatus</i>	38	72	Arai e Nagaiwa 1976
	<i>A. reticularis</i>	42	68	Choudhury et al. 1982
	<i>Canthigaster coronata</i>	28	36	Arai 1983
	<i>C. rivulata</i>	34	44	Arai e Nagaiwa 1976
	<i>Chelonodon patoca</i>	40	70	Arai e Nagaiwa 1976
	<i>Fugu rubripes</i>	44	64	FishBase
Tetraodontidae	<i>Fugu chrysops</i>	44	64	Arai e Nagaiwa 1976
	<i>F. niphobles</i>	44	64	Arai e Katsuyama 1973
	<i>F. pardalis</i>	44	-	Arai 1983
	<i>F. poecilonotus</i>	44	-	Arai 1983
	<i>Lagocephalus lunaris</i>	44	68	Choudhury et al. 1982
	<i>Monotreta palambangensis</i>	42	-	Hinegardner e Rosen 1972
	<i>Sphoeroides greeleyi</i>	46	70	Brum et al. 1995
	<i>S. testudineus</i>	46	78	Franciosi 2000
	<i>S. spengleri</i>	46	64	Brum et al. 1995
	<i>Tetraodon cutcutia</i>	42	72	Khuda-Bukhsh e Barat 1987
	<i>T. fluviatilis</i>	42	50	Mandrioli et al. 2000
	<i>T. nigrovindis</i>	42	84	Fischer et al. 2000
	<i>T. palembangensis</i>	42	-	FishBase

2n=número diplóide; NF=número fundamental de braços cromossômicos

O presente estudo exhibe informações inéditas quanto à distribuição da heterocromatina e das regiões organizadoras de nucléolos em *Spherooides testudineus*. O bandamento C evidenciando principalmente regiões centroméricas e em alguns cromossomos todo um braço menor (Fig. 8), mostrando um padrão divergente dos já observados para o gênero *Spherooides*. Apesar disso os resultados são similares aos obtidos para *Tetraodon nigriviridis* (FISCHER et al., 2000), que utilizou DAPI, um fluorocromo base-específico que revela heterocromatina essencialmente rica em AT. Blocos heterocromáticos ocupando todo um braço de mais de um cromossomo bbraquial, sugere que possivelmente este cromossomo pode ter evoluído de um acrocêntrico por progressiva acumulação de seqüências repetitivas (FISCHER et al., 2000) e posterior inversão pericêntrica. Assim sendo, seria interessante ampliar os estudos com relação ao padrão de distribuição da heterocromatina em *S. testudineus*, utilizando DA/DAPI para comprovar se os braços heterocromáticos destes cromossomos também são ricos em pares de base AT, como são em *Tetraodon nigriviridis*. Não é a primeira vez que ocorrem comparações entre os gêneros *Spherooides* e *Tetraodon* pertencentes à família Tetraodontidae. BRUM e MOTA (2002) também discutiram a similaridade da distribuição da heterocromatina entre *S. greeleyi* e *T. fluviatilis* (MANDRIOLI et al., 2000 apud BRUM; MOTA, 2002), o que vêm constatar a proximidade filogenética entre estes dois gêneros. Um padrão de RONS simples também foi constatado em *S. testudineus*, contudo está em posição telomérica de um par de cromossomos SM (Fig. 9). O tratamento com o fluorocromo Cromomicina A₃ não proporcionou resultados satisfatórios nesta espécie.

5.2. FAMÍLIA DIODONTIDAE

Dados cariotípicos desta família correspondem a uma ínfima parcela dos já realizados para a ordem Tetraodontiformes. Da costa do Japão, foi descrito para *Diodon bleekeri*, um cariótipo com $2n=46$ cromossomos (ARAI E NAGAIWA, 1976 apud BRUM, 2000) e da costa brasileira até o momento, apenas uma espécie foi cariotipada, *Chilomycterus spinosus* (BRUM, 2000) apresentando $2n=52$ cromossomos.

No presente trabalho é descrito para *Cyclichthys spinosus*, o número diplóide de 50 cromossomos e $NF=88$ (Fig. 11). O valor do $2n>46$ cromossomos pode ser uma evidência de fissões cêntricas, sugerido por ARAI E NAGAIWA, 1976 apud BRUM, 2000. O valor do $2n=50$ e a presença de vários cromossomos com dois braços encontrado em *Cyclichthys spinosus*, pode ter sido resultado de fissões cêntricas e inversões pericêntricas, respectivamente. Logo, o alto valor do número diplóide pode corresponder a uma característica derivada entre os Tetraodontiformes, uma vez que apresentam como cariótipo basal $2n=48$ cromossomos.

A presença de sítios ribossomais em um único par de cromossomos está normalmente associada aos padrões de distribuição de RONS em peixes (SCHMID, 1980). Seguindo um padrão de outros teleósteos modernos, as regiões organizadoras de nucléolo de *C. spinosus* estão situadas em posição terminal no braço curto de um par de cromossomos com dois braços (par 5) (Figs. 11 e 12). Como demonstrado, foi comum nas metáfases somáticas a associação entre os cromossomos portadores das RONS (Fig. 12). Associação de RONS vem sendo descrita em várias espécies de vertebrados, ocorrendo em cromossomos homólogos ou não homólogos, sendo menos freqüente a presença de mais de dois cromossomos (DENTON; HOWELL; BARRET, 1976). A associação pode facilitar a troca de segmentos gerando um heteromorfismo de tamanho dessas regiões entre os cromossomos do par, entretanto isto não foi observado para esta espécie. Também foi verificado que o par cromossômico portador da RON (par 5) além de apresentar bandas C positivas (Figs. 12, 14 e 15), é fluorescente após a utilização do fluorocromo CMA_3 (Fig. 13 e 15), demonstrando que a heterocromatina intercalar presente nesta região também é rica em pares de base GC. A CMA_3 em peixes tem

revelado uma afinidade com RONS, uma vez que a associação de heterocromatina rica em bases GC e genes ribossomais é considerada comum em teleósteos (AMEMIYA e GOLD, 1986). A presença de heterocromatina congruente às RONS parece contribuir para as altas taxas de rearranjos cromossômicos, uma vez que servem de embasamento à probabilidade da ocorrência de inversões pericêntricas envolvendo estas regiões. Sabe-se que a heterocromatina formada geralmente por DNA repetitivo, pode ser mais propensa a modificações, desempenhando um papel basicamente estrutural na evolução cariotípica (WICHMAN et al., 1991 apud AFFONSO, 2000).

A detecção da heterocromatina visualizada pelo bandamento C na espécie *C. spinosus* revelou um padrão comum e conservado entre os vertebrados pela presença de segmentos centroméricos e associados às RONS (VERMA, 1988; IMAI, 1991 apud AFFONSO, 2000). Contudo, além dessas marcações 1 par de cromossomos com dois braços apresentaram grandes blocos heterocromáticos ocupando todo o braço menor (Fig. 16). Esta peculiaridade, que foi também encontrada para a espécie *Sphoeroides testudineus* (família Tetraodontidae) no presente estudo, sugere que segmentos heterocromáticos foram adicionados a cromossomos antes acrocêntricos e que após terem sofrido inversões, originaram o cromossomo com a conformação atual. A maior relevância da adição de heterocromatina estaria em proporcionar uma reorganização cariotípica e diversidade cromossômica. É proposto ainda que o desenvolvimento de blocos heterocromáticos no braço curto de vários cromossomos seja um mecanismo importante de estabilização de cromossomos recém formados por fissões cêntricas (IMAI, 1993 apud AFFONSO, 2000).

Até o momento não se tinha ainda qualquer dado cariotípico para esta espécie de baiacu, sendo portanto de fundamental importância as informações contidas no presente estudo para uma melhor descrição do cariótipo e compreensão da evolução cromossômica para este grupo de peixes.

No litoral do Paraná, poucas espécies já foram estudadas sob o ponto de vista citogenético (RAMALHO; FENOCCHIO; CESTARI, 2001; CORTINHAS; CESTARI; FENOCCHIO, 2002; FRANCIOSI e CESTARI, 2000; CIPRIANO, 2002), representando muito pouco do espantoso potencial desta região para realizar estudos desta natureza. Portanto podemos colocar como proposta futura seqüencial

a este trabalho a aplicação de técnicas como coloração com outros fluorocromos base-específicos, enzimas de restrição e hibridação *in situ*.

6. CONCLUSÕES

Família Tetraodontidae

- O número diplóide encontrado para *S. greeleyi* e *S. testudineus* é o mesmo reportado por autores que já os estudaram, contudo há divergências quanto aos valores do número fundamental (NF).
- O padrão de Bandas C pode ser utilizado como um marcador, já que se mostra bastante distinto entre as duas espécies, da mesma forma que a localização das Regiões Organizadoras de Nucléolos

Família Diodontidae

- O valor do número diplóide, a morfologia e o tamanho dos cromossomos corroboram com o fato do genoma desta família ser duas vezes maior se comparado com o dos tetraodontídeos.
- A heterocromatina apresentou um padrão característico que sugere ter se originado por adição de heterocromatina e posterior inversão pericêntrica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMEMIYA, C.T.; GOLD, R. Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Copeia*, v.1, p.226-231, 1986.

AFFONSO, P. R. A. M. **Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes)**. São Carlos – SP, 2000. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

AGUILAR, C. T.; GALETTI Jr, P. M. Chromosomal studies in South Atlantic serranids (Pisces, Perciformes). *Cytobios*, 89: 105-114. 1997.

BABU, A. Heterogeneity of heterochromatin in human chromosomes as demonstrated by restriction endonuclease treatment. In: VERMA, R. S. **Heterochromatin: molecular and structural aspects**. New York: Cambridge University Press, 1998. p. 205-275.

BIANCHI, N.O. Algunas consideraciones sobre cromosomas y evolución. *Mendeliana*, 2 (2): 57-71, 1977.

BRAINERD, E. L.; SLUTZ, S. S.; HALL, E. K.; PHILLIS, R. W. Patterns of Genome Size Evolution in Tetraodontiform Fishes. *Evolution*, 55(11): 2363–2368, 2001.

BRUM, M. J. I. Correlações entre a filogenia e a citogenética de peixes teleósteos. *Soc. Brasileira de Genética – Série Monografias*, 2: 5-42, 1995.

BRUM, M. J. I.; OLIVEIRA, C. C.; GALETTI, P. M. Cytogenetic Studies of Two Puffer Species (*Sphoeroides*, Tetraodontidae) from Rio de Janeiro Coast, Brazil. *Cytologia*, 60: 369-374, 1995.

- BRUM, M. J. I. Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. *Braz. J. Genet.*, 19(3): 421-427, 1996.
- BRUM, M. J. I.; GALETTI Jr., P. M. Teleostei Ground Plan Karyotype. *J. Comp. Biol.* 2(2): 91, 102. 1997.
- BRUM, M. J. I. Cytogenetic studies in tetraodontiforms *Sphoeroides tyleri* (Tetraodontidae) and *Chilomycterus spinosus* (Diodontidae) from Rio de Janeiro Coast, Brazil. *Chromosome Science*, 4: 103-105, 2000.
- BRUM, M. J. I.; AFFONSO, P. R. A. M.; MOTA, L. C. G.; PAULS, E.; NETTO, M. R. C. B. Cytogenetic characterization of *Porichthys porosissimus* (Velenciennes, 1857) (Batrachoidiformes) from the Rio de Janeiro Coast, Brazil. *Chromosome Science*, 5: 15-18, 2001.
- BRUM, M. J. I.; MOTA, L. C. G. C-Banding and Nucleolar Organizer Regions of *Sphoeroides greeleyi* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). *Caryologia*, v.55, no. 2: 171-174, 2002.
- CHOUHDURY, R. C.; PRASAD, R.; DAS, C. C. Karyological studies in five Tetraodontiform fishes from the Indian Ocean. *Copeia*, 3: 728-732, 1982.
- CIPRIANO, R. R. **Estudo Cariotípico em Beloniformes do gênero *Strongylura* (Peixe Agulha) com ocorrência no Litoral Paranaense.** Curitiba, 2002. 41 f. Monografia (Especialização em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- CORRÊA, M. M. O.; GALETTI Jr, P. M. Chromosomal Diversity in Scorpaenidae (Teleostei, Scorpaeniformes): Cytogenetic Studies in *Scorpaena brasiliensis* and *Scorpaena isthmensis* from the Coast of Rio de Janeiro, Brazil. *Cytologia*, 62: 397-404, 1997.

CORTINHAS, M. C.; CESTARI, M. M.; FENOCCHIO, A.S. **Estudo Citogenético comparativo de duas populações de *Atherinella brasiliensis* (Pisces, Atheriniformes, Atherinopsidae)**. Curitiba – PR, 2002. Dissertação de Mestrado – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná.

DENTON, T. E. **Fish Chromosome Methodology**. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas Publisher, 1973.

DENTON, T.E.; HOWELL, W.M.; BARRET, J.V. Human nucleolar organizer chromosomes associations. **Chromosoma**, v.55, p.81-84, 1976.

ELMEROT, C.; ARNASON, U.; GOJOBORI, T.; JANKE, A. The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. **Gene** 295: 163–172, 2002.

FENOCCHIO, A. S.; VENERE, P. C.; CESAR, A. C. G.; DIAS, A. L.; BERTOLLO, L. A. C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, 44 (2): 161-166, 1991.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5)**. São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2000. 116p.

FISCHER, C.; COSTAZ-OZOUF, C.; CROLLIUS, H. R.; DASILVA, C.; JAILLON, O.; BOUNEAU, L.; BONILLO, C.; WEISSENBACH, J.; BERNOT, A.; Karyotype and chromosome location of characteristic tandem repeats in the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, 88: 50-55, 2000.

FRANCIOSI, F. **Estudos Citogenéticos em exemplares do gênero *Sphoeroides* pertencentes ao Bagaço (Pontal do Paraná)**. Curitiba, 2000. 27 f. Monografia (Especialização em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GALETTI Jr., P. M.; RASCH, E. M. NOR variability in diploid and triploid forms of the amazon molly *Poecilia formosa* as shown by silver nitrate and chromomycin A₃ staining. **Brazilian Journal of Genetics** 16: 927-938, 1993.

GOODPASTURE C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, 53: 37-50, 1975.

HINEGARDNER, R.; ROSEN, D. E. Cellular DNA content of sharks, rays and some other fishes. **Comp. Biochem. Physiol. Serie B** 106(951): 621-644, 1972.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled Silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 36: 1014-1015, 1980.

HSU, T. C.; SPIRITO, S. E.; PARDUE, M. L. Distribution of the 18 + 28 ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma**, 53: 25-36, 1975.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52: 201-220, 1964.

MATHEY, R. **Les chromosomes des Vertébrés**. Rouge, Lausanne, 1949.

MOYLE, P. B.; CECH, J. J. **Fishes: Na Introducion to Ichthyology**. Prentice-Hall Inc., 1982. 593p.

MURAMOTO, J. I.; OHNO, S.; ATKIN, N. B. On the diploid state of the fish order Ostariophysi. **Chromosoma (Berl.)** 24: 59-66, 1968.

NEAFSEY, D. E.; PALUMBI, S. R. 2003. Genome Size Evolution in Pufferfish: **A Comparative Analysis of Diodontid and Tetraodontid Pufferfish Genomes**. **Genome Research** 13: 821–830, 2003.

- NELSON, J. S. - **Fishes of de World**. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons Inc., 1994. 523p.
- OHNO, S.; WOLF, U.; ATKIN, N. B. Evolution from fish to mammals by gene duplication. **Hereditas**, 59: 169-187, 1968.
- OHNO, S. **Evolution by gene duplication**. New York, Springer-Verlag, 1970. 160pp.
- OHNO, S. Protochordata, Cyclostomata and Pisces. In John, B. (ed.). **Animal Cytogenetics** 4(1): 1-92, 1974.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, VIII, 2000, Manaus – AM. **Resumos...** Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 2000. 119p.
- PATTERSON, C. A review of Mesozoic acanthopterygian fishes, with special reference to those of the English chalk. **Phil. Trans. R. Soc. London - Serie B** 247: 213-482, 1964.
- RAMALHO, T. R.; FENOCCHIO, A. S.; CESTARI, M. M. Estudos citogenéticos preliminares em *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes) pertencentes à região de Pontal do Sul – PR. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, XIV, 2001, São Leopoldo - RS. **Resumos...** São Leopoldo: UNISINOS, 2001. p.
- ROCHA, C.; FAVARO, L. F.; SPACH, H. L. Biologia reprodutiva de *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus) (Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae) da gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 19 (1): 57 – 63, 2002.

SAITOH, Y.; LAEMMLI, U. K. Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. **Cell**. 76: 609-622, 1994.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. Differentiation of GC and AT rich chromosomes regions in Anura. **Chromosoma** 77: 83-103, 1980.

SUMNER, A T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl. Cell Res.**, 75: 304-306, 1972.

SWARÇA, A. C.; DIAS, A. L.; CESTARI, M. M. **Contribuição à citogenética dos Pimelodidae de grande porte: estudos cariotípicos de 4 espécies do “subgrupo” Sorubiminae.** Cutitiba – PR, 2003. Dissertação de Doutorado – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná.

TYLER, J. C. Osteology, phylogeny and higher classification of the fishes of the order Plectognathi (Tetraodontiformes). **NOAA Techn. Rep. Nat. Mar. Fish.** Circ 434: 1-422, 1980.

VENKATESH, B. Evolution and diversity of fish genomes. **Current Opinion in Genetics & Development** 13:1–5, 2003.

VENKATESH, B.; GILLIGAN, P.; BRENNER, S. Fugu: a compact vertebrate reference genome. **FEBS** 476: 3-7, 2000.