

# Caracterización cromosómica del pez sapo *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) (Teleostei: Batrachoididae) mediante hibridación in situ de fluorescencia

M. A. Merlo<sup>1</sup>, I. Cross<sup>1</sup>, C. Sarasquete<sup>2</sup>, J. L. Palazón-Fernández<sup>3</sup>  
y L. Rebordinos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Genética. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales (CASEM). Universidad de Cádiz. Polígono Río San Pedro, s/n. E-11510 Puerto Real (Cádiz), España. Correo electrónico: laureana.rebordinos@uca.es

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC). Polígono Río San Pedro s/n. E-11510 Puerto Real (Cádiz), España.

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones Científicas. Universidad de Oriente. Apdo. 147. Boca del Río. Isla Margarita, Venezuela.

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

## RESUMEN

Se ha realizado la caracterización cromosómica de *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) mediante la localización de diferentes secuencias repetidas en sus cromosomas. Los especímenes utilizados fueron capturados en aguas de la bahía de Cádiz. Las preparaciones cromosómicas se realizaron de la porción cefálica del riñón. La sonda telomérica hibridó en posición terminal de todos los cromosomas del pez sapo. (GATA)<sub>n</sub> hibridó preferentemente en la región subcentromérica de un par cromosómico submetacéntrico; se encontraron señales adicionales más débiles. Los genes ribosomales mayores también fueron localizados en un par submetacéntrico, pero en región telomérica. Finalmente, la sonda 5S rDNA presentó un patrón de hibridación similar a la sonda GATA. Los resultados aportan interesantes datos que describen marcadores cromosómicos que podrían ser de utilidad para la gestión de poblaciones naturales de esta especie.

**Palabras clave:** *Halobatrachus didactylus*, genes ribosomales, secuencia telomérica, repeticiones GATA, hibridación in situ de fluorescencia, FISH.

## ABSTRACT

**Chromosome characterization of the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) (Teleostei: Batrachoididae) by fluorescent in situ hybridization**

*Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) has a chromosome number of  $2n = 46$  (8 metacentrics, 12 submetacentrics and 26 acrocentrics). Specimens studied were collected from waters of the Bay of Cádiz. Chromosome preparations were made from the cephalic portion of the kidney. The telomeric probe hybridized on the terminal position of all toadfish chromosomes. (GATA)<sub>n</sub> hybridized preferentially on the subcentromeric region of only one submetacentric chromosome pair, although additional weak signals dispersed throughout the chromosomes were found. Major ribosomal genes were also located on a submetacentric pair, but at a telomeric position. Finally, the 5S rDNA probe produced a hybridization pattern similar to the GATA probe. These results provide interesting information which describes chromosomal markers that may be of utility for the management of natural populations of this species.

**Keywords:** *Halobatrachus didactylus*, ribosomal genes, telomeric sequence, GATA repeats, fluorescent in situ hybridization, FISH.

## INTRODUCCIÓN

El pez sapo lusitano *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) es una especie de hábitos solitarios, sedentarios y bentónicos que, generalmente, se encuentra en aguas poco profundas escondido en la arena, entre las algas o las rocas. Estas características hacen que esta especie sea idónea para estudios toxicológicos (Soares *et al.*, 2003). Se distribuye desde la bahía de Vizcaya hasta el golfo de Guinea, y en gran parte del mar Mediterráneo. En Andalucía es apreciado localmente, sobre todo en las lonjas del sur del Mediterráneo; en la bahía de Cádiz representa un componente importante de las comunidades de peces.

La familia Batrachoididae está considerada como uno de los grupos más evolucionados dentro de los teleósteos marinos (Modesto y Canário, 2003), por lo que la biología de muchas de sus especies ha sido ampliamente estudiada, llegando a ser calificadas de animales modelo en estudios científicos de muy diversa índole. *H. didactylus* es una especie muy fácil de obtener, mantener y manipular y por ello ha sido utilizada, también, como modelo en estudios de toxicología y cardiología (Palazón, Nirchio y Sarasquete, 2003).

La hibridación in situ de fluorescencia (FISH) es una poderosa herramienta que utiliza sondas de ADN marcado para localizar genes dentro de la dotación cromosómica de una especie determinada y, también, para detectar anomalías en los cromosomas. En peces, esta técnica ha encontrado multitud de aplicaciones, desde localización de diferentes genes o secuencias, hasta coloreado de cromosomas sexuales o de otros cromosomas específicos para identificar reorganizaciones cromosómicas y para fijación de mapas de QTL (Phillips, 2001).

La información citogenética en la familia Batrachoididae es escasa, siendo la determinación cariotípica el tipo de estudio más desarrollado (Chen, 1967; Brum *et al.*, 2001; Nirchio, Gómez y Villalaz, 2001; Nirchio *et al.*, 2002; Palazón, Nirchio y Sarasquete, 2003), mientras que estudios con técnicas citogenéticas más avanzadas son muy escasos. En cuanto a la técnica FISH, sólo hay descrito un trabajo en la especie *Thalassophryne maculosa* Günther, 1861 (Nirchio

*et al.*, 2004). Con respecto a *H. didactylus* solamente hay descritos dos trabajos en relación con la citogenética: uno sobre el efecto del mercurio inorgánico en sus cromosomas (Gutiérrez, Sarasquete y Establier, 1984), y otro que aporta el cariotipo de la especie y la localización de las regiones organizadoras del nucleolo (NOR) mediante tinción con plata (Palazón, Nirchio y Sarasquete, 2003).

En el presente trabajo se han localizado cuatro familias de ADN repetitivo (teloméricas, repeticiones GATA, ribosómicos mayores y el ADN<sub>r</sub> 5S) en los cromosomas de *H. didactylus*. Además de contribuir al aumento de los escasos datos citogenéticos existentes sobre la especie y sobre su familia, este trabajo constituye la primera investigación mediante el uso de la técnica FISH en esta especie.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestreo y obtención de las preparaciones cromosómicas

El muestreo de los especímenes de *H. didactylus* se llevó a cabo en aguas poco profundas de la bahía de Cádiz; se recogieron en total ocho individuos, de los cuales seis eran machos y dos hembras. Las preparaciones cromosómicas se realizaron a partir de la región cefálica del riñón, tal y como describen Nirchio y Cequea (1998), pero modificando la concentración de colchicina y los tiempos de exposición. Después de sacrificar a los animales, se extrajeron los riñones para someterlos a un choque hipotónico con KCl 0,4 %. De estos riñones se obtuvo una suspensión celular que, después de 30 minutos de choque hipotónico, fue centrifugada, descartando así la solución hipotónica sobrenadante. El pellet se resuspendió y se lavó tres veces en una disolución Carnoy (metanol:ácido acético; 3:1). La suspensión celular se dejó gotear desde unos 60 cm, aproximadamente, sobre un portaobjetos previamente enfriado a -20 °C y después se dejaron secar los portaobjetos al aire.

Las preparaciones cromosómicas fueron después sometidas a un pretratamiento con RNasa, pepsina y formaldehído de acuerdo con Wiegant *et al.* (1991). Finalmente, las mues-

tras se deshidrataron en sucesivos pases de etanol y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la hibridación.

### Obtención de las sondas

Las secuencias teloméricas  $(\text{TTAGGG})_n$  y  $(\text{GATA})_n$  se obtuvieron mediante el procedimiento descrito por Ijdo *et al.* (1991), utilizándose, para ello, los cebadores  $(\text{TTAGGG})_5$  y  $(\text{CCCTAA})_5$  para las teloméricas y  $(\text{GATA})_7$  y  $(\text{TATC})_7$  para las GATA. La sonda ribosómica usada fue pDM238 (Roïha *et al.*, 1981), que contiene los genes y espaciadores del ADNr 18S-5.8S-28S de *Drosophila melanogaster*. Se consiguió mediante extracción del plásmido pBR322, donde está clonada la sonda. La sonda de ADNr 5S se obtuvo a partir de ADN genómico de *H. didactylus* mediante una PCR de 35 ciclos de amplificación a una temperatura de anillamiento de  $59^{\circ}\text{C}$ , usando como cebadores los descritos por Pendás *et al.* (1994).

### Marcado de las sondas

Las sondas  $(\text{TTAGGG})_n$ ,  $(\text{GATA})_n$  y 18S-5.8S-28S rDNA se marcaron con digoxigenina mediante el método Nick Translation, usando, para ello, el kit DIG-Nick Translation Mix (Roche Molecular Biochemicals). Sin embargo, la sonda ADNr 5S se marcó (también con digoxigenina) mediante PCR, utilizando los mismos cebadores y añadiendo en la mezcla de reacción *DIG-11-dUTP* (Roche Molecular Biochemicals).

### Hibridación in situ de fluorescencia (FISH)

Las sondas telomérica y GATA marcadas, después de mezclarlas con disolución de hibridación, se añadieron a las preparaciones cromosómicas y se incubaron 7 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Las sondas ribosómicas se desnaturalizaron a  $75^{\circ}\text{C}$  de forma separada a las preparaciones cromosómicas ( $83^{\circ}\text{C}$ ) para, posteriormente, añadirse a éstas. Las preparaciones se dejaron hibridar durante una noche a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Al día siguiente, las preparaciones cromosómicas se trataron según los protocolos descritos por Cross, Vega y Rebordinos (2003) y Cross *et al.* (2005). La detección inmunocitoquímica se llevó a cabo con tres anticuerpos: el primero de ellos es una antidigoxigenina y los otros dos son anticuerpos unidos al complejo fluorescente FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Cross, Vega y Rebordinos, 2003).

Los cromosomas se tiñeron con yoduro de propidio (500 ng/ml). Se tomaron las imágenes de las mejores placas metafásicas utilizando un microscopio de epifluorescencia (Axioskop 2 Plus, Zeiss) equipado con una cámara CCD (CoolSnap, Photometrics®).

## RESULTADOS

Para la determinación de los resultados del presente estudio se observaron una media de 20 placas metafásicas por portaobjetos, y tres portaobjetos de individuos distintos por sonda. La hibridación con la sonda telomérica  $(\text{TTAGGG})_n$ , típica de todos los vertebrados, dio señales positivas en los extremos de todos los cromosomas del pez sapo, no detectándose señales intersticiales adicionales (figura 1a). La repetición  $(\text{GATA})_n$  mostró una zona de mayor concentración de esta secuencia microsatélite en la región subcentromérica del brazo q de un único par cromosómico submetacéntrico. Además, se observaron señales secundarias repartidas a lo largo de todo el genoma (figura 1b).

La hibridación con la sonda ribosomal mayor se localizó en posición telomérica del brazo p de un par cromosómico submetacéntrico, no encontrándose en ninguna otra posición (figura 2a). Por su parte, la sonda de ADNr 5S se encontró en posición subcentromérica del brazo q de un par cromosómico submetacéntrico. También se encontraron señales de menor intensidad repartidas por varios cromosomas de *H. didactylus* (figura 2b).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha realizado la caracterización cromosómica de *H. didactylus* median-

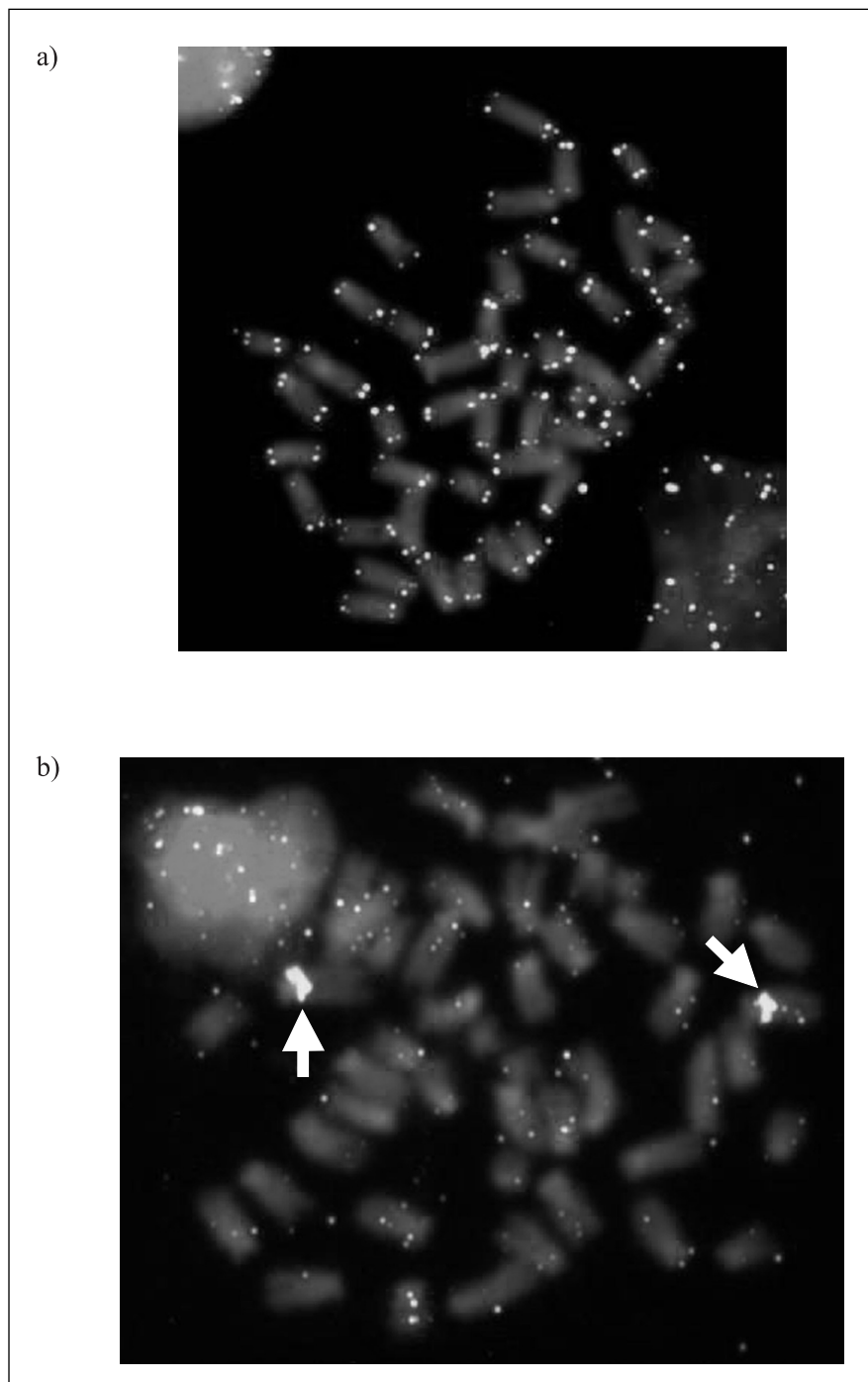
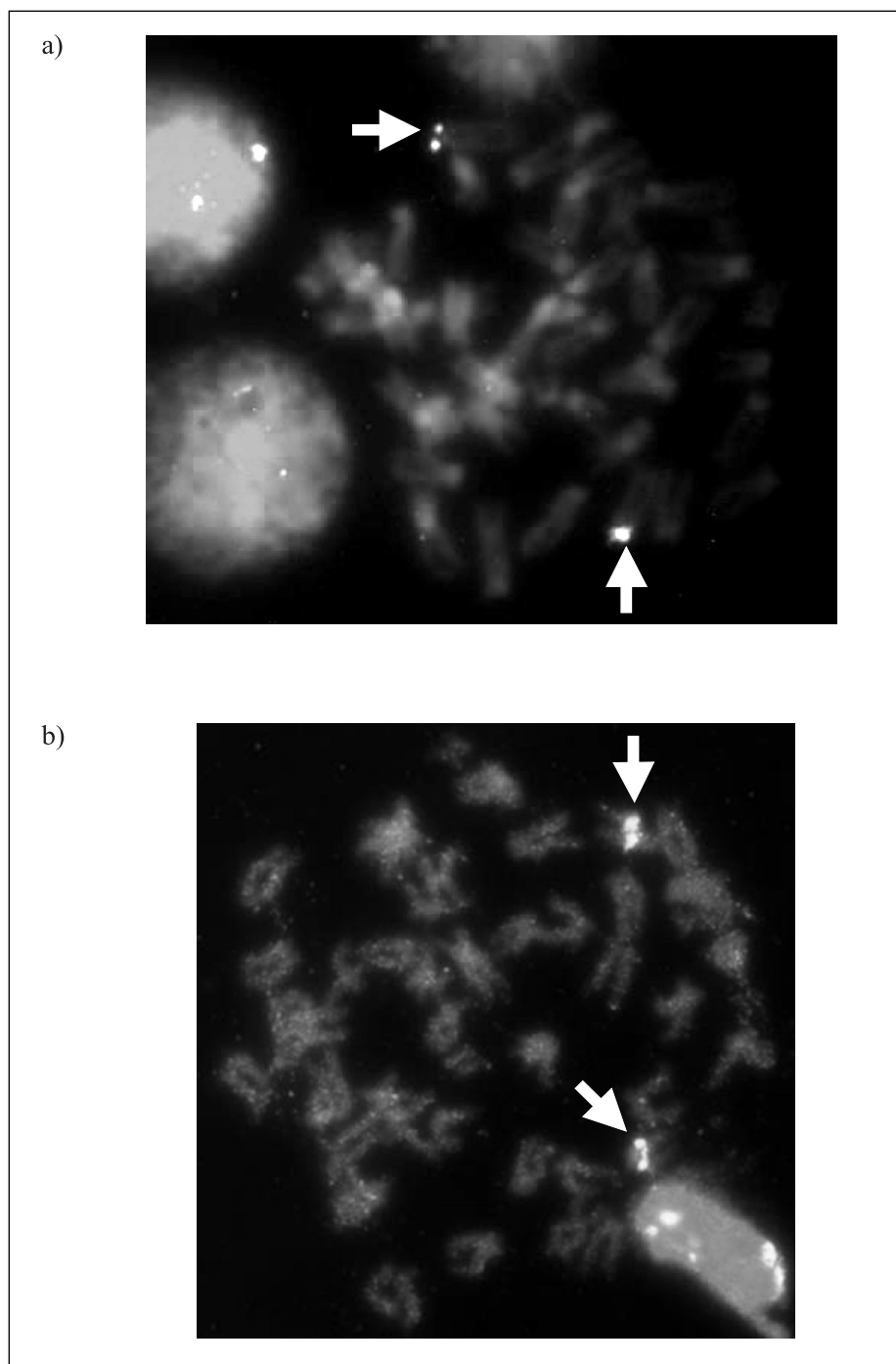


Figura 1. Hibridación in situ de fluorescencia con sonda telomérica  $(TTAGGG)_n$  (a) y sonda  $(GATA)_n$  (b). Las flechas indican la zona de mayor concentración de secuencias GATA.

te la localización de diferentes secuencias repetidas en sus cromosomas. *H. didactylus* tiene un complemento cromosómico compuesto por un número diploide de 46 cromosomas (NF = 66), de los cuales 8 son metacéntricos, 12 submetacéntricos y 26 acrocéntricos (Palazón, Nirchio y Sarasquete, 2003). Los estudios de determinación cariotípica dentro de la familia Batrachoididae son muy escasos, solamente están descritos

los cariotipos de siete especies de esta familia. La mayoría de ellos coinciden en el número de cromosomas ( $2n = 46$ ) (Nirchio, Gómez y Villalaz, 2001; Nirchio *et al.*, 2002; Palazón, Nirchio y Sarasquete, 2003), excepto en las especies *Porichthys porosissimus* (Valenciennes, 1897), que cuenta con una dotación  $2n = 44$  (Brum *et al.*, 2001), y *Porichthys notatus* Girard, 1854, con  $2n = 48$  (Chen, 1967). Sin embargo, el número NF se

Figura 2. Localización de los genes de ADNr 18S-5.8S-28S (a) y ADNr 5S (b). Las flechas indican las regiones de hibridación de los distintos clusters ribosómicos.



muestra bastante variable en esta familia, con registros desde 52 hasta 66. Se ha postulado que la variación en el número de cromosomas se debe a procesos de fusiones y (o) fisiones (cambios robertsonianos), mientras que las inversiones pericéntricas pueden ser la causa de las discrepancias en el número de brazos (Gold, 1979). Asumiendo que el cariotipo del ancestro de todos los teleósteos fue  $2n = 48$ , se concluye

que el cariotipo de *H. didactylus* se formó como resultado de la fusión central de dos pares de cromosomas acrocéntricos, reduciendo el número diploide de 48 a 46 (Palazón, Nirchio y Sarasquete, 2003).

La secuencia telomérica  $(TTAGGG)_n$  ha sido descrita ampliamente en vertebrados, hibridando de forma mayoritaria en los extremos de todos los cromosomas, excepto en algunas espe-

cies de peces, en las que han hibridado con los NOR (Salvadori *et al.*, 1995; Abuin *et al.*, 1996). Este hexámero se ha descrito también en invertebrados tan dispares como moluscos gasterópodos (Vitturi *et al.*, 2004; Gallardo-Escárate *et al.*, 2005), bivalvos (Guo y Allen, 1997; Cross *et al.*, 2005), crustáceos (Pelliccia *et al.*, 1994) y anélidos (Vitturi *et al.*, 2002a,b). El hecho de que existan señales más débiles en algunos telómeros se debe a variaciones en la cantidad de repeticiones de la secuencia TTAGGG entre los telómeros de los cromosomas (Guo y Allen, 1997). La ausencia de señales en otras zonas no teloméricas nos induce a sugerir que no han existido inversiones pericéntricas más o menos recientes, y si hubiera regiones intersticiales con esta secuencia, ésta sería de tan bajo número de copias que la técnica FISH no podría detectarlas (Mandrioli, Colomba y Vitturi, 2000).

Se trata de la primera vez que se localiza mediante FISH una gran región con la secuencia (GATA)<sub>n</sub> en cromosomas de peces. El mismo patrón de hibridación de *H. didactylus* con la sonda (GATA)<sub>n</sub> fue hallado en el crustáceo isópodo *Asellus aquaticus* (L., 1758) (Pelliccia *et al.*, 1991). Se ha postulado que las repeticiones GATA pueden tener un significado funcional en la biología de los cromosomas sexuales (Subramanian, Mishra y Singh, 2003). En el ratón, la secuencia *Bkm* (cuyo componente mayoritario está constituido por las repeticiones GATA) está predominantemente concentrada en el cromosoma Y (Singh y Jones, 1982); también está presente en el cromosoma W de diferentes especies de serpientes (Singh, Purdom y Jones, 1980). Además, se ha encontrado ligada al sexo en algunas especies de tortuga (Demas *et al.*, 1990).

Estudios previos con técnicas de tinción argéntica para detectar las regiones organizadoras del nucleolo (NOR) en *H. didactylus* revelaron tinción positiva en un par cromosómico submetacéntrico (Palazón, Nirchio y Sarasquete, 2003). Este resultado coincide con el obtenido en los ribosómicos mayores en el presente trabajo. La hibridación obtenida con la sonda 18S en otra especie de la familia Batrachoididae, *Thalassophryne maculosa* Günther, 1861 (Nirchio *et al.*, 2004), también mostró hibridación en la región telomérica, con la salvedad de que la pareja cromosómica que contiene los rDNA es

una pareja subtelocéntrica en vez de submetacéntrica, observándose que tampoco existían señales NOR adicionales. Se ha asumido que una única pareja de cromosomas NOR representa una condición ancestral en la mayoría de las especies de vertebrados (Amemiya y Gold, 1990). En algunos organismos se ha detectado un menor número de señales Ag-NOR con respecto a las detectadas mediante FISH-rDNA; esto indica que cierta proporción de regiones NOR fueron transcripcionalmente silenciadas durante la última interfase (Cross, Vega y Rebor-dinos, 2003), ya que la técnica de tinción con plata sólo tiñe los NOR transcripcionalmente activos durante la interfase precedente, mientras que la técnica con rDNA-FISH permite la identificación de estos clusters independientemente de su estado transcripcional (Gallardo-Escárate *et al.*, 2005). Los heteromorfismos en las señales de hibridación existentes entre cromosomas homólogos indican que el número de copias de rDNA es variable, y también indican la existencia de errores como deleciones o duplicaciones del cluster rDNA durante el estado transcripcional (Gallardo-Escárate *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta la posición en la que se encuentran las señales de los dos clusters ribosomales, se puede decir que el ADN<sub>r</sub> 18S-5.8S-28S no se encuentra colocalizado con el ADN<sub>r</sub> 5S. La colocalización de los genes ribosomales es una organización rara en vertebrados, aunque se han dado casos de colocalización en peces (Pendás *et al.*, 1994; Fujiwara *et al.*, 1998). Por el contrario, tanto la posición de las señales como el tamaño de los cromosomas, hacen pensar que el ADN<sub>r</sub> 5S y la repetición GATA se encuentran colocalizados. Esta posibilidad se confirmaría mediante una hibridación doble que incluyera a estas dos sondas. El ADN<sub>r</sub> 5S está formado por repeticiones en tándem de una región codificante muy conservada y un espaciador no transcrito (NTS), cuya secuencia y longitud es variable. La aparición de múltiples señales secundarias en la hibridación con sonda 5S rDNA lleva a suponer que los NTS puedan contener algún tipo de ADN altamente repetitivo. Se hace necesario un exhaustivo análisis de la secuencia de este gen para confirmar la presencia de este ADN repetitivo. Este estudio, junto a la doble-FISH con los dos genes ribosomales y la repetición GATA, está

en progreso actualmente en este mismo laboratorio.

Los resultados obtenidos aportan nuevos e interesantes datos sobre la genética de *H. didactylus*, describiendo marcadores cromosómicos que podrían ser de utilidad para la gestión de poblaciones naturales de esta especie. Por otra parte, los resultados tienen importantes implicaciones desde el punto de vista evolutivo, lo cual, junto a su interés en estudios de cardiología y toxicología, pone en relieve el valor de esta especie como organismo modelo.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía al grupo de investigación CVI-219.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abuin, M., C. Clabby, P. Martinez, U. Goswami, F. Flavin, N. P. Wilkins, J. A. Houghton, R. Powell y L. Sánchez. 1996. A NOR-associated repetitive element present in the genome of two *Salmo* species (*Salmo salar* and *Salmo trutta*). *Genome* 39: 671-679.
- Amemiya, C. T. y J. R. Gold. 1990. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XVII. Chromosomal NOR phenotypes of 12 species, with comments on cytosystematic relationships among 50 species. *Hereditas* 112: 231-247.
- Brum, M. J. I., P. R. A. M. Affonso, L. C. G. Mota, E. Pauls y M. R. C. B. Netto. 2001. Cytogenetic characterization of *Porichthys porosissimus* (Valenciennes, 1857) (Batrachoididae, Batrachoidiformes) from the Rio de Janeiro Coast, Brazil. *Chromosome Science* 5: 15-18.
- Chen, T. R. 1967. *Comparative karyology of selected deep-sea and shallow water Teleost fishes*. Tesis doctoral. Universidad de Yale. New Haven, Connecticut, EE UU.
- Cross, I., E. Díaz, I. Sanchez y L. Rebordinos. 2005. Molecular and cytogenetic characterization of *Crassostrea angulata* chromosomes. *Aquaculture* 247: 135-144.
- Cross, I., L. Vega y L. Rebordinos. 2003. Nucleolar organizing regions in *Crassostrea angulata*: chromosomal location and polymorphism. *Genetica* 119: 65-74.
- Demas, S., M. Duronslet, S. Wachtel, C. Caillouet y D. Nakamura. 1990. Sex-specific DNA in reptiles with temperature sex determination. *Journal of Experimental Zoology* 253: 319-324.
- Fujiwara, A., S. Abe, E. Yamaha, F. Yamazaki y C. Yoshida. 1998. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA genes loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chromosome Research* 6: 463-471.
- Gallardo-Escárate, C., J. Álvarez-Borrego, M. A. del Río-Portilla, I. Cross, A. Merlo y L. Rebordinos. 2005. Fluorescence in situ hybridization of rDNA, telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> and (GATA)<sub>n</sub> repeats in the red abalone *Haliotis rufescens* (Archaeogastropoda: Haliotidae). *Hereditas* 142: 73-79.
- Gold, J. R. 1979. Cytogenetics. *Fish Physiology* 8: 353-405.
- Guo, X. y S. K. J. Allen. 1997. Fluorescence in situ hybridization of vertebrate telomere sequence to chromosome ends of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Shellfish Research* 16: 87-89.
- Gutiérrez, M., C. Sarasquete y R. Establier. 1984. Nota sobre los efectos del mercurio inorgánico (HgCl<sub>2</sub>) en los cromosomas del pez sapo marino, *Halobatrachus didactylus*. *Investigación Pesquera* 48: 181-185.
- Ijdo, J. W., R. A. Wells, A. Baldini y S. T. Reeders. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)<sub>n</sub> generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19: 4780.
- Mandrioli, M., M. S. Colomba y R. Vitturi. 2000. Chromosomal analysis of repeated DNAs in the rainbow wrasse *Coris julis* (Pisces, Labridae). *Genetica* 108: 191-195.
- Modesto, T. y A. V. M. Canário. 2003. Morphometric changes and sex steroid levels during the annual reproductive cycle of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. *General and Comparative Endocrinology* 131: 220-231.
- Nirchio, M. T. y H. Cequea. 1998. Karyology of *Mugil liza* and *M. curema* from Venezuela. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras* 27: 45-50.
- Nirchio, M., A. S. Fenocchio, A. C. Swarça, A. L. Dias, L. Giuliano-Caetano, E. Ron, J. I. Gaviria y J. E. Pérez. 2004. Cytogenetic characterization of *Thalassophryne maculosa* Günther, 1861 (Pisces: Batrachoididae) from Margarita Island, Venezuela. *Caribbean Journal of Science* 40: 218-222.
- Nirchio, M., J. A. Gómez y J. Villalaz. 2001. Cariotipo del pez sapo *Batrachoides pacifici* (Batrachoididae: Teleostei) de la costa del Pacífico de Panamá. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela* 13: 82-84.
- Nirchio, M., B. J. Turner, J. E. Pérez, J. I. Gaviria y H. Cequea. 2002. Karyotypes of three species of toadfish (Batrachoididae: Teleostei) from Venezuela. *Scientia Marina* 66: 1-4.
- Palazón, J. L., M. Nirchio y C. Sarasquete. 2003. Conventional karyotype and nucleolar organiser regions of the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) (Pisces: Batrachoididae). *Scientia Marina* 67: 445-449.
- Pelliccia, F., M. di Castro, V. Lanza, E. V. Volpi y A. Rocchi. 1991. GATA repeats in the genome of *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda). *Chromosoma* 100: 152-155.
- Pelliccia, F., E. V. Volpi, V. Lanza, L. Gaddini y A. Rocchi. 1994. Telomeric sequences of *Asellus aquaticus* (Crust. Isop.). *Heredity* 72: 78-80.
- Pendás, A. M., P. Morán, J. P. Freije y E. García-Vásquez. 1994. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetic and Cell Genetics* 67: 31-36.

- Phillips, R. B. 2001. Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) to Fish Genetics and Genome Mapping. *Marine Biotechnology* 3: 145-152.
- Roiha, H., J. R. Miller, L. C. Woods y D. M. Glover. 1981. Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *Drosophyla melanogaster*. *Nature* 290: 749-753.
- Salvadori, S., A. M. Deiana, E. Coluccia, G. Florida, E. Rossi y O. Zuffardi. 1995. Colocalization of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Research* 3: 54-58.
- Singh, L. y K. W. Jones. 1982. Sex reversal in the mouse (*Mus musculus*) is caused by a recurrent nonreciprocal crossover involving the X and the aberrant Y-chromosome. *Cell* 28: 205-216.
- Singh, L., I. F. Purdom y K. W. Jones. 1980. Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. *Chromosoma* (Berlín) 79: 137-157.
- Soares S. S., M. Aureliano, N. Joaquim y J. M. Coucelo. 2003. Cadmium and vanadate oligomers effects on methaemoglobin reductase activity from Lusitanian toadfish: in vivo and in vitro studies. *J. Inorg. Biochem.* 94: 285-290.
- Subramanian, S., R. K. Mishra y L. Singh. 2003. Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. *Bioinformatics* 19: 681-685.
- Vitturi, R., M. S. Colomba, A. M. Pirrone y M. Mandrioli. 2002a. rDNA (18S-28S and 5S) Colocalization and linkage between ribosomal genes and (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in the earthworm, *Octodrilus complanatus* (Annelida: Oligochaeta: Lumbricidae), revealed by single- and double-color FISH. *The Journal of Heredity* 93: 279-282.
- Vitturi, R., A. Libertini, F. Armetta, L. Sparacino y M. S. Colomba. 2002b. Chromosome analysis and FISH mapping of ribosomal DNA (rDNA), telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> and (GATA)<sub>n</sub> repeats in the leech *Haemopsis sanguisuga* (L.) (Annelida: Hirudinea). *Genetica* 115: 189-194.
- Vitturi, R., L. Sineo, N. Volpe, A. Lannino y M. Colomba. 2004. Repetitive DNAs in the slug *Milax nigricans*: association of ribosomal (18S-28S and 5S rDNA) and (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in the slug *M. nigricans* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata). *Micron* 35: 255-260.
- Wiegant J., N. J. Galjart, A. K. Raap y A. d'Azzo. 1991. The gene encoding human protective protein (PPGB) is on chromosome 20. *Genomics* 10: 345-349.