



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

**DOTTORATO DI RICERCA**

Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente

Ciclo XXVIII

**Studio citogenetico della famiglia Muraenidae**

**(Anguilliformes: Actinopterygii) mediante tecniche di  
citogenetica classica e molecolare**

**BIO/05**

Presentato da:

**Dott.ssa Cinzia Lobina**

Coordinatore Dottorato:

Prof. Emanuele Sanna

Tutor/Relatore:

Dott.ssa Elisabetta Coluccia

Esame finale Anno Accademico 2014-2015



*Ministero dell'Istruzione  
dell'Università e Ricerca*

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2014/2015 - XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio (ex D.M. n. 198/2003) finanziata con le risorse del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca.

## SOMMARIO

<i>Abstract</i>	4
<b><i>Introduzione</i></b>	7
<b>Citogenetica</b>	8
L'importanza della citogenetica	8
Il bandeggio cromosomico nei pesci	10
Il DNA ripetitivo	11
I geni ribosomiali	14
Tecniche di studio citogenetico dei geni ribosomiali	21
I telomeri	25
Una tecnica di studio citogenetico dei telomeri	27
<b>Le specie oggetto di studio</b>	29
Caratteristiche generali dei murenidi	29
Tassonomia e filogenesi	31
Generi e specie studiate	36
Citogenetica degli anguilliformi	53
Cariologia dei murenidi	55
Bibliografia	57
<b><i>Obiettivi della tesi</i></b>	63
<b>Capitolo 1: Caratterizzazione citogenetica e distribuzione dell'eterocromatina in sei specie di murene Indopacifiche (Anguilliformes: Muraenidae)</b>	65
Materiali e metodi	68
Risultati	72
Discussione	80
Bibliografia	83
<b>Capitolo 2: Studio della regione organizzatrice del nucleolo e delle sequenze telomeriche mediante bandeggio cromosomico e FISH in sei specie di murene Indopacifiche (Anguilliformes: Muraenidae)</b>	85
Materiali e metodi	87
Risultati	90
Discussione	96
Bibliografia	99
<b>Capitolo 3: Studio della famiglia genica ribosomiale minore (rDNA 5S) mediante FISH in specie di murene Atlantiche e Indopacifiche (Anguilliformes: Muraenidae)</b>	100
Materiali e metodi	103
Risultati	110
Discussione	119
Bibliografia	121
<b>Conclusioni</b>	123

# Abstract

---

## **Studio citogenetico della famiglia Muraenidae (Anguilliformes: Actinopterygii) mediante tecniche di citogenetica classica e molecolare**

Le murene (classe Actinopterygii, ordine Anguilliformes, famiglia Muraenidae) sono pesci teleostei diffusi in acque tropicali e temperate e tra i più comuni predatori delle barriere coralline. Nonostante la loro diffusione, sono animali poco studiati per le loro abitudini criptiche e notturne; inoltre sono specie di scarsa importanza commerciale e, in alcune regioni asiatiche, spesso coinvolte in casi di intossicazione umana da ciguatera. La maggior parte degli studi, oltre all'analisi della natura e della trasmissione di tale intossicazione, riguardano la tassonomia e la classificazione delle specie, che si basa principalmente su caratteri morfologici esterni e colorazione del corpo, ma a tutt'oggi permangono ancora molti dubbi sulla classificazione di molte specie e la loro attribuzione ai diversi generi. Un importante contributo può venire dalla citogenetica comparativa che permette di studiare l'evoluzione del cariotipo tra specie sia all'interno che tra diversi generi, contribuendo a fornire informazioni utili per dirimere le incertezze riguardanti la filogenesi e tassonomia della famiglia Muraenidae. Nonostante ciò, ad oggi si conosce la struttura del cariotipo di meno del 10% delle specie esistenti e su pochissime specie è stati condotti studi approfonditi mediante tecniche di citogenetica molecolare e di citogenetica comparativa.

Nell'ambito di una ricerca volta a studiare l'evoluzione del cariotipo in teleostei dell'ordine Anguilliformes ed in particolare della famiglia Muraenidae, in questo lavoro di tesi di dottorato è stato analizzato, mediante colorazione di Wright e bandeggio C, il complemento cromosomico di sei specie di murena, diffuse nell'oceano Indo-pacifico, appartenenti a tre diversi generi: *Echidna*, *Gymnomuraena* e *Gymnothorax* con l'intento di investigare la differenziazione cromosomica.

Quattro specie hanno mostrato un numero cromosomico diploide  $2n=42$ , tipico della famiglia, mentre nelle altre due specie sono stati evidenziati numeri cromosomici differenti,  $2n=40$  e  $2n=36$ . Nella maggior parte delle specie, è stata identificata una grande quantità di eterocromatina costitutiva, con una distribuzione specie-specifica, molto utile per l'appaiamento dei cromosomi omologhi.

Inoltre è stato approfondito, su queste specie, lo studio di particolari porzioni del genoma come i geni ribosomiali (rDNA 45S e rDNA 5S) e le sequenze telomeriche  $(TTAGGG)_n$ , regioni altamente conservate nell'evoluzione, che per questo rappresentano utili marcatori cromosomici per studi citotassonomici. In tutte le specie i geni ribosomiali maggiori sono stati

localizzati in una regione ricca in GC di un'unica coppia cromosomica, ma con localizzazione differente tra le specie. La sequenza telomerica (TTAGGG) $n$  è stata identificata in posizione terminale nei cromosomi in tutte le specie.

La famiglia genica ribosomiale minore (rDNA 5S) non è mai stata studiata in specie di murena, perciò si sono volute analizzare, oltre a tre specie Indopacifiche, anche le specie mediterranee *G. unicolor* e *Muraena helena*. In quasi tutte le specie sono stati identificati cluster multipli di geni 5S, la cui localizzazione è risultata sia conservata che differenziata tra le specie. La comparazione dei risultati ottenuti con i dati disponibili in letteratura confermano una sostanziale conservazione del numero cromosomico diploide nella famiglia Muraenidae e supportano l'ipotesi di riarrangiamenti cromosomici che hanno causato la diversificazione del cariotipo. Inoltre l'evidenziazione di due specie con differente numero cromosomico, suggerisce che siano avvenute anche fusioni Robertsoniane nell'evoluzione del cariotipo.

## **Abstract (English version)**

---

### **Cytogenetic study of the family Muraenidae (Anguilliformes: Actinopterygii) by conventional and molecular techniques**

Moray eels (Actinopterygii, Anguilliformes, Muraenidae) are teleosts widespread in tropical and temperate seas and among the most common predators of the coral reef. Nevertheless, they are too little studied due to their hidden and nocturnal habits; furthermore, they are not important commercially, and in Asian countries are involved in ciguatera poisoning in humans. Beside the ciguatera fish poisoning, most studies concern the taxonomy, mainly based on morphology and body colour pattern; however the classification of species and genera is still controversial.

Comparative cytogenetic, allowing the study of karyotype evolution among species and genera, could contribute to shed light on taxonomic and phylogenetic uncertainties on Muraenidae family. Till now, less of 10% have been karyologically analysed and a very few number of species have been studied by molecular and comparative cytogenetics.

Whitin a karyological study on anguilliform teleosts, and in particular on morays, in this PhD reseach, a comparative cytogenetic analysis of six Indo-Pacific moray eels from three different genera (*Gymnothorax fimbriatus*, *Gymnothorax flavimarginatus*, *Gymnothorax javanicus*, *Gymnothorax undulatus*, *Echidna nebulosa* and *Gymnomuraena zebra*), was carried

out, using Wright's staining and C-banding in order to investigate the chromosomal differentiation in the family Muraenidae.

Four species displayed a diploid chromosome number  $2n=42$ , which is common among the Muraenidae. Two other species were characterized by different chromosome numbers ( $2n=40$  and  $2n=36$ ). For most species, a large amount of constitutive heterochromatin was detected in the chromosomes, with species-specific C-banding patterns that enabled pairing of the homologous chromosomes.

In all species, the major ribosomal genes were localized in the guanine-cytosine-rich region of one chromosome pair, with different chromosomal locations. The  $(TTAGGG)_n$  telomeric sequences were mapped onto chromosomal ends in all the muraenids studied.

Since the minor ribosomal family have been never studied in any moray species, in this study the 5S rDNA have been mapped, beside three Indopacific moray, in the Mediterranean species *G. unicolor* e *Muraena helena*. Almost all species displayed multiple cluster of 5S genes with both different as well as conserved localizations among species.

The comparison of the results derived from this study with those available in the literature confirms a substantial conservation of the diploid chromosome number in the Muraenidae and supports the hypothesis that rearrangements have occurred that have diversified their karyotypes. Furthermore, the finding of two species with different diploid chromosome numbers suggests that additional chromosomal rearrangements, such as Robertsonian fusions, have occurred in the karyotype evolution of the Muraenidae.



## ***Introduzione***

## ***Citogenetica***

Durante la prima metà del 20° secolo il numero cromosomico umano era al centro di numerose pubblicazioni scientifiche, ma i risultati ottenuti attraverso sezioni di tessuto furono imprecisi e diedero informazioni errate. Il numero diploide corretto  $2n = 46$  delle cellule umane è stato istituito solo nel 1956 (Tjio e Levan, 1956). Nella seconda metà del 20° secolo diversi metodi di colorazione cromosomica e bandeggio hanno permesso di ottenere notevoli progressi in campo citogenetico. Dopo il 1980, con i progressi nel campo della biologia molecolare e della genomica, la citogenetica è entrata in sinergia con la biologia molecolare, consentendo notevoli progressi nella comprensione dei genomi attraverso i cromosomi. Al giorno d'oggi, i progressi nella microscopia, nell'applicazione della bioinformatica, e nell'integrazione di analisi cromosomiche e dati genomici, costituiscono strumenti promettenti per il futuro della citogenetica.

La disponibilità, negli ultimi dieci anni, di centinaia di genomi eucarioti completamente sequenziati apre nuove strade per la citogenetica, con maggiori prospettive per la mappatura fisica dei geni nei cromosomi e la citogenetica comparativa. Sebbene l'integrazione della citogenetica e della genomica sembri essere un evento recente, il cromosoma ha preso il suo posto di rilievo nella emergente genomica. La connessione tra genoma e cromosoma è stata spesso condotta in modo indiretto, utilizzando la mappatura che si basa sulla determinazione delle posizioni dei geni nei cromosomi. Più recentemente, la sequenza nucleotidica completa dei vari genomi ha permesso anche l'ottenimento di mappe cromosomiche per diverse specie. Nonostante i grossi sforzi utilizzando nuovi strumenti di analisi genomica e bioinformatica, molti dei genomi completamente sequenziati presentano ancora porzioni che rimangono sconosciute, a causa della difficoltà nell'individuare correttamente la posizione e la matrice di particolari tipi di sequenze nucleotidiche, come il DNA ripetitivo. In questo modo, la citogenetica molecolare permette di integrare le sequenze nucleotidiche con la mappatura cromosomica fisica delle sequenze di DNA o dei geni. La citogenetica può fornire delle vere e proprie mappe cromosomiche fisiche, che sono di grande valore per ancorare e sostenere altre mappe genetiche, come mappe di collegamento, mappe di restrizione e mappe di sequenze nucleotidiche (Martins *et al.*, 2010).

### ***L'importanza della citogenetica***

L'idea dell'esistenza dei cromosomi è apparsa soltanto nell'ultimo quarto del XIX secolo. Il primo scienziato a descrivere chiaramente il processo della mitosi e il coinvolgimento della

"figura cromatica nucleare" fu probabilmente il zoologo tedesco Anton Schneider nel 1873. Il termine cromosoma è stato introdotto solo nel 1888 da Waldeyer, un professore di anatomia in Germania (Sumner, 2003). Qualunque potesse essere la loro funzione, i cromosomi inevitabilmente divennero soggetto popolare di studio, essendo cospicui organelli cellulari con notevole attrattiva estetica. Tuttavia, già dai primissimi studi, è apparso chiaro che essi fossero coinvolti nell'ereditarietà, e già nel 1887 Weismann formulò e fece valere la sua teoria cromosomica sull'ereditarietà.

Il modello di Watson e Crick per la struttura del DNA può essere considerato come l'inizio dell'era della biologia molecolare. Negli anni '70, quando si studiavano i cromosomi si faceva riferimento alla posizione centrale del DNA e si consideravano le altre componenti cromosomiche come secondarie. Forse, questa era una sopravvalutazione della posizione del DNA. I cromosomi rimangono importanti non solo perché portano i geni, ma perché il loro comportamento determina il meccanismo dell'ereditarietà. La distribuzione dei geni alle cellule figlie durante mitosi e meiosi è una conseguenza diretta del comportamento dei cromosomi. Il comportamento del DNA e dei geni è fortemente limitato dal fatto che essi sono incorporati nei cromosomi e nella cromatina (che è costituita, in effetti, dai cromosomi in interfase). Il DNA può funzionare nella replicazione e nella trascrizione solo perché è associato a proteine che controllano e catalizzano questi processi. L'espressione genica è controllata da modifiche agli istoni e dai complessi di rimodellamento della cromatina. Anche qualcosa di apparentemente banale, come la posizione di un gene all'interno di un cromosoma può influenzare notevolmente il suo comportamento.

L'eterocromatina è composta da segmenti cromosomici che non decondensano alla fine della mitosi, e che sono generalmente geneticamente inattivi. Un gene posizionato accanto all'eterocromatina può essere inattivato, producendo l'effetto noto come "effetto di posizione" (PEV), nel quale un particolare gene può essere acceso in alcune cellule e spento in altre. Tali effetti si sono rivelati sorprendentemente diffusi. L'eterocromatina consiste generalmente in brevi sequenze di DNA ripetute, non codificanti. La stessa cosa è valida per molte altre sequenze di DNA che non sono associate ai geni, e che di fatto costituiscono la maggior parte del DNA in alcuni organismi. La grande quantità di DNA che occupa tali sequenze, e le differenze di quantità tra organismi diversi, hanno portato al "paradosso del valore C", ossia il fatto che la quantità di DNA in un nucleo diploide di un organismo non è necessariamente legata alla complessità dell'organismo ed è notevolmente superiore alla quantità necessaria per fornire tutti i geni necessari. Secondo alcuni, il DNA extra è solo "spazzatura", mentre altri affermano che il DNA extra potrebbe avere funzioni strutturali.

***Il bandeggio cromosomico nei pesci***

Un'importante tappa dell'analisi citogenetica di una specie prevede la caratterizzazione dei cromosomi in base alla loro dimensione relativa, alla posizione del centromero e allo specifico quadro di bande che può essere messo in evidenza in ciascun cromosoma.

Il bandeggio cromosomico permette di evidenziare le caratteristiche relative alla struttura e alla composizione della cromatina e di identificare marcatori genetici utili per il riconoscimento dei cromosomi e lo studio della variabilità intra- ed interspecifica.

Sui cromosomi possono essere applicate due tipologie di bandeggio su altrettante regioni del genoma: 1) regioni eucromatiche; 2) regioni eterocromatiche.

Le caratteristiche delle regioni eucromatiche lungo il cromosoma, vengono evidenziate mediante tecniche di bandeggio (strutturali e dinamiche). Le bande eucromatiche strutturali sono raramente ottenibili nella maggior parte dei vertebrati inferiori, in particolare nei pesci tale difficoltà potrebbe essere correlata a specifiche caratteristiche strutturali della cromatina o ad impedimenti tecnici come la qualità dei preparati cromosomici. Nonostante l'ottimizzazione delle tecniche di coltura e il miglioramento dei preparati cromosomici, persiste la difficoltà nell'ottenere alcuni tipi di bandeggio. Ciò ha portato alla conclusione che la mancanza di risultati sia riconducibile alle peculiari caratteristiche della cromatina dei pesci e più precisamente alla mancanza di compartimentalizzazione del genoma. Le principali tecniche utilizzate sono i bandeggi G ed R ed il bandeggio Q. I bandeggi G e Q colorano le zone eucromatiche con un alto contenuto in basi adenina-timina (AT) e hanno una conformazione cromosomica più compatta. Il bandeggio R evidenzia le zone contenenti guanina-citosina (GC) in maggior numero, caratterizzate da un'organizzazione cromatinica scarsamente contratta. È stata dimostrata (Medrano *et al.*, 1988; Bernardi e Bernardi, 1990) una correlazione tra la presenza di un bandeggio intercalare e la specifica organizzazione del genoma in "compartimenti": le bande G e Q positive corrispondono alle isocore ricche percentualmente di AT e quelle R ad isocore ricche in GC (Aota e Ikemura, 1986).

A differenza delle bande strutturali, le bande dinamiche sono state evidenziate in tutti gli eucarioti studiati, compresi i pesci. Questa tecnica sfrutta le differenze temporali nella duplicazione del DNA tra diverse regioni cromosomiche. La comparsa delle bande è dovuta alla replicazione in tempi diversi del DNA nelle regioni a replicazione precoce e tardiva dei cromosomi. I patterns di bandeggio così ottenuti permettono un buon appaiamento dei cromosomi omologhi e il confronto con i bandeggi ottenuti utilizzando le altre tecniche.

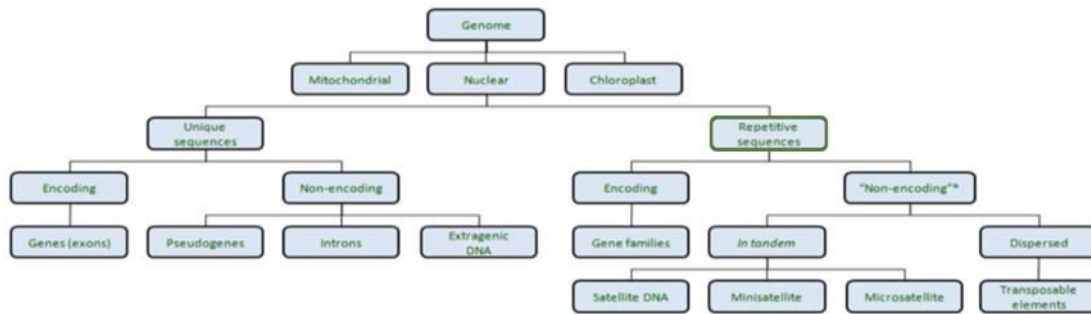
Per quanto riguarda le regioni eterocromatiche vediamo che l'eterocromatina rappresenta le regioni cromosomiche che generalmente rimangono condensate (con una colorazione più

intensa dell'eucromatina) attraverso tutto il ciclo cellulare, anche in interfase (Russel, 2007). Possiamo distinguere tra l'eterocromatina costitutiva e quella facoltativa. La prima è presente in tutte le cellule in posizione identica su entrambi i cromosomi omologhi, caratterizzata per la massima parte da DNA ripetuto e localizzata principalmente nelle regioni centromeriche. Quella facoltativa varia nei differenti tipi cellulari o nei diversi stadi dello sviluppo, o delle volte da un cromosoma omologo all'altro. Il coinvolgimento dell'eterocromatina costitutiva in eventi di evoluzione cromosomica è stato discusso in diversi studi, suggerendo che queste regioni si comportino come hotspots che favoriscono riarrangiamenti cromosomici strutturali (Louzada *et al.*, 2008; Ventura *et al.*, 2009). Le tecniche che permettono la localizzazione e caratterizzazione dell'eterocromatina costitutiva sono il bandeggio C, che mette in evidenza tutte le regioni eterocromatiche; il bandeggio con endonucleasi di restrizione e la colorazione con fluorocromi, che differenziano sottoclassi di eterocromatina in base a peculiari caratteristiche composizionali. Il bandeggio C è il metodo più usato per la localizzazione dell'eterocromatina costitutiva, ma non per quella facoltativa. In questo tipo di bandeggio le preparazioni cromosomiche vengono trattate con un acido diluito, con alcali (idrossido di bario), con una soluzione salina a caldo e successivamente colorate con il colorante Giemsa (Sumner, 1990). Il meccanismo di azione non è ancora noto; probabilmente in corrispondenza delle regioni eucromatiche il DNA viene denaturato e successivamente estratto dal trattamento, queste regioni sono infatti poco colorabili e corrispondono alle bande chiare, mentre le regioni eterocromatiche, essendo il DNA altamente ripetuto e meno facilmente estraibile a causa di un legame più stretto alle proteine e di una maggiore compattazione, sono fortemente colorabili e visibili come bande scure.

### ***Il DNA ripetitivo***

La presenza di una grande quantità di sequenze ripetute è una caratteristica comune del genoma degli Eucarioti. Queste sequenze sono caratterizzate da un'alta variabilità e costituite da famiglie di DNA ripetuto che rappresentano una componente sostanziale e in molti casi rappresentano più del 80% del contenuto di DNA delle cellule, mentre le sequenze in singola copia corrispondono approssimativamente al 2-10% del genoma dei vertebrati, mentre il restante genoma è composto da sequenze ripetute (Martins *et al.*, 2010). Il DNA ripetitivo consiste in sequenze, simili o identiche, che si trovano ripetute in tandem o disperse lungo tutto il genoma. Sebbene oggi sia noto che queste sequenze possano essere trascritte, per molto tempo sono state considerate non-codificanti e definite "DNA spazzatura" ("junk DNA"). Le sequenze non codificanti sono rappresentate dai satDNAs, i minisatelliti, i microsatelliti e gli elementi

trasponibili mentre la porzione codificante è costituita dalle famiglie multigeniche composte da centinaia di migliaia di copie, come quelle codificanti per gli istoni e per gli RNA ribosomiali (rRNA) (Kedes, 1979; Prokopowich, 2003; Nagoda *et al.*, 2005) (Figura 1).



**Figura 1:** Schema dell'organizzazione genomica negli Eucarioti (Martins *et al.*, 2010)

La classificazione delle sequenze ripetute organizzate in tandem si basa sulla dimensione dell'unità ripetuta e sulla dimensione del cluster di ripetizioni.

Il primo gruppo è rappresentato dal DNA satellite, composto da sequenze altamente ripetute, raggruppate in una o diverse posizioni lungo uno o più cromosomi e intervallate da sequenze a singola copia. Le unità ripetute vanno da 100 a 1.000 nucleotidi, che variano in struttura, posizione e quantità all'interno dei genomi (Martins *et al.*, 2010). Possono essere presenti nel genoma anche ripetizioni più lunghe (più di 4 kb), denominate DNA-megasatellite. Il DNA satellite rappresenta la componente principale dell'eterocromatina e si trova preferenzialmente nelle regioni pericentromeriche e telomeriche dei cromosomi (Martins *et al.*, 2010). I DNA satellite sono generalmente ricchi in AT e mostrano un'elevata variabilità in termini di dimensioni, sequenza nucleotidica, numero di copie e organizzazione nei cromosomi (Charlesworth *et al.*, 1994). Per quanto riguarda i pesci, la struttura e l'organizzazione del genoma sono generalmente poco conosciute e gli studi molecolari sui geni e sulle sequenze di DNA in questo gruppo animale sono principalmente correlati alle sequenze ripetute come i satelliti o il DNA ribosomiale (Martins e Wasko, 2004).

Di solito le famiglie di DNA satellite sono specie-specifiche (Arnheim, 1983). Tuttavia, ci sono alcune eccezioni in cui gruppi di specie condividono la stessa famiglia di DNA satellite, come osservato per il DNA satellite Alpha centromerico, che è conservato tra i Primati, probabilmente per via della sua funzione centromerica (Schueler *et al.*, 2001).

Nei cromosomi dei pesci, frazioni di DNA satellite sono state localizzate principalmente nelle regioni centromeriche. Una famiglia di DNA satellite, *HindIII*, isolata dal genoma dello storione *Acipenser naccarii*, è risultata conservata nelle regioni pericentromeriche in sei specie del

genere *Acipenser* e una del genere *Huso* (Lanfredi *et al.*, 2001). Frazioni di DNA satellite centromerico sono state inoltre isolate dal genoma del gobide *Gobius cobitis* (Canapa *et al.*, 2002) e della tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Ferreira e Martins, 2008). Inoltre, particolare attenzione è stata rivolta all'individuazione di frazioni di DNA satellite legati ai cromosomi sessuali e a quelli soprannumerari nei pesci. Sono stati isolati e mappati DNA satelliti nei cromosomi sessuali di diverse specie, come *Leporinus elongatus* (Nakayama *et al.*, 1994), *Chiondraco hamatus* (Capriglione *et al.*, 1994) *Poecilia reticulata* (Nanda *et al.*, 1990) e *Oncorhynchus tshawytscha* (Devlin *et al.*, 1991) (Stein *et al.*, 2001).

Il secondo gruppo è costituito dal DNA moderatamente ripetuto, con circa 10-100 bp, chiamate minisatelliti o sequenze con un numero variabile di ripetizioni (VNTR - numero variabile di ripetizioni in tandem) (Jeffreys *et al.*, 1985). Ciascun cluster di ripetizioni rappresenta un locus minisatellite, i cui alleli si distinguono per variazioni nella loro dimensione e che può essere utilizzato come marcatore genetico.

Un altro gruppo di DNA ripetuti in tandem è composto da ripetizioni brevi da 1 a 6 bp. Si tratta dei microsatelliti, ampiamente distribuiti nel genoma, altamente polimorfici e quindi utilizzati come marcatori in studi di genetica di popolazione, conservazione ed epidemiologia (Martins *et al.*, 2010). Tra le funzioni assegnate ai microsatelliti vi sono la loro partecipazione all'organizzazione della cromatina, la replicazione del DNA, la ricombinazione e la regolazione delle attività geniche (Li *et al.*, 2002).

Tra le porzioni non codificanti troviamo infine gli elementi trasponibili (TE). Questi si differenziano dalle altre sequenze del genoma per avere la capacità di muoversi all'interno del genoma (Kazazian, 2004). I TE vengono rimossi da un sito e inseriti in un altro, oppure vengono duplicati prima di essere trasportati in una nuova posizione, aumentando così il numero di inserimenti nel genoma (Wicker *et al.*, 2007).

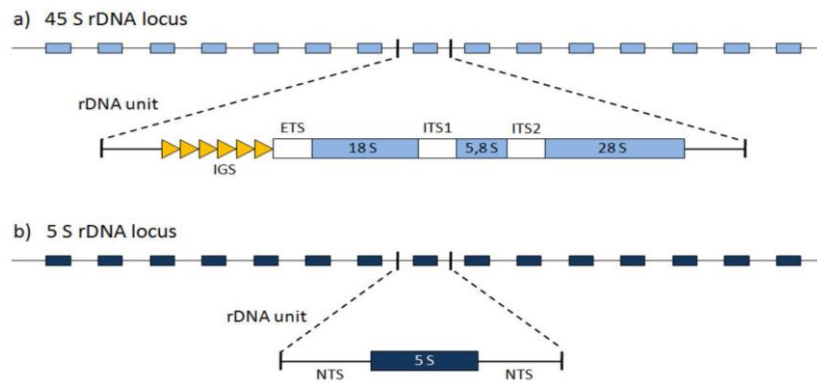
I DNA ripetuti rappresentano degli ottimi marcatori cromosomici, molto utili negli studi sulla struttura cromosomica, e identificazione, evoluzione e funzione di riarrangiamenti cromosomici, cromosomi soprannumerari e cromosomi sessuali (Goldman *et al.*, 1984) (Cabral-de-Mello *et al.*, 2010) (Gross *et al.*, 2009) (Nakamura, 2009). L'ampia variazione nella dimensione del genoma riportata per gli Eucarioti, è attribuibile per lo più all'accumulo di sequenze ripetute. Il DNA ripetuto potrebbe variare tra specie senza alcuna evidente relazione con la complessità dell'organismo, il numero di geni o il livello di ploidia (Gregory *et al.*, 2007). I processi di accumulo comportano un aumento del DNA ripetuto attraverso la conversione genica e il crossing-over ineguale (Kidwell, 2005).

### ***I geni ribosomiali***

Le famiglie multigeniche corrispondono a elementi strutturali comuni dei genomi degli Eucarioti e sono definite come un set di geni derivati dalla duplicazione di un gene ancestrale. Vengono frequentemente trovate in stretto collegamento tra loro e hanno funzioni simili o sovrapposte. Gli studi sui geni ribosomiali stanno guadagnando importanza in un ampio range di animali e piante, specialmente per la caratterizzazione di specie o popolazioni correlate, le relazioni evolutive e l'espressione genica (Martins e Wasko, 2004). L'RNA ribosomiale è l'RNA più abbondante presente nelle cellule e costituisce approssimativamente l'80% del RNA totale nelle cellule in divisione. Gli rRNA rappresentano i prodotti genici finali, e svolgono funzioni strutturali e catalitiche e formano la struttura di base delle subunità ribosomiali maggiore e minore che catalizzano la sintesi delle proteine cellulari.

Negli eucarioti superiori, i geni ribosomiali sono associati in uno o più clusters sui cromosomi, a livello delle regioni organizzatrici nucleolari (NOR) e organizzati in due distinte famiglie multigeniche, composte da centinaia di migliaia di copie: la famiglia genica ribosomiale maggiore (rDNA 45S) e la famiglia genica ribosomiale minore (rDNA 5S). L' rDNA 45S contiene i geni che codificano per il 18S, il 5,8S e il 26S-28S (Long e Dawid, 1980), separati da spaziatori trascritti (ETS, external transcribed spacer e ITS, internal transcribed spacer) e fiancheggiati da spaziatori intergenici (IGS) meno conservati (Eickbush e Eickbush, 2007) (Figura 2). La famiglia genica ribosomiale minore codifica invece per l'rRNA 5S, che consiste in copie multiple di una sequenza codificante altamente conservata di 120 paia di basi (bp), separate l'una dall'altra da uno spaziatore variabile non-trascritto (NTS, non-transcribed spacer) (Long e Dawid, 1980) (Figura 2). Gli rRNA 18S, 5,8S e 26S-28S sono trascritti dall'RNA polimerasi I sotto forma di rRNA 45S. L'rRNA 45S, prima di allontanarsi dal nucleo, viene tagliato andando a formare una copia di rRNA 28S (circa 5000 nucleotidi), una di rRNA 18S (circa 2000 nucleotidi) e una di rRNA 5,8S (circa 160 nucleotidi). Successivamente questi rRNA vengono parzialmente assemblati a formare la subunità ribosomiale, nei nucleoli. L'rRNA 5S viene trascritto separatamente ed entra nei nucleoli per partecipare all'assemblaggio della subunità ribosomiale maggiore. I suoi geni sono trascritti dall'rRNA polimerasi III e contengono 120 copie di nucleotidi.

La sequenza nucleotidica e il pattern di mappaggio di queste due famiglie multigeniche ha contribuito alla comprensione della struttura, organizzazione ed evoluzione dei genomi (Martins e Wasko, 2004).



**Figura 2:** Organizzazione dei geni ribosomiali negli Eucarioti (Martins *et al.*, 2010).

L'RNA ribosomiale viene trascritto e processato nel nucleolo che si forma durante la telofase in stretta associazione con la regione organizzatrice nucleolare. Questa regione, descritta per la prima volta da Heitz (1931) e McClintock (1934), è il sito cromosomico di trascrizione dell'rRNA 45S e del parziale assemblamento delle unità ribosomiali all'interno del nucleolo stesso.

Una cellula eucariotica superiore in crescita deve sintetizzare circa dieci milioni di copie di ciascun tipo di molecola di RNA ribosomiale per generazione per poter costruire i suoi dieci milioni di ribosomi. Gli rRNA che compongono i ribosomi sono il prodotto finale del gene e la cellula non ha modo di amplificarne la sintesi mediante la ripetuta traduzione di una stessa molecola di mRNA, così come avviene per le proteine. La presenza di copie multiple dei geni per gli rRNA e la loro continua trascrizione assicura alla cellula una produzione adeguata di rRNA che vengono immediatamente compattati con le proteine ribosomiali a formare i ribosomi. Il numero di copie ripetute per genoma varia da diverse centinaia in alcune specie di mammiferi a diverse migliaia in alcune specie di piante. Questo è stato dimostrato direttamente mediante ibridazione *in situ* isotopica di sonde di rRNA o rDNA su cromosomi fissati di molte specie di Vertebrati, tra cui *Xenopus*, uomo, scimpanzé e alcune specie di Anfibi (Long e Dawid, 1980) (King *et al.*, 1990). Le cellule umane contengono circa 200 copie di geni per gli rRNA per genoma aploide, distribuite su cinque cromosomi, mentre le cellule dell'Anfibio *Xenopus* contengono circa 600 copie di geni per genoma aploide in un singolo cromosoma (Evans *et al.*, 1974). Il numero di nucleoli è, in generale, correlato al numero di NOR ed è caratteristico del genoma, infatti il DNA di diversi tessuti contiene generalmente la stessa quantità di geni ribosomiali.

La composizione in basi dell'rDNA è variabile da specie a specie. In molti eucarioti tale DNA è particolarmente ricco in GC e la ragione potrebbe risiedere nel fatto che un alto contenuto in

G+C contribuisce ad elevare il numero di legami idrogeno e di conseguenza assicura una particolare stabilità strutturale e termica alle molecole ribosomiali. In altre specie tali geni appaiono invece ricchi in AT.

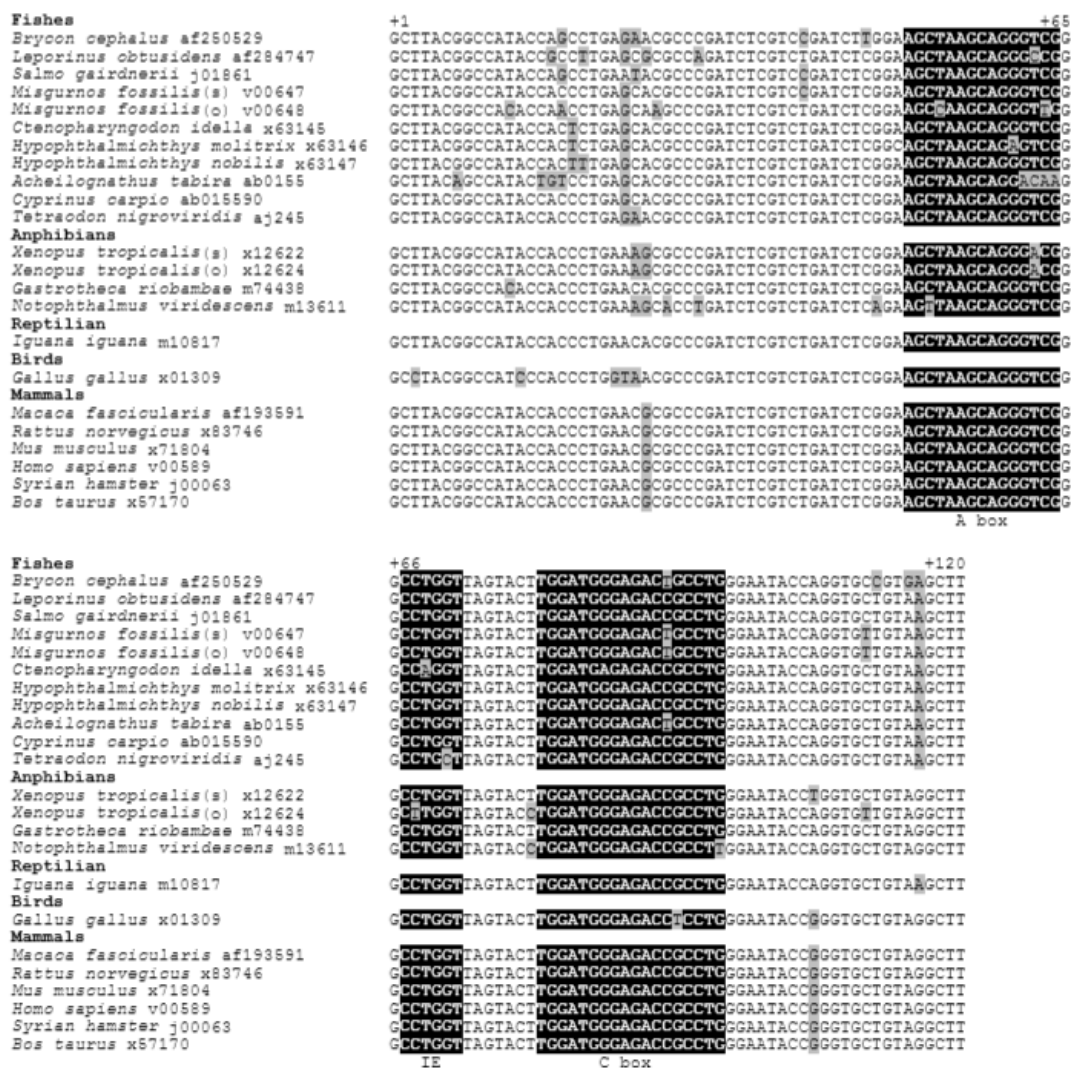
I geni codificanti per l'rRNA 45S rappresentano porzioni del genoma altamente conservate nel corso dell'evoluzione, motivo per cui gli è stato attribuito spesso il ruolo di cronometro molecolare, estremamente utile per risalire all'origine dei principali taxa; inoltre, lo studio delle regioni non trascritte, che sono invece a più rapida evoluzione, ha permesso di compiere notevoli passi avanti nella comprensione dei rapporti filogenetici tra specie più o meno correlate (Sogin *et al.*, 1993). La caratterizzazione della regione organizzatrice nucleolare (NOR) è quindi una tappa essenziale nell'analisi cariotipica di una specie.

I geni nucleari ribosomiali 5S degli eucarioti sono relativamente indipendenti dagli altri geni ribosomiali, anche se in alcune specie possono essere correlati. Il diverso raggruppamento delle porzioni di rDNA 45S e 5S, osservato nella maggior parte delle piante e degli animali, potrebbe facilitare il lavoro delle differenti RNA polimerasi così come l'evoluzione indipendente delle loro ripetizioni. D'altra parte, le famiglie multigeniche ribosomiali possono anche assumere un'organizzazione collegata nel genoma di diverse specie. In diversi funghi, che includono specie di Ascomiceti, Basidiomiceti, Zigomiceti e una specie di Oomiceti, i geni per gli rRNA 5S sono incorporati in uno spaziatore non trascritto del rDNA 45S (Belkhiri *et al.*, 1992), mentre in altri funghi come *Neurospora crassa* le copie dei geni rRNA 5S sono disperse lungo tutto il genoma e non sono legate al rDNA 45S. Attualmente, i geni per l'rRNA 5S sono stati trovati legati al DNA ribosomiale 45S anche in diverse specie di eucarioti superiori, come nematodi o artropodi. Inoltre, l'rDNA 5S si può legare durante l'evoluzione ad altre famiglie multigeniche, come le trans-spliced leader (TSL) o le famiglie multigeniche istoniche (Drouin e De Sa, 1995). In generale, una quantità considerevole di informazioni sull'organizzazione strutturale e funzionale dei geni ribosomiali del 5S è stata ottenuta per piante (Hanson *et al.*, 1996; Adachi *et al.*, 1997), mammiferi (Leah *et al.*, 1990) (Suzuki *et al.*, 1994), e alcune specie di anfibi (Vitelli *et al.*, 1982). Il numero di copie di geni rRNA 5S varia da 100 a 300000, numero solitamente più alto di quello dei geni 45S (Hadjiolov, 1985).

Negli Eucarioti Superiori, l'evoluzione sembra aver portato a dei riarrangiamenti dei geni rRNA 5S (Martins e Wasko, 2004). Le ricerche sul database DDBJ-EMBL-GenBank hanno identificato piccole divergenze tra le sequenze geniche del rRNA 5S tra taxa relazionati. I pesci, per esempio, condividono una somiglianza media del 95% nei loro geni rRNA 5S. D'altra parte, relazioni scarse o nulle sono solitamente stabilite tra NTS di diverse specie, suggerendo che questa regione spaziatrice evolve rapidamente. Anche tra specie strettamente correlate (per

esempio dello stesso genere), sono state rilevate differenze significative nei loro NTS. Gli NTS sembrano essere governati da un intenso meccanismo di evoluzione, che rende questa regione un importante fonte d'informazioni riguardanti l'organizzazione e l'evoluzione delle famiglie multigeniche e dei genomi e anche un utile marker per tracciare eventi evolutivi recenti (Cesar Martins & Wasko, 2004).

La sequenza genica del rRNA 5S contiene delle regioni di controllo interno (ICRs) che risultano attive come promotrici della trascrizione. L' A box è una sequenza ICR generale per l'RNA polimerasi III. L'elemento intermedio (IE) e la C box sono specifiche per la trascrizione dell'rRNA 5S e lavorano come siti di legame per la trascrizione del fattore TFIIIA. Il legame del fattore TFIIIA al gene rRNA 5S è il primo step nella formazione del complesso dell'iniziazione della trascrizione.



**Figura 3:** Sequenze geniche per gli rRNA 5S allineate provenienti da pesci, anfibi, rettili, uccelli e mammiferi ottenute dalle sequenze nucleotidiche del database disponibili nel sito web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Il punto di partenza della trascrizione è indicato da +1, le sostituzioni nucleotidiche sono indicate in grigio chiaro e le

regioni di controllo interno (A box, IE e C box) sono indicate in nero. I nomi delle specie in oggetto sono indicati a sinistra, seguiti dalle voci di accesso GenBank. (s) sta per gene rRNA 5S di tipo somatico e (o) sta per gene rRNA 5S di tipo oocitico (Martins e Wasko, 2004).

Comparazioni tra sequenze nucleotidiche allineate del gene rRNA 5S provenienti da diversi vertebrati hanno rivelato un totale di 38 siti polimorfici che sono principalmente presenti fuori dalla regione ICR, all'inizio e alla fine del gene (Figura 3). La regione ICR è risultata abbastanza conservata tra le sequenze analizzate con solo qualche rara sostituzione di qualche base. Sebbene i siti polimorfici non siano informativi per distinguere pesci, anfibi, rettili, uccelli e mammiferi, si è tentato di effettuare una ricostruzione filogenetica sulla storia dei vertebrati, basata sulle sequenze geniche del rRNA 5S disponibili. Tuttavia, le relazioni tra i vari gruppi di vertebrati non sono chiare. Pare che il gene rRNA 5S non rappresenti un buon candidato per le filogenesi, dovuto alla sua elevata conservazione nucleotidica e alla sua piccola taglia (solo 120 paia di basi). Sebbene alcuni studi hanno considerato utili le sequenze nucleotidiche dello spaziatore non-trascritto del rDNA 5S come marker filogenetico o di popolazione (Suzuki *et al.*, 1994) (Pendas *et al.*, 1995) (Baker *et al.*, 2000), dovrebbe essere esercitata un'attenzione speciale, principalmente nelle interpretazioni filogenetiche, al fatto che la famiglia del rDNA 5S mostri una complessa organizzazione con la presenza di copie paraloghe nel genoma (Martins e Wasko, 2004).

Sebbene le sequenze di DNA non-trascritte come gli NTS sembrino non avere alcuna funzione, è stato recentemente dimostrato che la presenza di elementi conservati localizzati all'interno del NTS, giochino anche un importante ruolo nella regolazione dell'espressione genica del rRNA 5S nei mammiferi. Tra questi ultimi, una sequenza conservata chiamata D box, localizzata all'interno del NTS, pare stimoli la trascrizione fino a 10 volte (Hallenberg e Frederiksen, 2001). Altre sequenze del NTS, come i motivi TATA, agiscono come promotrici che dirigono la trascrizione di un grande sottoinsieme di geni codificanti proteine negli eucarioti. Una sequenza TATA-like è stata osservata a monte del gene rRNA 5S in diversi pesci, come in *Salmo salar* (Pendás *et al.*, 1994), *Carassius auratus* (Murakami e Fujitani, 1998), *Coregonus* (Sajdak *et al.*, 1998), *Gasterosteus aculeatus* (Rocco *et al.*, 1999), *Acheilognathus tabira*, *Cyprinus carpio* (Inafuku *et al.*, 2000), *Oreochromis niloticus* (Martins *et al.*, 2000), *Brycon* (Wasko *et al.*, 2001) and *Leporinus* (Martins e Galetti, 2001a) suggerendo una possibile influenza nei livelli di trascrizione di questo gene. Un gene eucariotico funzionale per l'rRNA 5S richiede anche un terminatore di sequenza composto da almeno quattro residui di timidina, come evidenziato in *Xenopus* (Korn e Brown, 1978). Una coda T-ricca, identificata nelle posizioni da +119 a +122, è stata osservata anche in diverse specie di pesci. Oltre alle regioni T-ricche

che segnalano la fine del gene, è stato possibile rilevare altre regioni conservate (GAAACAA) a valle del gene in alcune specie di pesci.

I dati sugli NTS delle diverse specie di pesci hanno mostrato che la minima lunghezza degli NTS descritti per questi organismi è di 60-80 bp. Questi corti NTS sembrano essere la condizione minima necessaria per il mantenimento di questi schieramenti e per la corretta dinamica dei geni 5S nel genoma dei pesci, dato che essi possono contenere sequenze richieste nell'espressione e regolazione dei geni per l'rRNA 5S (Martins e Wasko, 2004). Per quanto riguarda l'organizzazione delle ripetizioni in tandem del rDNA 5S, una struttura ripetuta che consiste in due differenti tipi di ripetizioni del rDNA 5S è stata riportata per i mammiferi (Hallenberg e Frederiksen, 1994; Jensen e Frederiksen, 2000) e una situazione simile è stata anche descritta per diverse specie di pesci come *Salmo salar* (Pendás *et al.*, 1994), *Oncorhynchus mykiss* (Moran *et al.*, 1996), il genere *Coregonus* (Sajdak *et al.*, 1998), e il genere *Brycon* (Wasko *et al.*, 2001), già accennati sopra. Uno studio dettagliato condotto in diverse specie di pesci sud americani del genere *Leporinus* (Martins e Galetti, 2001a) ha chiaramente evidenziato e caratterizzato due diverse classi di rDNA 5S, ciascuna di diversa taglia e caratterizzata da distinte sequenze NTS, poche sostituzioni di singole basi nella porzione genica 5S, e clusterizzata in distinte coppie cromosomiche. Una situazione simile è stata riscontrata nel pesce ciclode *O. niloticus*, dove sono state identificate due distinte unità rDNA 5S, designate come rDNA 5S di tipo I e di tipo II caratterizzate da un distinto NTS che varia in sequenza nucleotidica e in lunghezza tra i *loci*. Inoltre, un presunto pseudogene rRNA 5S invertito e una sequenza genica di rDNA 5S invertita è stata rilevata all'interno dell'rDNA 5S di tipo I. Le varianti di rDNA 5S e i pseudogeni sembrano essere comuni nei mammiferi (Hallenberg e Frederiksen, 1994) mentre tra i pesci sono stati descritti solo in due specie (Murakami e Fujitani, 1998; Martins e Galetti, 2001a; Martins *et al.*, 2003). Gli pseudogeni sono una conseguenza della duplicazione genica che può verificarsi fondamentalmente in due differenti modi: o dalla trasposizione o dalla duplicazione del DNA per via genomica (Mighell *et al.*, 2000).

È stata inoltre descritta, per diversi animali, la presenza di due principali famiglie geniche rRNA 5S, diversamente espresse negli oociti e nelle cellule somatiche (Komiya *et al.*, 1986). Questo sistema doppio è ben conosciuto negli anfibi (Krämer, 1985). Sebbene questi rDNA 5S presentino un'evidente somiglianza nella sequenza della regione codificante, i loro NTS sono nettamente diversi. In *Xenopus leavis* per esempio, l'unità dell'oocita è di circa 750 bp e include le 120 bp del gene rRNA 5S, uno spaziatore non-trascritto e uno pseudogene, mentre l'unità delle cellule somatiche è approssimativamente di 880 bp e non contiene pseudogeni (Komiya *et al.*, 1986). I geni rRNA 5S espressi negli oociti e nelle cellule somatiche, che differiscono in

poche posizioni nucleotidiche, sono stati anche identificati nel pesce teleoste *Tinca Tinca* (Dennis e Wegnez, 1977) e in *Misgurnus fossilis* (Mashkova *et al.*, 1981).

I dati presenti sulle specie di pesci suggeriscono che la presenza di due diversi tipi di rDNA 5S potrebbe essere una caratteristica comune in questo gruppo di vertebrati. Sebbene i geni rRNA 5S somatici e oocitici, siano stati descritti solo per due specie di pesci, le due classi di rDNA 5S osservate per diversi pesci sembrano essere correlate a questo sistema dualistico, e sembrano rappresentare copie paraloghe del gene rRNA 5S che potrebbe essersi evoluto in regioni separate del genoma. I due diversi tipi di ripetizioni in tandem sono state osservate per diversi Caraciformi (Martins e Galetti, 2001a; Martins e Galetti, 2001b; Wasko *et al.*, 2001), Perciformi (Martins *et al.*, 2000), Salmoniformi (Pendás *et al.*, 1994) (Moran *et al.*, 1996), e Cipriniformi (Gornung *et al.*, 2000). Per quanto riguarda l'evoluzione delle ripetizioni in tandem del rDNA 5S, vediamo come la natura di queste ripetizioni sia governata da un particolare pattern evolutivo come lo scambio ineguale, la trasposizione, la trasposizione mediata da RNA e la conversione genica che conducono ad una co-evoluzione di tutti i membri delle famiglie multigeniche. Questo fenomeno, conosciuto come evoluzione concertata (Arnheim, 1983), impedisce un'evoluzione indipendente di ciascun membro delle famiglie multigeniche, mantenendo un alto grado di omologia tra copie duplicate. Il meccanismo che agisce nell'evoluzione concertata è stato chiamato "molecular drive" (impulso/spinta molecolare) (Dover, 1989). Sebbene esistano diversi meccanismi che sono stati proposti per guidare l'omogeneità tra le famiglie geniche, la conversione genica e lo scambio ineguale sono i maggiori contribuenti del "molecular drive", dal momento che è stato provato che si verificano sia in meiosi che in mitosi (Crease e Lynch, 1991). Lo scambio ineguale si verifica quando non c'è un completo allineamento tra due cromosomi. Un cromosoma guadagnerà materiale genetico extra mentre l'altro perderà DNA. Quando si verifica una mutazione in un membro di una famiglia multigenica, le varianti possono essere perse o mantenute. Se la variazione non viene perduta, lo scambio ineguale può incrementare il numero di copie di questa variante nella famiglia multigenica. Questo nuovo membro della famiglia multigenica può diffondersi attraverso la popolazione in diversi modi evolutivi come per esempio la selezione naturale, la deriva genetica, la migrazione e l'effetto collo di bottiglia. La mutazione può anche essere persa o diffusa dalla conversione genica, processo che inizia da due copie geniche leggermente differenti e finisce con due copie identiche. Di fatto, un gene può essere convertito in un altro gene.

Recenti studi sull'organizzazione delle ripetizioni in tandem del rDNA 5S nel genoma dei pesci, vanno a favore dell'evoluzione concertata per i membri delle famiglie multigeniche in questo gruppo.

### ***Tecniche di studio citogenetico dei geni ribosomiali***

Attualmente vengono utilizzate tre tecniche per lo studio e localizzazione cromosomica della regione organizzatrice nucleolare: l'impregnazione argentea, la colorazione con la cromomicina A<sub>3</sub> e l'ibridazione *in situ* in fluorescenza.

L'impregnazione argentea è una tecnica che colora specificamente il nucleolo nei nuclei in interfase e il NOR sui cromosomi metafasici (Goodpasture e Bloom, 1975; Howell *et al.*, 1975; Schwarzscher *et al.*, 1978) in relazione all'attività trascrizionale. Queste regioni, dopo colorazione dei cromosomi metafasici con Giemsa, Feulgen o orceina, appaiono generalmente meno colorabili del resto del cromosoma e talvolta riconoscibili come costrizioni secondarie. La colorazione delle regioni organizzatrici nucleolari mediante impregnazione argentea avviene per riduzione del nitrato d'argento ad argento metallico che in questa forma precipita in quantità sufficiente da rendere visibile il NOR. È probabile che i substrati e i gruppi chimici che realizzano questa reazione siano identificabili con fosfoproteine oppure gruppi carbossilici o sulfidrilici di proteine non istoniche; non è coinvolto in alcun modo un legame diretto con il DNA. È stato infatti chiaramente dimostrato che i siti colorati con argento non si trovano nella cromatina ma ai lati dei cromatidi. L'impregnazione argentea non rivela tutti i siti cromosomici che contengono geni per l'rRNA ma è un indicatore dell'attività genica. Infatti, solo quei geni attivamente trascritti nell'interfase precedente la mitosi, sono rivelati da questa tecnica perché le proteine trascritttrici rimangono associate al NOR sebbene durante la mitosi la sintesi di rRNA cessa ed il nucleolo scompare.

La Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) è un antibiotico che presenta la caratteristica di legarsi alle regioni cromosomiche ricche in citosina e guanina producendo un modello di bande fluorescenti. In pesci, anfibi ed altri organismi la CMA<sub>3</sub> produce una brillante banda fluorescente in corrispondenza della regione organizzatrice del nucleolo. La CMA<sub>3</sub> si lega preferenzialmente al DNA a doppia elica piuttosto che a catena singola o all'RNA e si intercala al DNA, inserendosi nel solco minore. Non si conosce con esattezza a quale componente della regione organizzatrice del nucleolo si leghi la CMA<sub>3</sub> (sequenze codificanti, sequenze spaziatrici o eterocromatina associata al NOR), ma l'importanza di questa colorazione è dovuta al fatto che mette in evidenza il NOR indipendentemente dall'attività genica e dallo stadio cromosomico.

La tecnica dell'ibridazione *in situ*, utilizzando la proprietà di appaiamento tra sequenze complementari di DNA anche di diversa origine, permette la localizzazione diretta e inequivocabile di tutti i geni ribosomiali, indipendentemente dalla attività trascrizionale. Frammenti di DNA marcati (sonde) contenenti le sequenze ribosomiali vengono ibridati sul DNA cellulare per formare ibridi stabili.

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) è una metodologia attualmente molto utilizzata e la sua introduzione, più di trenta anni fa, segna l'inizio di una nuova era per gli studi sulla struttura dei cromosomi. I maggiori progressi nella citogenetica si sono avuti negli ultimi decenni proprio con l'applicazione dell'ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) che rappresenta la transizione dall'era della citogenetica classica all'era della citogenetica molecolare, un approccio che ha permesso di avere nuove informazioni su come il DNA è organizzato e disposto nei cromosomi. La FISH infatti permette di visualizzare, fisicamente, a livello cromosomico una qualsiasi sequenza genomica d'interesse, come sequenze di DNA ripetute, geni in singola copia o intere famiglie geniche. Generalmente, l'ibridazione può essere attuata su supporti solidi, in soluzione e su sezioni di tessuto o preparazioni cellulari (*in situ*). L'ibridazione su acidi nucleici purificati e legati a membrane consente l'identificazione di differenti classi di DNA e RNA, ma ci dice poco riguardo alla distribuzione e localizzazione di sequenze specifiche in singole cellule. L'ibridazione *in situ*, invece, permette di localizzare direttamente sequenze specifiche di DNA o RNA in sezioni di tessuto, su singole cellule o su preparazioni cromosomiche.

I primi esperimenti di ibridazione *in situ* (ISH, *In situ* Hybridization) risalgono al 1969 e si devono a Mary L. Pardue e Joseph G. Gall della Yale University (Pardue e Gall, 1970); in particolare i due studiosi identificarono i geni amplificati codificanti l'RNA ribosomiale nei nucleoli dell'anfibio *Xenopus* usando sonde di rRNA della subunità 18S. Il loro metodo utilizzava sonde marcate con isotopi radioattivi (<sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I). Tramite un'emulsione fotografica posta direttamente sul vetrino era possibile rivelare la posizione della sonda sui cromosomi. Attualmente sono state messe a punto tecniche di marcatura degli acidi nucleici con molecole non radioattive.

In generale l'ibridazione *in situ*, indipendentemente dal metodo di marcatura della sonda, consiste di una serie comune di passaggi. Le piastre metafasiche allestite su vetrino vengono sottoposte ad alta temperatura o trattate con alcali per denaturare il DNA cromosomico. In seguito si incubano le mitosi con una soluzione (miscela di ibridazione) contenente la sonda, anch'essa precedentemente denaturata, ad una temperatura che permetta la rinaturazione delle eliche complementari. Si otterrà così l'ibridazione, cioè la riassociazione delle sequenze della

sonda con le regioni omologhe sui cromosomi (sequenze bersaglio); non tutte le molecole della sonda ibridano col sito bersaglio, l'eccesso di sonda non legata viene rimossa mediante lavaggio.

A questo punto si possono evidenziare le regioni cromosomiche ibridate utilizzando metodi specifici per il tipo di marcatura utilizzato.

Sempre più spesso vengono utilizzate sonde non isotopiche. In particolare, l'ibridazione *in situ* con sistemi fluorescenti (FISH= Fluorescence *In situ* Hybridization) è il metodo che ha il miglior potere risolutivo, elevata sensibilità, versatilità e rapidità di esecuzione. La FISH consente di operare con grande precisione, per cui non è necessario esaminare un gran numero di metafasi; inoltre, a differenza delle metodiche che utilizzano sonde radioattive, non è necessaria una analisi statistica dei dati. Tutto ciò le ha consentito di diventare un efficace strumento in molte aree della ricerca biomedica.

Per quanto riguarda il metodo di marcatura delle sonde, possono essere utilizzati due tipi principali di metodiche: marcatura diretta, con attacco diretto della molecola del marcatore fluorescente al DNA o RNA, oppure indiretta, in questo caso al DNA viene legato un aptene (es: biotina o digoxigenina) che viene rivelato da marcatore fluorescente che vi si lega (es: avidina fluorescina o rodaminata); altrimenti si può rivelare l'ibrido sonda-bersaglio utilizzando un anticorpo specifico.

Molto usati sono i marcatori fluorescenti e tra questi largamente utilizzati sono la digoxigenina, uno steroide, e la biotina, una vitamina. Tra i marcatori non radioattivi spesso la biotina è preferita da molti studiosi, anche perché la sintesi del d-UTP marcato con biotina ha reso possibile la costruzione di acidi nucleici direttamente biotinilati.

In base alla specificità nei confronti delle basi nucleotidiche, si possono distinguere due diversi gruppi di fluorocromi: quelli che si legano specificamente alle basi AT (quinacrina, DAPI, e Hoechst 33258), e quelli che si legano specificamente alle basi GC (cromomicina A<sub>3</sub>, mitramicina e olivomicina).

Uno dei metodi più diffusi per il mappaggio dei geni sui cromosomi utilizza come sonda il DNA marcato con molecole di biotina e come sistema rilevatore l'avidina fluorescina, cioè coniugata con isotiocianato di fluorescina (FITC). L'avidina si lega con alta specificità alla biotina, con una affinità paragonabile a quella tra antigene e anticorpo, e l'isotiocianato di fluorescina quando viene eccitato con radiazione ultravioletta emette una fluorescenza giallo-verde.

Una delle tecniche più utilizzate per marcare il DNA è la nick translation (to nick= tagliare). La nick translation utilizza gli enzimi DNasi I e DNA polimerasi I per inserire nucleotidi marcati

nella sonda in modo casuale. La DNasi I è una endonucleasi che idrolizza mono- o oligonucleotidi da DNA a doppio o a singolo filamento lasciando libere le estremità terminali 5' fosfato. In presenza di  $Mg^{2+}$  questo enzima attacca indipendentemente ciascuno dei due filamenti della doppia elica dando come risultato piccole regioni di DNA a singola elica. La DNasi I crea cioè interruzioni a singola elica (nicks) nello scheletro del DNA. L'oloenzima polimerasi I ha tre differenti attività enzimatiche: polimerasi 5'3', esonucleasi 5'3', esonucleasi 3'5'. Quando nella molecola di DNA è presente una zona a singolo filamento, l'attività esonucleasica della polimerasi I inizia a idrolizzare il frammento a partire dall'estremità 5' in direzione 5'3'. Nello stesso tempo l'attività polimerasica dello stesso enzima incorpora in sequenza residui nucleotidici nella stessa direzione, legandoli all'ossidrilico terminale in posizione 3'. Lo stesso frammento viene quindi degradato e contemporaneamente risintetizzato, nella stessa direzione (5'3'). Per l'attività polimerasica dell'enzima è necessaria la presenza di tutti e quattro i desossiribonucleosidi trifosfati. Se uno (o più) di questi è marcato (ad esempio desossitimidina marcata con biotina, bio d-UTP), i prodotti della reazione sono molecole di DNA marcate, risultanti dalla sostituzione dei residui nucleotidici originali con nucleotidi marcati. La frequenza dei tagli nella molecola di DNA può essere controllata variando la concentrazione di DNasi I nella miscela di reazione. Poiché la DNasi I inserisce "buchi" a singola elica in entrambi i filamenti di DNA in maniera virtualmente casuale, il probe risulta marcato in modo uniforme e completo.

L'ibridazione *in situ* fu inizialmente sfruttata in studi sul genoma umano per la individuazione di regioni cromosomiche contenenti segmenti di DNA amplificati (come il DNA satellite delle regioni centromeriche) e i geni codificanti per gli RNA ribosomiali. E' stato così possibile localizzare tali regioni utilizzando come sonda un singolo elemento ripetuto, o persino parte di esso e si è sfruttato il fatto che la regione bersaglio sui cromosomi è molto estesa.

La maggior parte dei geni è presente in singola copia per genoma aploide ed il loro trascritto maturo normalmente è lungo poche kilobasi; poiché la regione cromosomica è molto piccola, l'ibridazione di un gene a singola copia rischia di produrre sui cromosomi un segnale molto debole e di difficile individuazione. Questo problema è stato risolto amplificando il segnale: si espongono i cromosomi ibridati e trattati con avidina-FITC ad anticorpi anti-avidina, si trattano una seconda volta con avidina-FITC e si ripetono nuovamente gli ultimi due passaggi. Un numero molto maggiore di molecole di fluorescina sarà così legato alla sonda, ottenendo di conseguenza un'amplificazione del segnale. E' possibile ottenere un'analogha amplificazione del segnale anche con altri metodi di marcatura indiretti.

Uno degli importanti vantaggi dell'ibridazione *in situ* è il fatto che il grado di specificità delle reazioni d'ibridazione può essere controllato accuratamente variando le condizioni di reazione. Il grado di specificità dipende dalla costituzione della sonda, dalla temperatura, dal pH e dalla concentrazione di formammide e di sali nel tampone di ibridazione. La quantità di appaiamenti erronei che possono essere tollerati in una reazione d'ibridazione è detta "stringenza". Alla massima stringenza (alta temperatura e bassa concentrazione salina), l'ibridazione sarà stabile solamente se vi è un alto grado di omologia. Ad una bassa stringenza (reazioni condotte a bassa temperatura, alta concentrazione di sali o a bassa concentrazione di formammide), la sonda si potrà legare a bersagli con solo il 60-70% di omologia senza che la doppia elica si destabilizzi. E' possibile inoltre ottenere l'ibridazione contemporanea di più sonde sulla stessa piastra metafase; infatti possono essere utilizzate nello stesso esperimento sonde diverse marcate con fluorocromi con differente spettro di emissione e quindi visibili con un diverso colore; mediante l'analisi computerizzata dell'immagine osservata al microscopio a fluorescenza, si possono studiare i segnali d'ibridazione delle diverse sonde, visualizzati come regioni diversamente colorate (in realtà pseudocolori generati dal calcolatore).

Attualmente la FISH rappresenta una delle più valide tecniche per la localizzazione di geni (ed in generale di sequenze di DNA), il loro ordinamento sui cromosomi, lo studio della natura molecolare delle bande cromosomiche e l'analisi della struttura e dell'organizzazione del cromosoma metafase, come la distribuzione delle sequenze ripetute intersperse, centromeriche e telomeriche. Si può di conseguenza utilizzare come un approccio d'avanguardia nella comprensione della biologia e dell'evoluzione di molti organismi: grazie al grandissimo numero di informazioni che si possono ottenere si ha un'opportunità unica per la ricostruzione di rapporti filogenetici e per la comprensione di processi evolutivi.

### ***I telomeri***

In alcuni organismi i telomeri, sono coinvolti nella disposizione dei cromosomi durante l'interfase e nell'appaiamento dei cromosomi meiotici attraverso la loro interazione con la membrana nucleare; nel lievito e in molti altri organismi, si comportano come una forma di eterocromatina, inducendo un silenziamento genico nelle regioni adiacenti del cromosoma, anche quando non vi è eterocromatina citologicamente visibile.

I telomeri contengono specifiche sequenze di DNA conservate in una vasta gamma di organismi, anche se ci sono alcune eccezioni. Nei vertebrati la sequenza telomerica è costituita dall'esamero (TTAGGG)<sub>n</sub> altamente ripetuto (Meyne *et al.*, 1990), ma una varietà di altre brevi sequenze ripetute sono state trovate in altre specie.

Queste sequenze telomeriche non sono necessariamente limitate ai telomeri, ma possono anche essere trovate in blocchi di eterocromatina non-telomerici (Meyne *et al.*, 1990). Talvolta blocchi di sequenze ripetute (TTAGGG)<sub>n</sub> sono presenti nei siti dove sono avvenuti riarrangiamenti e fusioni cromosomiche, come nel cromosoma umano n°2, che è formato dalla fusione di due cromosomi, che sono separati in altri primati.

Considerando che i cromosomi dei procarioti sono circolari e quelli degli eucarioti sono lineari, le loro estremità, i telomeri, hanno proprietà speciali. Molti anni fa era stato riconosciuto che le estremità dei cromosomi si comportano in modo diverso dalle estremità appena formate prodotte da rotture cromosomiche dopo trattamento con radiazioni o sostanze chimiche clastogeniche. Le estremità di nuova formazione sono "appiccicose" e volentieri si uniscono ad eventuali altri pezzi simili nella cellula, mentre le estremità cromosomiche consolidate non si attaccano le une alle altre o alle estremità appena rotte. Pertanto, è chiaro che si tratti di particolari strutture di protezione poste alle estremità dei cromosomi.

Quando il meccanismo di replicazione del DNA è stato scoperto, è divenuto chiaro che con tale meccanismo, sarebbe impossibile replicare la molecola fino alla fine su entrambi i filamenti e che pertanto ci debba essere qualche meccanismo speciale per la replicazione dei telomeri. Tale meccanismo è stato trovato, ed è stato rivelato che ha delle importanti implicazioni per la senescenza e l'immortalizzazione delle cellule, portando a possibili meccanismi per il controllo dei tumori. I convenzionali processi di replicazione del DNA non possono replicare la fine del filamento ritardato di una molecola di DNA, e altri metodi sono quindi necessari per assicurare che le estremità dei cromosomi non si accorcino indefinitamente. Tre sono i metodi che sono stati identificati: la sintesi del DNA utilizzando telomerasi, la ricombinazione e la retrotrasposizione. Tutti gli organismi in cui i telomeri sono costituiti da brevi sequenze altamente ripetute sembrano replicare usando telomerasi. Le telomerasi consistono di una trascrittasi inversa e uno stampo di RNA complementare alla sequenza del filamento telomerico G-ricco, e utilizzano questo modello per sintetizzare nuovo DNA telomerico sulle estremità della molecola esistente (Sumner, 2003). Le telomerasi non sembrano richiedere una specifica sequenza di DNA da cui partire per sintetizzare nuove ripetizioni telomeriche, ma la sequenza deve essere comunque G-ricca. La telomerasi non può legarsi a una molecola di DNA a doppio filamento conclusa, ma ha bisogno di una molecola a singolo filamento di almeno 4-6 nucleotidi. Sorprendentemente, per il fatto che i telomeri non sono riconosciuti dalla cellula come interruzioni di DNA a doppio filamento, più proteine sono coinvolte nel processo per il mantenimento dei telomeri (Sumner, 2003).

Esistono dunque dei meccanismi per garantire che le estremità dei cromosomi non diventino progressivamente più corte a causa della mancanza di replicazione alle estremità delle molecole di DNA. È anche chiaro che i telomeri differiscono dalle semplici estremità rotte definite "appiccicose" e non vengono riconosciuti dalla cellula come interruzioni di DNA a doppio filamento, dunque non fanno scattare blocchi del ciclo cellulare e non sono soggetti a meccanismi di riparazione del DNA come la degradazione da parte di nucleasi. La cromatina telomerica deve quindi avere una struttura particolare che la differenzia dalla cromatina ordinaria (Sumner, 2003).

### ***Una tecnica di studio citogenetico dei telomeri***

Gli acidi nucleici peptidici (PNA) sono stati introdotti da Nielsen e Egholm (1999). Essi costituiscono una nuova classe di sonde di DNA che forniscono un'interessante complemento per l'ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) e l'ibridazione *in situ* adattata (PRINS) nel campo della citogenetica molecolare. I PNA sono imitazioni sintetiche del DNA in cui la struttura di fosfato desossiribosio che sostiene le basi azotate viene sostituita da una struttura peptidica mentre la composizione chimica unica di queste molecole conferisce loro una serie di proprietà benefiche, compresi alti tassi d'ibridazione, resistenza alle nucleasi e proteasi e capacità di penetrare in strutture biologiche condensate (Nielsen e Egholm, 1999). La struttura neutrale dei PNA prevede un legame forte tra filamenti di PNA-DNA o PNA-RNA e una maggiore specificità d'interazione rispetto alle controparti del DNA. È stato infatti dimostrato che i PNA sono in grado di legarsi a bersagli di DNA o RNA con maggiore affinità rispetto agli oligonucleotidi corrispondenti. Questo alto livello di discriminazione a livello di una singola base indica che brevi sonde di PNA sono in grado di offrire un'elevata specificità e hanno così permesso un ulteriore sviluppo di varie strategie, basate sul PNA, per le indagini e le diagnosi molecolari (Ray e Nordén, 2000). Brevi oligomeri di PNA (da 17 a 22 unità di base) costituiscono strumenti efficaci per la rilevazione di specifiche sequenze di DNA con una cinetica d'ibridazione molto veloce. Le proprietà uniche delle sonde PNA, che simulano il DNA, hanno portato allo sviluppo di numerose applicazioni. In particolare, i PNA hanno trovato applicazioni in tecniche di biologia molecolare come sonde specifiche e sensibili per gli acidi nucleici complementari (Nielsen e Egholm, 1999). La tecnologia dei PNA è stata introdotta di recente in citogenetica. Inizialmente si era dimostrato che le sonde PNA erano utili per rivelare sequenze ripetute di telomeri (Lansdorp *et al.*, 1996). Poi la disponibilità di sonde centromeriche cromosoma-specifiche, con PNA direttamente marcati con fluorocromi, ha portato allo sviluppo di rapidi e facili protocolli per il rilevamento *in situ* e la numerazione dei

cromosomi umani in metafase e nei nuclei interfasicci (Taneja *et al.*, 2001). Questa procedura è stata recentemente adattata ai blastomeri e ai gameti umani (Pellestor *et al.*, 2003; Paulasova *et al.*, 2004) aprendo nuove e promettenti strade per i PNA nel campo della diagnosi genetica.

## ***Le specie oggetto di studio***

### ***Caratteristiche generali dei murenidi***

Le murene sono un gruppo di organismi scarsamente studiati rispetto alla loro storia evolutiva, nonostante siano tra i più diffusi e comuni pesci di barriera.

La famiglia Muraenidae è tassonomicamente posta all'interno dell'ordine Anguilliformes, un taxon fratello degli altri pesci teleostei, conosciuti nella documentazione fossile dal Cretaceo medio, circa 80 milioni di anni fa (Nelson, 2006). Gli anguilliformi si sono diffusi con successo in quasi ogni habitat acquatico, a partire dai corsi d'acqua dolce e i piccoli stagni alle pianure abissali del mare profondo. Essi presentano una serie di caratteristiche tali per cui il distinguerli da tutti gli altri pesci ossei risulta essere estremamente semplice. Il loro corpo è allungatissimo, serpentiforme e ricoperto da pelle nuda ricchissima di ghiandole mucose o con piccole scaglie inglobate nei tessuti (di solito le scaglie sono assenti, ma se presenti, sono cicloidi ed incorporate). Essi presentano: pinne pelviche, pinne pettorali e cinto assenti in alcuni, pinne pettorali, quando presenti, in posizione mediolaterale o superiore, pinne dorsali ed anali confluenti con la pinna caudale (pinna caudale senza raggi o persi in alcune), pinne ventrali assenti (da qui il nome Apodi, cioè privi di piedi, con cui viene indicato l'ordine).

Per quanto riguarda la riproduzione, le migrazioni riproduttive sono una generale, anche se non universale, caratteristica degli anguilliformi. Esiste una tendenza generale tra gli anguilliformi a migrare in mare aperto e deporre uova pelagiche, come è ben documentato per il genere *Anguilla*.

L'ordine degli Anguilliformes appartiene alla classe degli Actinopterygii, alla divisione dei Teleostei e alla subdivisione degli Elopomorpha. Gli Elopomorpha sono un gruppo morfologicamente eterogeneo di pesci marini teleostei che comprende circa 1000 specie, disposte in 25 famiglie, che condividono la sinapomorfia di una particolare forma larvale chiamata leptocefalo. Nel 2014 Chen *et al.*, (Chen *et al.*, 2014) hanno condotto uno studio sulla filogenesi degli Elopomorpha, testando le precedenti ipotesi riguardanti le relazioni intra- ed inter-specifiche di questo gruppo, utilizzando dati molecolari ed in particolare marcatori nucleari e mitocondriali. I risultati di questo studio confermano la monofilia degli Elopomorpha che li identifica come sister-group di un clade che include i restanti Teleostei, e i Notacanthiformes come sister-group degli Anguilliformes, includendo i Saccopharyngiformes (dato confermato anche Santini *et al.*, 2013) (Figura 4). La recente famiglia scoperta Protanguillidae, che include la specie *Protanguilla palau* definita “living fossil” (Johnson *et al.*,

2012), non risulta essere il sister-group dei restanti Anguilliformes, ma bensì, il sister-group della famiglia Synphobranchidae (Santini *et al.*, 2013). Viene infine confermata la non-monofilia degli Anguilliformes (Inoue *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2012; Santini *et al.*, 2013) che risulterebbero parafiletici senza l'inclusione dei Saccopharyngiformes.

L'ordine degli Anguilliformes comprende 15 famiglie, 141 generi e circa 791 specie (Nelson, 2006), suddivise in quattro sottordini: Protanguilloidei, Anguilloidei, Congroidei e Muraenoidei (Santini *et al.*, 2013; Tang e Fielitz, 2013).

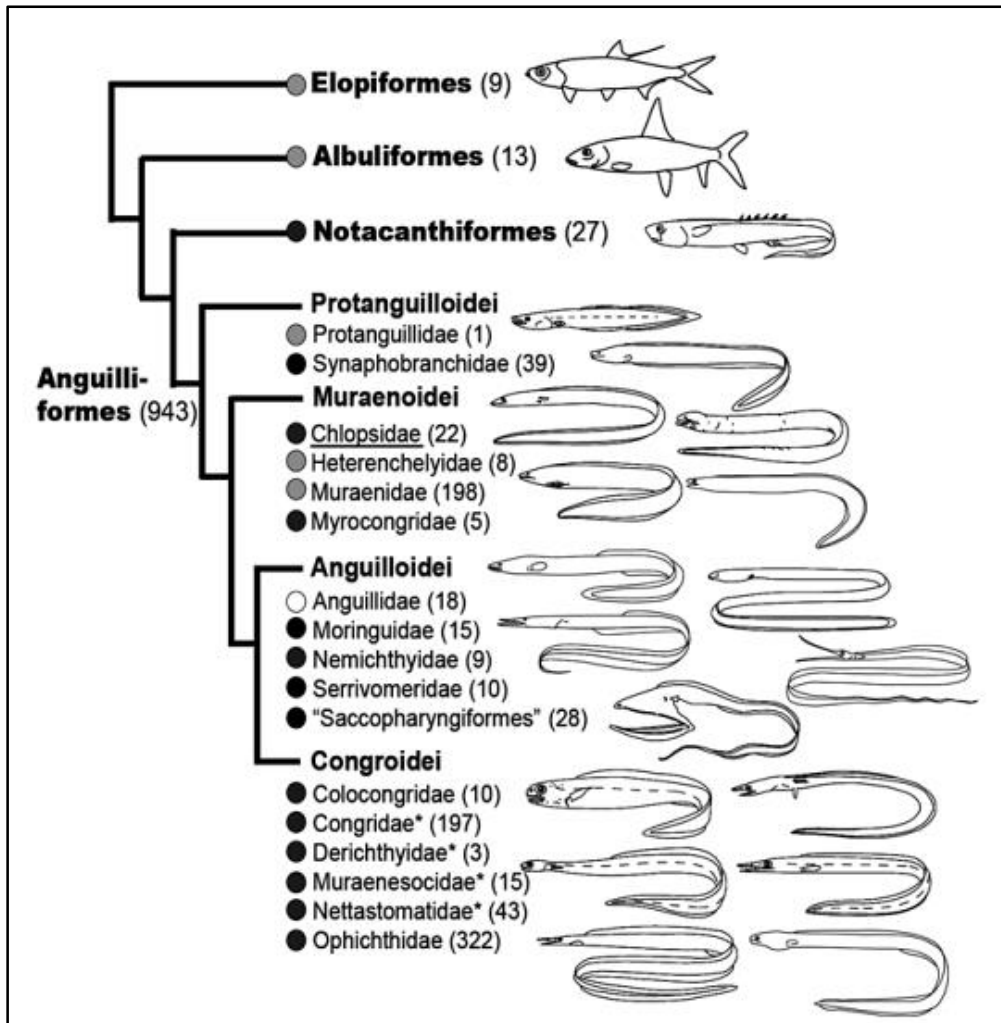
Del sottordine Muraenoidei fa parte la famiglia Muraenidae che include specie marine (mari tropicali e temperati) e alcune specie occasionalmente d'acqua dolce.

Le murene sono conosciute dai reperti fossili del Miocene, circa 34-54 milioni di anni fa (Benton, 1993) e, come tutti gli anguilliformi, hanno il corpo molto allungato e cilindrico, tranne che nell'estremità posteriore, dove è compresso lateralmente; sono muniti di una lunghissima pinna impari che parte poco dietro il capo, percorre tutto il dorso, la coda e, piegandosi verso il basso, continua nella parte inferiore del corpo. A differenza degli altri anguilliformi, le murene non presentano pinne pettorali e ventrali, hanno il corpo ricoperto di pelle spessa e robusta, ricchissima di ghiandole mucose e priva di squame. Presentano un capo piccolo con muso conico, un'apertura boccale piuttosto ampia priva di lingua e armata di forti denti, hanno inoltre narici tubulari e fessure branchiali piccole. Il corpo presenta un numero di vertebre che va da 100 a 200. La colorazione può variare nelle diverse specie e può essere infatti uniforme oppure presentare fasce, zebraure e macchie di vari colori. Hanno un range di lunghezza che va da 0.3 a 3,0 metri nell'adulto.

Per quanto riguarda la riproduzione, le murene presentano gonadi maschili e femminili che si estendono dorso-lateralmente partendo dallo stomaco sino alla regione anale. Esse presentano quattro tipologie riproduttive: - gonocorica, ovvero a sessi separati, presente in numerose specie appartenenti a diversi generi come ad esempio *Gymnothorax* e *Muraena*; - ermafrodita simultanea, tipica del genere *Siderea*, in cui ogni individuo presenta sia gonadi maschili che femminili mature contemporaneamente; - ermafrodita proterandrica, per cui gli individui legati a questo tipo di riproduzione nascono come maschi per poi divenire femmine durante la crescita, come in *Rhinomuraena quaesita*; - ermafrodita proteroginica, per cui gli individui nascono come femmine per poi divenire maschi in seguito, come in *Gymnomuraena zebra* e *G. pavonina*.

Si trovano nei mari tropicali e temperati di tutto il mondo e agiscono come predatori all'apice della catena alimentare nelle barriere coralline o in ambienti rocciosi dove vivono principalmente all'interno di fessure e buchi, mentre altre specie possono vivere nei fondali

fangosi delle piattforme continentali (Böhlke, 1989). Si tratta di specie carnivore che si nutrono di pesci, crostacei e cefalopodi e sono attive soprattutto la notte. Gli adulti sono altamente territoriali (quelli bentonici si trovano tra 1 e 200 metri di profondità) mentre le larve sono planctoniche.



**Figura 4:** Riassunto delle relazioni evolutive dei maggiori gruppi di Elopomorfi secondo Chen *et al.*, (2014) e Santini *et al.*, (2013) (Chen *et al.*, 2015).

### ***Tassonomia e filogenesi***

La tassonomia delle murene è stata prima rivista da Günther (1870) e, più recentemente, sono state condotte rivisitazioni tassonomiche regionali per l'Atlantico (Böhlke, 1989), le Hawaii (Böhlke e Randall, 2000), per il più ampio Indo-Pacifico (Böhlke e Smith, 2002), il Mar Rosso (Randall e Golani, 1995) e l'Australia (Böhlke e McCosker, 2001). Jiménez *et al.* (2007) e Almada *et al.* (2009) hanno valutato il grado di evoluzione tra le specie di murene del

Mediterraneo e del Nord-Est dell'Atlantico, rispettivamente. La tassonomia e la classificazione delle murene, come altri gruppi poco studiati, sono basate essenzialmente sulla morfologia esterna e sulle caratteristiche scheletriche fondamentali con risultati spesso discordanti tra i vari autori. Le specie di murene possono essere distinte con vari livelli di risoluzione, dalla posizione delle pinne anali e dorsali, dalla morfologia e posizione dei denti, dalla pigmentazione larvale, dalla livrea dell'adulto e dal numero delle vertebre (Böhlke, 1989).

La famiglia Muraenidae risulta essere un taxon monofiletico, che, come già detto sopra, è parte del sottordine Muraenoidei, anch'esso monofiletico (Tang e Fielitz, 2013); essa include circa 15 generi con circa 200 specie (Smith, 2012) ed è suddivisa in due sottofamiglie: Uropterygiinae (murene-serpente) e Muraeninae (murene) che risultano essere anch'esse monofiletiche (Tang e Fielitz, 2013) (Figura 5). Le caratteristiche morfologiche distintive delle specie di Uropterygiinae includono: pinne anali e dorsali che restringono verso la punta della coda, la pinna dorsale limitata alla parte posteriore del corpo e con origine posteriormente all'apertura anale; nelle specie di Muraeninae la pinna dorsale di solito si origina vicino all'apertura branchiale e la pinna anale posteriormente all'ano, approssimativamente a metà del corpo (Böhlke, 1989). La sottofamiglia Uropterygiinae include 4 generi e 35 specie, mentre la sottofamiglia Muraeninae include undici generi e 162 specie, per un totale di 197 specie (Smith, 2012). Nelson (1966) considera la decalcificazione e la perdita di alcuni elementi ipobranchiali dalle aperture faringee, un altro carattere derivato condiviso dalla sottofamiglia Muraeninae che la distingue dalla sottofamiglia Uropterygiinae e dalle altre specie dell'ordine Anguilliformes. I dati sul DNA mitocondriale confermano la distinzione filogenetica tra Uropterygiinae e Muraeninae (Loh *et al.*, 2008).

Mehta (2009) descrive due morfotipi all'interno della famiglia Muraenidae, corrispondenti a due strategie alimentari: piscivori e durofagi. Questi morfotipi differiscono nelle strutture del cranio, nelle aperture faringee e in modo più evidente nella dentizione. Le specie piscivore hanno mascelle allungate con numerosi denti lunghi e ricurvi, simili a zanne. Le mascelle delle murene durofaghe sono corte, ricurve e ricoperte da numerosi denti molariformi per rompere i gusci delle conchiglie. Gli studi sulle diete dei durofagi confermano che queste specie, classificate in base alla morfologia del cranio, delle mascelle e alla dentizione, si cibano primariamente di crostacei, mentre quelle piscivore si cibano principalmente o esclusivamente di pesci. Tassonomicamente, la morfologia dei piscivori caratterizza il maggior numero di generi della sottofamiglia Muraeninae, mentre la morfologia dei durofagi è caratteristica del genere *Echidna* (con circa 10 specie riconosciute) e del genere *Gymnomuraena*. La murena zebra, *Gymnomuraena zebra*, rappresenta un genere monotipico, caratterizzato da uno scheletro

fortemente ossificato, ossa dermiche allargate e un posizionamento posteriore dell'ano. *G. zebra* e i membri del genere *Echidna* si nutrono quasi esclusivamente di crostacei e condividono caratteristiche morfologiche associate a questa dieta, compresi denti arrotondati e molariformi e mascelle brevi e ricurve. Da una recente filogenesi molecolare (Reece *et al.*, 2010), e da studi altrettanto recenti basati su sequenze mitocondriali (Tang e Fielitz, 2013) *G. zebra*, rappresenta il sister group di tutte le altre specie della sottofamiglia Muraeninae (Figura 5), separatosi da un antenato comune circa 43 milioni di anni fa; di conseguenza l'alimentazione durofaga e i caratteri morfologici ad essa associati si sarebbero evoluti indipendentemente da quelli del genere *Echidna*. Inoltre l'assenza di monofilia del genere durofago *Echidna* conferma l'ipotesi precedente e indica che l'alimentazione durofaga e la morfologia della mascella ad essa associata si è evoluta almeno altre tre volte nella sottofamiglia Muraeninae (Reece *et al.*, 2010). Circa 150 specie di murene sono presenti nell'Indo-Pacifico e 50 specie nell'Atlantico (Böhlke, 1989; Böhlke e Smith, 2002). Più generi di murena si trovano nell'Atlantico e il genere *Gymnothorax*, assai diffuso, si trova in ogni bacino oceanico. Reece nel suo studio stabilisce che cinque specie di *Gymnothorax* dell'Atlantico studiate, rappresentano almeno due o probabilmente tre invasioni dall'Indo-Pacifico. Sebbene ci siano state due invasioni separate nell'Atlantico nella prima metà del Miocene, il ramo supportato non è sufficiente per rigettare l'ipotesi alternativa di una singola invasione Atlantica seguita dal ritorno di una linea discendente nell'Indo-Pacifico. Inoltre l'Atlantico contiene la maggior parte delle specie di murene che non sono state ancora studiate, che si ipotizza siano entrate attraverso il mare Tethys 15-20 milioni di anni fa (Almada *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2004). Questo lasso di tempo è compatibile con le più antiche invasioni dell'Atlantico del genere *Gymnothorax*. Dunque, in conclusione, sia le invasioni ricorrenti dall'Indo-Pacifico, sia la speciazione *in situ* contribuiscono alla diversità delle murene nell'Atlantico.

I risultati di Reece (2010), indicano che il principale accumulo di linee evolutive è avvenuto nel Miocene (circa 5-23 milioni di anni fa), con linee relativamente poco antecedenti al tardo Oligocene, circa 25 milioni di anni fa e con poche origini verificatesi nel Pliocene (circa 2,5-5 milioni di anni fa). Queste date sono coerenti con le limitate prove fossili che datano la prima apparizione di murene tra i 34 e i 54 milioni di anni fa (Arambourg, 1927; Benton, 1993) e delle specie del genere *Gymnothorax* nel Mediterraneo non più tardi di 5,3 milioni di anni fa (Gaudant, 2002).

Dalla filogenesi di Reece su 44 specie di murene sono state ottenute quattro principali ipotesi sulla storia evolutiva e sulla biogeografia delle murene. Da un recente campionamento sulla famiglia Muraenidae risulta che le due sottofamiglie sono taxa fratelli e monofiletici. Uno

studio precedente con un campionamento più approfondito sulle Uropterygiinae (Loh *et al.*, 2008) è compatibile con questa conclusione.

Il genere *Gymnothorax* costituisce attualmente circa il 60% di tutte le specie della famiglia Muraenidae e dalla ricostruzione filogenetica operata da Reece utilizzando porzioni di *loci* mitocondriali e porzioni di *loci* nucleari, risulta un genere parafiletico come anche il genere *Echidna*. La revisione tassonomica più semplice, in grado di rispecchiare i modelli di discendenza, potrebbe essere quella di ricondurre i generi *Enchelynassa*, *Rhinomuraena* e *Enchelycore* all'interno del genere *Gymnothorax*.

Con queste revisioni, il genere *Echidna* e *Gymnothorax* sarebbero taxa fratelli. Dei generi studiati che includono più specie, solo il genere *Muraena* è risultato essere monofiletico (Tang e Fielitz, 2013).

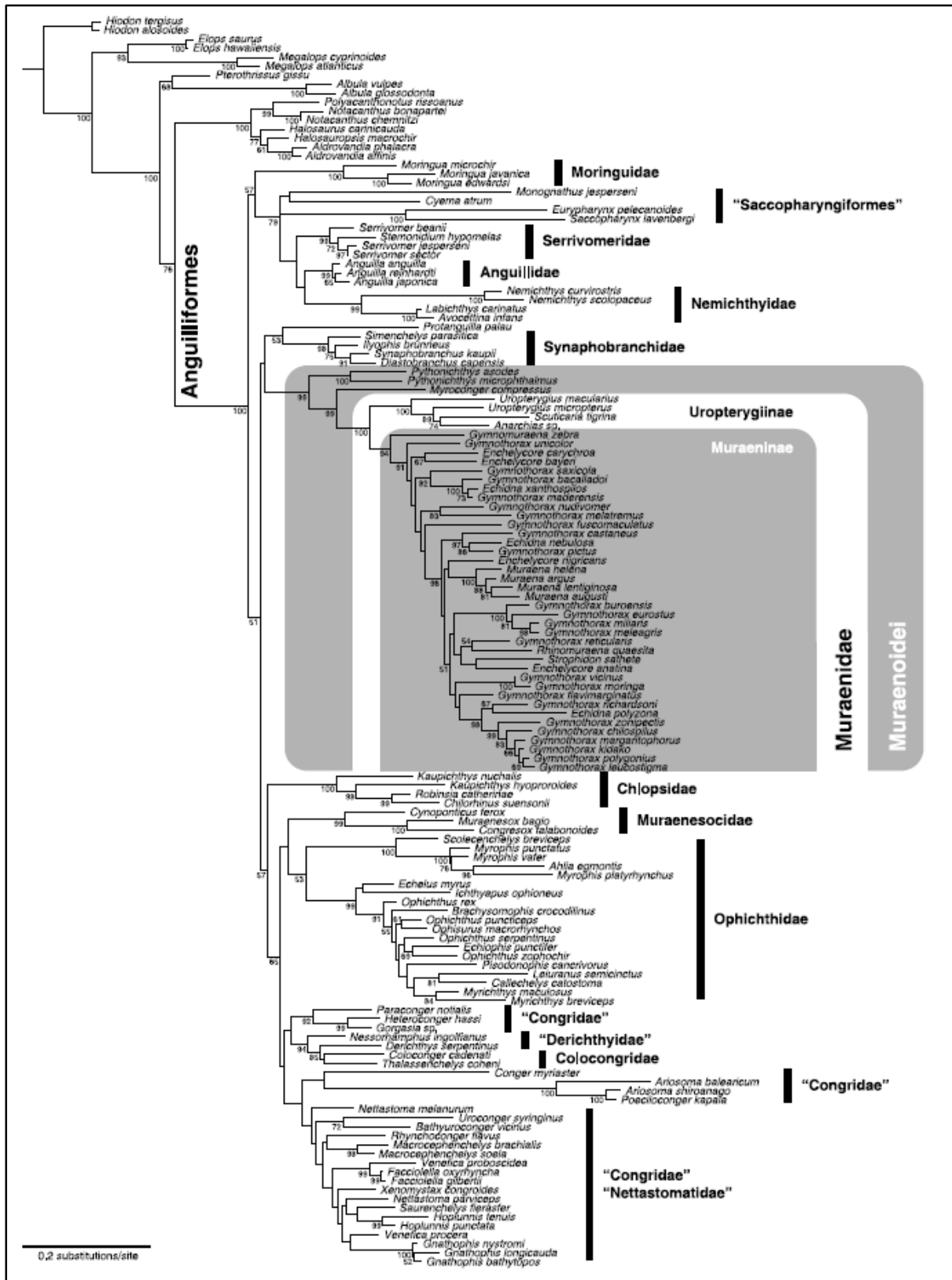


Figura 5: Filogenesi degli Anguilliformi (Tang e Fieliz, 2013).

## Generi e specie studiate

### Genere *Echidna*

Il nome del genere deriva dal greco “echidna” che significa “vipera”. Esso comprende specie che presentano un corpo allungato e compresso lateralmente nella parte posteriore e una testa di lunghezza pari o inferiore rispetto a quella della coda. Le mascelle sono solitamente corte, più o meno uguali e si chiudono completamente. La narice anteriore è tubulare, diretta anteriormente e posta vicino alla punta del muso; quella posteriore è invece caratterizzata da una piccola apertura circolare vicina al margine anteriore dell’occhio, spesso con un piccolo bordo rialzato. È presente un’apertura branchiale medio-laterale e piccola. I denti sono molariformi o conici e mai caniniformi. La pinna dorsale si origina nella regione anteriore del tronco, in prossimità dell’apertura branchiale. La colorazione del corpo, nella maggior parte delle specie, è caratterizzata da numerose bande e spots, mentre solo in alcune risulta essere uniforme. Le dimensioni possono variare da moderate a grandi. Esse sono estremamente simili a quelle appartenenti ai generi *Gymnothorax*, *Muraena*, e *Sideranella* per la forma del corpo, la colorazione e l’origine della pinna dorsale. Differiscono invece nella dentatura. Le specie appartenenti a questo genere sono distribuite principalmente nella zona circumtropicale e sono tipiche delle acque superficiali di tutti gli oceani. Attualmente sono conosciute 12 specie appartenenti al genere *Echidna*.

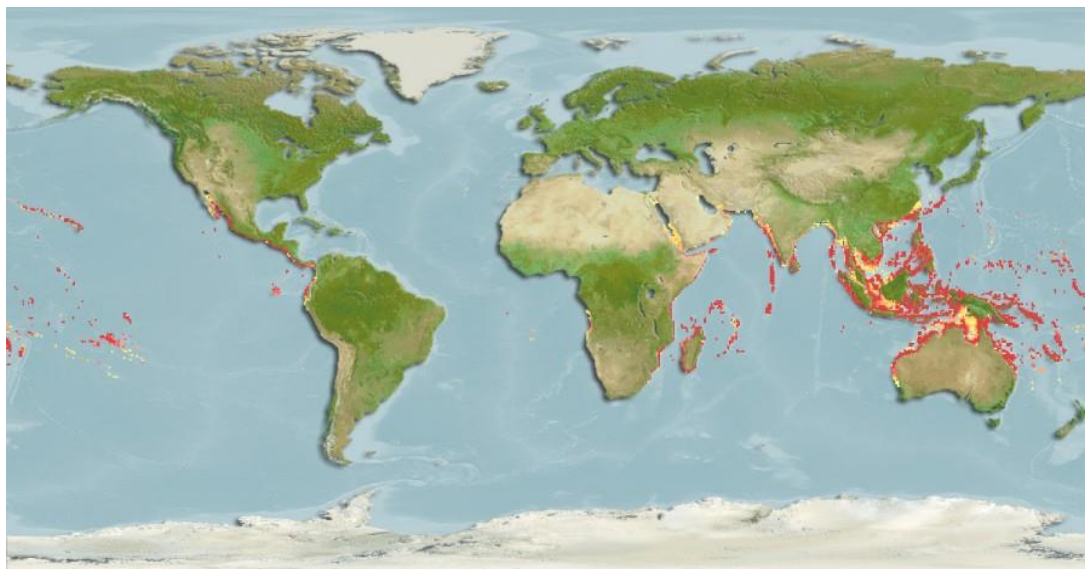
### Specie: *Echidna nebulosa*

<b>PHYLUM</b>	Chordata
<b>SUBPHYLUM</b>	Vertebrata
<b>CLASSE</b>	Actinopterygii
<b>INFRACLASSE</b>	Teleostei
<b>ORDINE</b>	Anguilliformes
<b>FAMIGLIA</b>	Muraenidae
<b>SOTTOFAMIGLIA</b>	Muraeninae
<b>GENERE</b>	<i>Echidna</i>
<b>SPECIE</b>	<i>Echidna nebulosa</i> (Ahl, 1789)



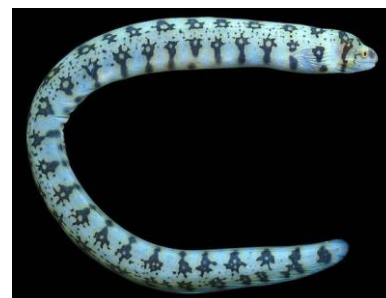
Questa specie, chiamata comunemente murena stellata (starry moray) o murena fiocco di neve (snowflake moray eel) vive tra 1-48 m di profondità ed è distribuita nell’Indo-Pacifico (nel Mar

Rosso e Africa Orientale, da nord a sud del Giappone e isole Hawaii) e nel Pacifico centro-orientale (nel Messico e dalla Costa Rica al nord della Colombia) (Froese e Pauly, 2012).



**Figura 6:** Distribuzione geografica della specie *E. nebulosa* ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

Vive tra le rocce e i coralli della barriera intertidale e talvolta si ritrova anche in laguna. Si nutre principalmente di crostacei e ha una modalità di riproduzione di tipo ermafrodita proteroginica. Presenta un corpo allungato e compresso lateralmente nella parte posteriore. La testa ha una lunghezza uguale o inferiore alla lunghezza della coda, il muso è corto e sub-conico; le mascelle sono corte, sub-eguali e si chiudono completamente. Gli occhi sono gialli, di medie dimensioni e posti al centro della mascella superiore; la narice anteriore è tubulare, diretta anteriormente e posta vicino alla punta del muso, la narice posteriore invece è costituita da una piccola apertura circolare situata sopra il margine anteriore dell'occhio, spesso con un piccolo bordo rialzato. Le aperture branchiali sono medio-laterali e piccole; i pori della testa, piuttosto sviluppati, sono solitamente tre sopraorbitali, quattro infra-orbitali, sei mandibolari e due branchiali. Il corpo può raggiungere una lunghezza massima di 100 cm e presenta una colorazione bianca con due file di macchie nere dendritiche.



### **Genere *Gymnomuraena***

Il genere *Gymnomuraena* è un genere monotipico, il quale presenta *G. zebra* come unica specie e sembra essersi separata da tutte le altre specie della sottofamiglia Muraeninae circa 43 milioni di anni fa, durante l'emersione dell'istmo di Panama che costituì una barriera per le specie

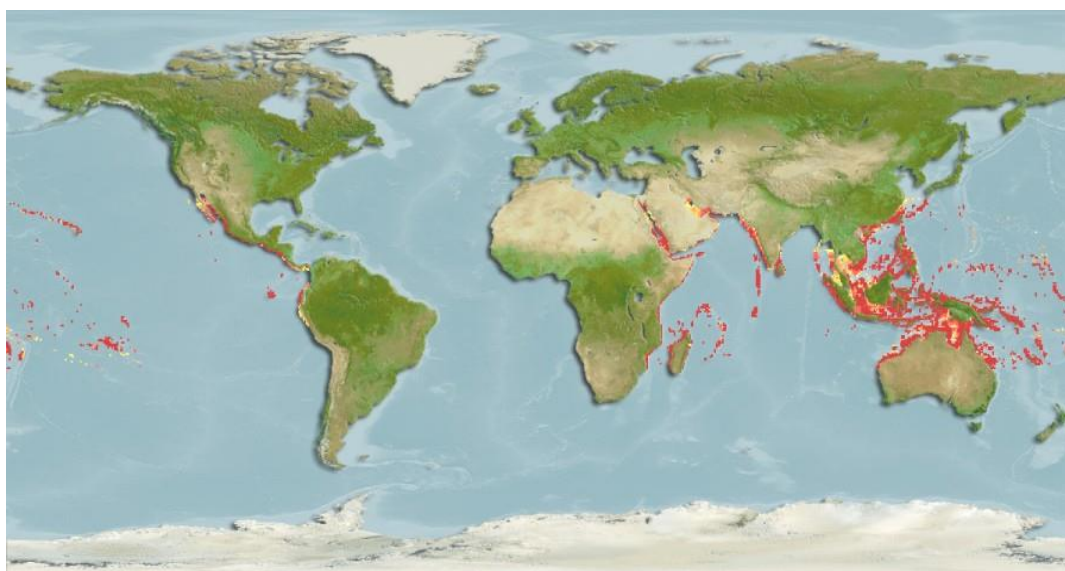
marine. Lo studio dei resti fossili datati tra i 41 e i 60 milioni di anni fa ha permesso la ricostruzione del loro albero genealogico (Reece *et al.*, 2010).

### Specie: *Gymnomuraena zebra*

<b>PHYLUM</b>	<b>Chordata</b>
<b>SUBPHYLUM</b>	Vertebrata
<b>CLASSE</b>	Actinopterygii
<b>INFRACLASSE</b>	Teleostei
<b>ORDINE</b>	Anguilliformes
<b>FAMIGLIA</b>	Muraenidae
<b>SOTTOFAMIGLIA</b>	Muraeninae
<b>GENERE</b>	<i>Gymnomuraena</i>
<b>SPECIE</b>	<i>Gymnomuraena zebra</i> (Shaw, 1797)



Questa specie predilige le acque tropicali delle regioni Indo-Pacifiche ad una latitudine di 30°Nord-24°Sud e longitudine 32°Est-78°Ovest. Ha un areale di distribuzione che si estende dall'Indo-Pacifico al Pacifico Orientale, dal Mar Rosso sino ad arrivare alle coste dell'Africa Orientale, si trova anche nella grande barriera corallina Australiana, le isole Hawaii, a sud della Baia della California, Messico, Guatemala e a nord della Colombia (Froese e Pauly, 2012).



**Figura 7:** Distribuzione geografica della specie *G. zebra* ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

Questa specie è una murena di grandi dimensioni che può raggiungere una lunghezza massima di 150 cm e una lunghezza media di 50 cm. Presenta un muso arrotondato e corto, occhi piccoli, una narice anteriore tubulare, posta ben al di sopra del bordo della mascella e una narice

posteriore, simile a quella anteriore, ma posta dietro il margine dell'occhio, con bordo rialzato nei giovani e svasato negli adulti. Sulla testa sono presenti un poro branchiale molto piccolo e posto poco dietro le aperture branchiali e un primo poro infra-orbitale localizzato vicino alla narice anteriore e posto leggermente sopra il livello degli altri tre. Questa specie è caratterizzata da un particolare sistema dentario correlato all'alimentazione di tipo durofago: i denti sono corti e molariformi, possono essere biserati o triserati e diventano maggiormente numerosi con la crescita. Il numero delle vertebre varia da 132 a 137; l'origine della pinna dorsale non è facile da identificare esternamente, ma è visibile solo mediante radiografia; la pinna anale è corta e si origina poco dietro l'ano, che si trova più o meno a metà del corpo. È presente un dimorfismo sessuale suggerito dalla conta dei denti mascellari, anche se sono necessari ulteriori studi su individui adulti, sui quali poter fare la dissezione delle mascelle per ottenere conte precise.

La colorazione è su uno sfondo nero, testa, del corpo e delle pinne. Nelle specie di taglia contate circa 25 bande tende ad aumentare con la



caratterizzata da bande bianche uniforme in tutte le parti della e dunque piuttosto appariscente. inferiore ai 200 mm sono state bianche dorsali, il cui numero crescita fino ad arrivare ad un

numero di 100 negli individui che misurano 300-400 mm. Le nuove bande appaiono come piccoli spot o linee che poi si allungano fino a circondare il corpo.

Per quanto riguarda la riproduzione, si pensa si tratti di una specie ermafrodita proterandrica, per cui gli individui nascono femmine e diventano maschi in un secondo momento. Si nutrono principalmente di granchi, ma anche di altri crostacei, molluschi e ricci di mare.

### **Genere *Gymnothorax***

Il nome “*Gymnothorax*” deriva dal greco “*gymnos*” che significa nudo e “*thorax*” che significa torace, in riferimento al fatto che le specie appartenenti a questo genere non hanno le pinne pettorali. Il loro corpo è allungato e compresso lateralmente nella parte posteriore, la coda è affusolata, la testa e il tronco hanno una lunghezza uguale o leggermente inferiore rispetto a quella della coda. Gli occhi sono di dimensioni medie, la narice anteriore è tubulare mentre quella posteriore è leggermente più piccola e posta sopra il margine anteriore dell'occhio. Le aperture branchiali sono circolari e i pori della testa, che sono piuttosto sviluppati, si dividono in: tre sopraorbitali, tre o quattro infraorbitali, sei mandibolari e due branchiali. I denti sono robusti, conici, appuntiti e seghettati lungo il bordo, possono essere uniseriati o multiseriati e

diversamente sviluppati all'interno dei vari sottogeneri. La pinna dorsale si origina sulla testa davanti alle aperture branchiali.

La colorazione varia a seconda delle specie, ma generalmente è caratterizzata da screziature, bande o spots. La taglia è solitamente media, ma nell'Atlantico alcune specie possono raggiungere anche i 2 m di lunghezza.

Le specie appartenenti a questo genere sono distribuite principalmente nella zona circumtropicale; esse vivono negli anfratti delle rocce in acque per lo più superficiali; altre, anche se poche, sono state ritrovate a profondità intorno ai 600 m. È difficile stimare il numero esatto delle specie appartenenti al genere *Gymnothorax*, finora ne sono state descritte oltre 200 e la maggior parte si trova nell'Indopacifico.

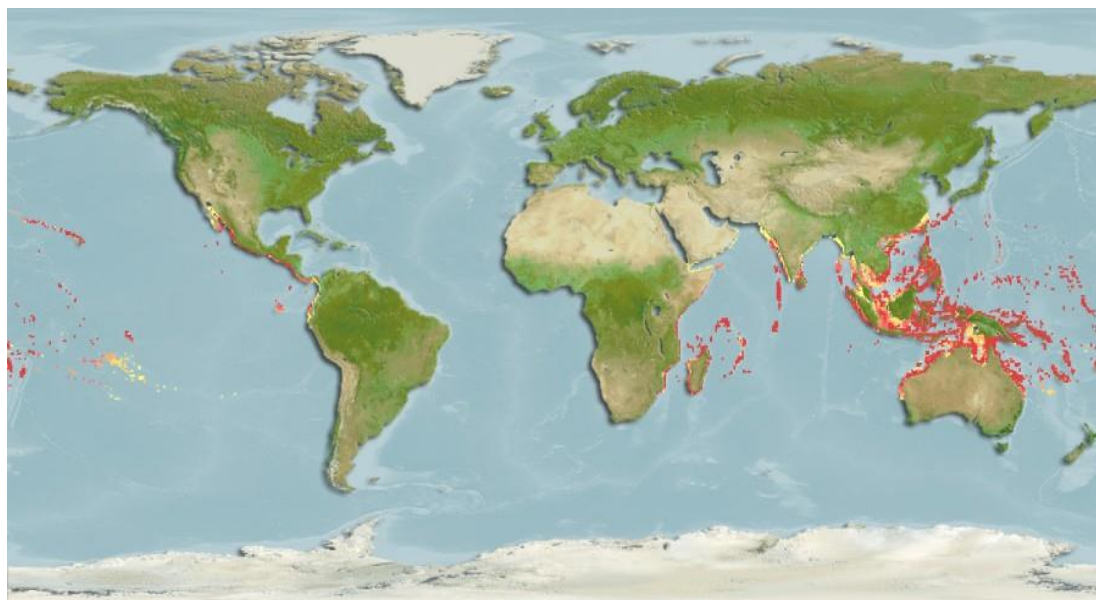
**Specie: *Gymnothorax fimbriatus***

<b>PHYLUM</b>	<b>Chordata</b>
<b>SUBPHYLUM</b>	Vertebrata
<b>CLASSE</b>	Actinopterygii
<b>INFRACLASSE</b>	Teleostei
<b>ORDINE</b>	Anguilliformes
<b>FAMIGLIA</b>	Muraenidae
<b>SOTTOFAMIGLIA</b>	Muraeninae
<b>GENERE</b>	<i>Gymnothorax</i>
<b>SPECIE</b>	<b><i>Gymnothorax fimbriatus</i> (Bennet, 1832)</b>



È una murena caratterizzata da un corpo allungato e affusolato con una testa e un muso piuttosto stretti e può raggiungere anche i 150 cm di lunghezza.

Sono ampiamente distribuite nell'Indo- Pacifico, lungo le barriere coralline e in lagune poco profonde.



**Figura 8:** Distribuzione geografica della specie *G. fimbriatus* ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

Dal punto di vista morfologico la narice anteriore è tubulare mentre quella posteriore è costituita da un poro situato sopra il margine anteriore dell'occhio. I denti possono essere da uniseriati a biseriati e piuttosto lunghi e sottili. L'origine della pinna dorsale è situata poco prima il primo poro branchiale.


Il corpo è di taglia media, con una colorazione che solitamente va dal rossastro al marrone, con macchie rettangolari disposte in 2-4 file longitudinali irregolari; queste macchie sono ben definite nelle specie piccole e diventano diffuse e irregolari negli individui più grandi.

A causa della colorazione piuttosto variabile sono state spesso confuse con altre specie dell'Indo-Pacifico, come *G. chilospilus* che non ha le macchie marroni rettangolari, ma segni bianchi sulla testa e un numero inferiore di vertebre.

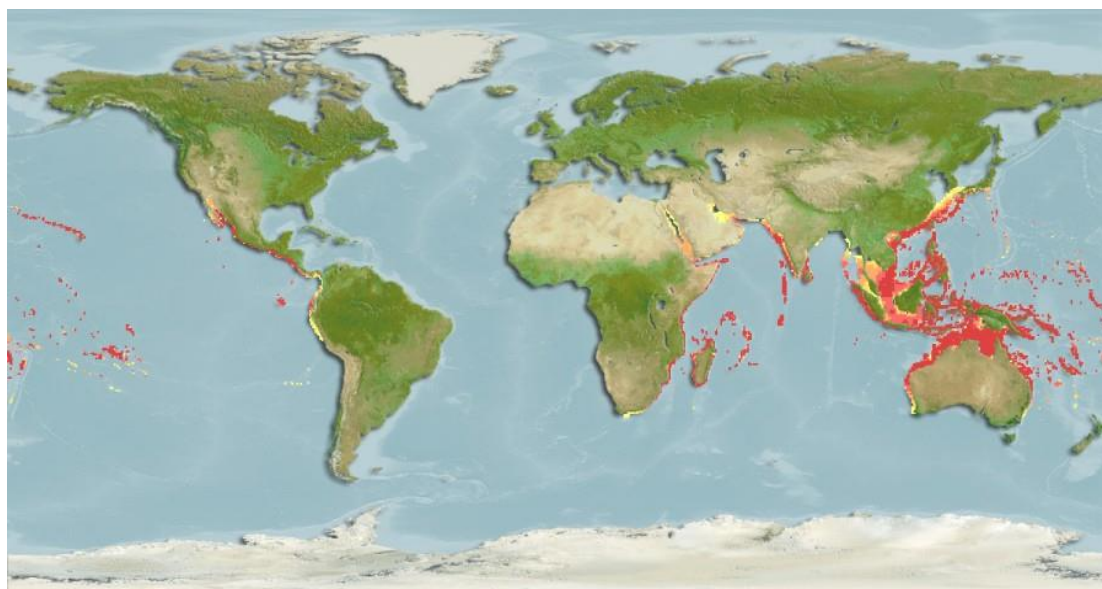
Si trovano spesso in associazione con gamberetti pulitori del genere *Peridemenens* (Froese e Pauly, 2012). Si nutrono di pesci, ottopodi e crostacei. La strategia riproduttiva è ancora sconosciuta (Randall e Golani, 1995) ma probabilmente si tratta di una specie ermafrodita proteroginica.



**Specie: *Gymnothorax flavimarginatus***

<b>PHYLUM</b>	<b>Chordata</b>	
<b>SUBPHYLUM</b>	Vertebrata	
<b>CLASSE</b>	Actinopterygii	
<b>INFRACLASSE</b>	Teleostei	
<b>ORDINE</b>	Anguilliformes	
<b>FAMIGLIA</b>	Muraenidae	
<b>SOTTOFAMIGLIA</b>	Muraeninae	
<b>GENERE</b>	<i>Gymnothorax</i>	
<b>SPECIE</b>	<i>Gymnothorax flavimarginatus</i> (Rüppel, 1830)	

Questa specie si trova nell'Indo-Pacifico (Mar Rosso, Sud Africa, ad est fino alle isole di Ryukyu e isole Hawaiiiane, a sud fino alla New Caledonia) e nel Pacifico orientale (Costa Rica, Galapagos, Panama) (Froese e Pauly, 2012).



**Figura 9:** Distribuzione geografica della specie *G. flavimarginatus* (www.fishbase.org).

Vive nelle barriere coralline o in laguna, generalmente in acque superficiali, anche se alcuni esemplari sono stati ritrovati a 150 m di profondità. Si nutre di cefalopodi, pesci e crostacei e spesso è causa di avvelenamento da ciguattera.

È una murena di grandi dimensioni, con un cranio di circa 8-10 cm e il muso corto e arrotondato. Presenta una narice anteriore tubulare e una posteriore situata sopra il margine anteriore dell'occhio, avente un bordo rialzato negli individui di medie e grandi dimensioni. È caratterizzata dalla presenza sulla testa di pori branchiali, disposti in prossimità delle aperture

branchiali, che sono situate su uno spot nero. Gli occhi sono giallastri, i denti parzialmente biseriali, robusti e triangolari, quelli mascellari (da 9 a 18) sono piccoli e di questi, i primi quattro sono più grandi e poi decrescono posteriormente. Il numero totale delle vertebre varia da 132 a 140, la pinna dorsale si origina prima del primo poro branchiale e l'ano poco prima della metà del corpo.

Questa specie presenta un corpo giallastro, coperto di piccoli spots più scuri di colore marrone o nero, che gli conferiscono un aspetto screziato, i giovani invece hanno un colore giallo

brillante con macchie marroni. Le colorazione del corpo e sono più colorazione del corpo sembra essere specie infatti appaiono totalmente possono essere di colore marrone con parte anteriore della testa è



pinne presentano la stessa scure posteriormente. La molto variabile: molte scure, mentre altre macchioline più scure; la solitamente grigio

violacea. La colorazione in vita è simile a quella in alcool, eccetto che per il bordo delle pinne che va dal giallo al giallastro-verde. Questa specie può raggiungere i 123 cm di lunghezza.

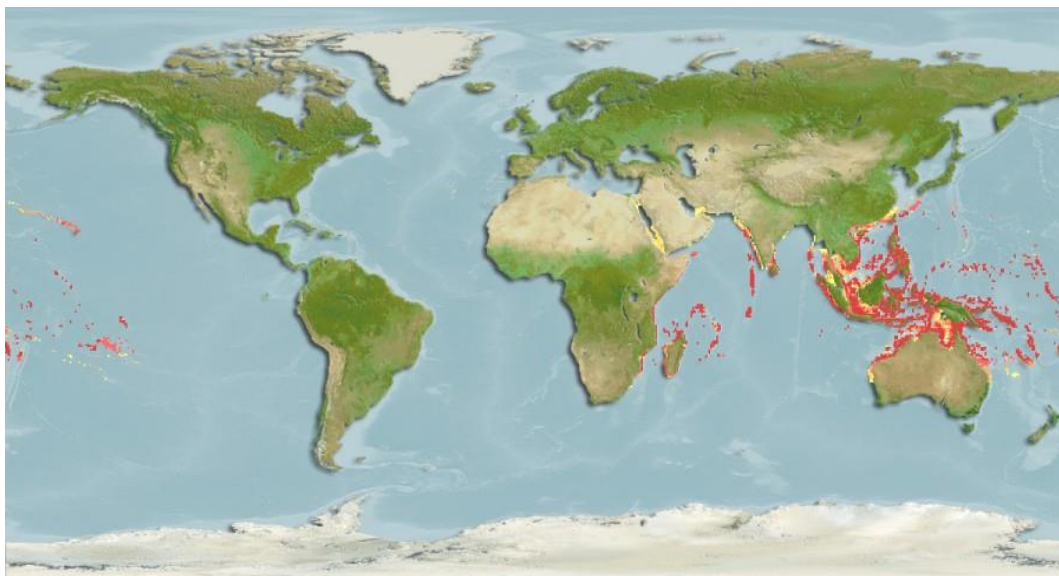
### Specie: *Gymnothorax javanicus*

<b>PHYLUM</b>	<b>Chordata</b>
<b>SUBPHYLUM</b>	Vertebrata
<b>CLASSE</b>	Actinopterygii
<b>INFRACLASSE</b>	Teleostei
<b>ORDINE</b>	Anguilliformes
<b>FAMIGLIA</b>	Muraenidae
<b>SOTTOFAMIGLIA</b>	Muraeninae
<b>GENERE</b>	<i>Gymnothorax</i>
<b>SPECIE</b>	<b><i>Gymnothorax javanicus</i> (Bleeker, 1859)</b>



*G. javanicus* sembra avere un home range ben definito. È una specie molto diffusa nelle acque tropicali delle regioni indo-pacifiche ad una latitudine compresa tra 30°N e 25°S, con un'ampia distribuzione che comprende il Mar Rosso e l'Africa Orientale fino alle isole Marchesi e all'Eno (atollo corallino appartenente alle isole Pitcairn), ancora a nord verso le isole Ryukyu (Asia orientale) e le Hawaii, a sud della Nuova Caledonia e nelle isole Australi. Si tratta di una specie rigorosamente marina, associata alle barriere coralline, con una distribuzione batimetrica che va dagli 0 ai 50 metri. È un abitante della barriera corallina, come lo sono la maggior parte delle

specie del genere *Gymnothorax*, è molto criptica nelle sue abitudini, rimanendo intanata nelle fessure della barriera corallina (Hiatt e Strasburg, 1960).



**Figura 10:** Distribuzione geografica della specie *G. javanicus* (www.fishbase.org).

La specie *Gymnothorax javanicus* è stata originariamente descritta come *Muraena javanica* (Bleeker, 1859) da campioni raccolti a Java. Successivamente lo stesso Bleeker (1864) ha collocato questa specie nel genere *Gymnothorax*. *G. javanicus* è stato più volte erroneamente confuso con *G. flavimarginatus* (Rüppell, 1828) da Günther (1870), Weber de Beaufort (1916), Fowler (1928), Smith (1949) e Herre (1953). Smith (1962) tuttavia ha infine stabilito che le due specie sono “chiaramente distinte”.

*G. javanicus*, conosciuta come murena gigante (giant moray) è, in termini di massa corporea, la più grande tra le specie appartenenti alla famiglia Muraenidae, essa raggiunge i 3 metri di lunghezza (Lieske e Myers, 1994) e i 30 kg di peso (Kuiter, 1998). Essa raggiunge probabilmente un'età superiore ai 20 anni.

Per quanto riguarda le caratteristiche distintive, la specie presenta, negli adulti, una livrea che va dal bruno-rossastro ad un pallido verde-bruno come colore di sfondo nella parte anteriore, lasciando il posto, posteriormente, ad un colore marrone chiaro. Numerose piccole macchie nere irregolari (più piccole del diametro dell'occhio) coprono la testa e grandi macchie nere in circa tre file irregolari, si estendono caudalmente a partire dal livello dell'apertura branchiale. Queste sono inframezzate da macchie nere irregolari più



piccole. L'apertura branchiale è circondata da una macchia nera. Ventralmente le macchie diventano molto piccole e diffuse, fondendosi con il colore di fondo.

Per quanto riguarda la riproduzione non è presente alcun dimorfismo sessuale in questa specie eccetto il fatto che, in generale, i maschi raggiungono delle dimensioni più grandi delle femmine. Le differenze di peso trovate tra i sessi, potrebbero essere causate dalla canalizzazione di una notevole quantità di energia, da parte delle femmine, nella produzione di uova telolecitiche. I maschi di *G. javanicus* pesano mediamente intorno agli 8.4 kg, mentre le femmine solo 5,5 kg (Brock, 1972).

La determinazione del sesso e della maturazione sessuale è possibile solo attraverso l'esame delle gonadi. Da uno studio su 381 campioni, Brock ha descritto la morfologia, l'anatomia delle gonadi maschili e femminili che sono pari e si trovano dorsalmente nella cavità del corpo. La differenziazione macroscopica è difficile, tranne quando le femmine sono mature. Le gonadi di una femmina matura possono essere ben 34 volte più pesanti di quelle di un maschio della stessa dimensione. Le femmine diventano mature durante i mesi estivi.

Brock nel 1972 in uno studio effettuato nell'arco di otto anni, sulla biologia e sulle caratteristiche riproduttive di c.ca 1200 esemplari di *G. javanicus*, ottenne il numero di individui maturi, di ciascun sesso, calcolati su base mensile, per un periodo di nove mesi. Il maggior numero di individui sessualmente maturi di entrambi i sessi, era incentrato tra la fine di Giugno e la prima parte di Luglio. Il persistere di un alto numero di maschi maturi ad Agosto, con una concomitante diminuzione della percentuale di femmine sessualmente mature, può essere un meccanismo per assicurare un adeguato numero di maschi maturi nella popolazione durante il periodo riproduttivo. Non è stato possibile accertare con precisione, la fecondità o il numero totale di uova prodotte annualmente da una singola femmina, poiché la maggior parte dei campionamenti erano limitati ai mesi estivi. Se i campioni delle gonadi venissero presi tutto l'anno, la possibilità di più deposizioni di uova per femmina, in un anno, potrebbe essere valutata. In considerazione delle osservazioni di Castle (1965) sulle larve dei murenidi e dai dati raccolti, sembra probabile che *G. javanicus* produca uova una volta all'anno (Brock, 1972). Nella prima settimana di luglio del 1970 nell'atollo Johnston, il Dr. Johannes osservò una coppia di *G. javanicus* sdraiata sul fondo sotto una grande testa di *Acropora sp.*, con le murene intrecciate l'una intorno all'altra. In questa posizione i corpi trasmettevano diverse ondate di movimento, ma un rilascio visibile di gameti non era evidente. Dopo circa un minuto le murene si separarono e si allontanarono l'una dall'altra, forse a causa del passaggio ravvicinato di un subacqueo. Questa potrebbe essere stata soltanto una parte del comportamento di accoppiamento di *G. javanicus*.

Questa murena, come la maggior parte degli appartenenti al genere, si alimenta di notte ed è un carnivoro della fauna bentonica. Dallo studio di Brock (1972) è risultato dall'esame dei contenuti stomacali che la tipologia di caccia delle murene, non viene effettuata su una vasta area, ma piuttosto la cattura delle prede avviene, dopo una vigile attesa, in un'area intorno alla tana. Questa specie, come la maggior parte delle murene, sembra essere principalmente piscivora. L'88,8% del contenuto stomacale era costituito da pesci (Brock, 1972). I resti campionati sono risultati distribuiti tra le 17 famiglie di pesci di barriera insieme a resti di pesci non identificati, che costituivano il 49,7% del campione totale. Il saldo dei prodotti alimentari consumati (11,2% del campione) era composto da crostacei, molluschi e resti vari.

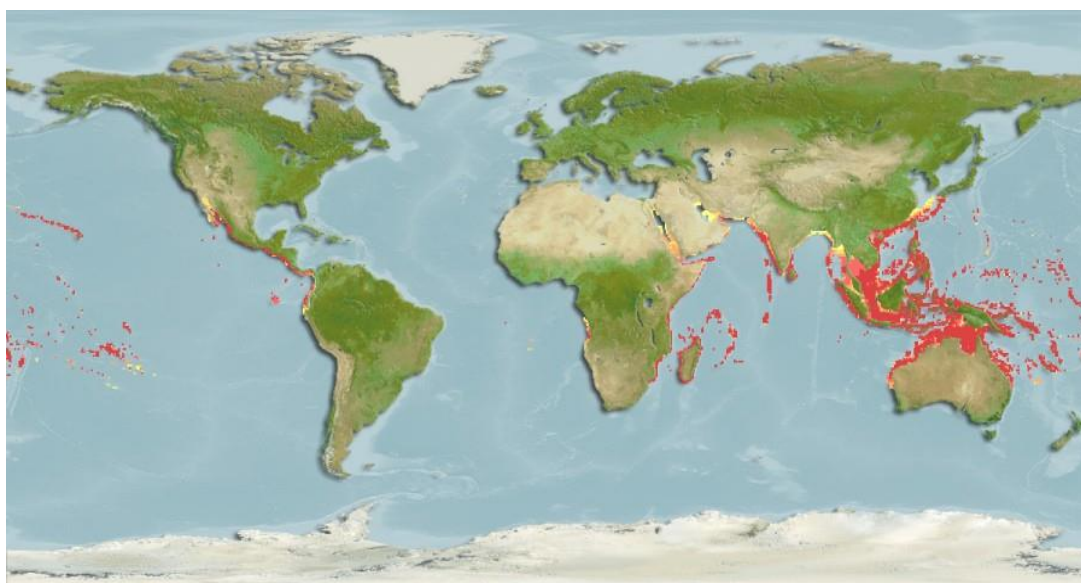
Per quanto riguarda l'impatto sull'uomo, la murena *G. javanicus*, è soggetta a contaminazione da parte di una particolare tossina (ciguatossina), prodotta da un microorganismo dinoflagellato: *Gambiendiscus toxicus* (Taylor, 1979), che causa la cosiddetta ciguatera, ovvero un'intossicazione alimentare causata dall'ingestione di cibi di origine marina, contaminati da tale tossina. La tossina prodotta dal dinoflagellato epifita viene trasmessa ai pesci tramite biomagnificazione lungo la catena alimentare. Si tratta di un tipo di avvelenamento non batterico, causato dal consumo di pesce della barriera corallina, in tutte le regioni circum-tropicali del mondo, ma soprattutto nell'area del sud-est Asiatico. Diverse specie di pesci associati alle barriere coralline possono recare la ciguatossina. Tutti i predatori di taglia medio-grande che hanno il loro habitat presso la barriera corallina (compreso *G. javanicus*), dovrebbero essere evitati dall'uomo, in quanto potenzialmente contaminati. I sintomi della ciguatera comprendono una serie di disturbi gastrointestinali, neurologici e cardiovascolari; i primi a manifestarsi sono solitamente vomiti, diarrea e prurito, seguiti da gravi complicanze neurologiche come parestesie, disfagie, astenia, fascicolazioni, atassia, visione offuscata, fino ad arrivare a convulsioni, esantemia maculo-papulare e paralisi. Una caratteristica clinica della ciguatera è la percezione alterata e opposta di caldo e freddo. La probabilità di morte è comunque inferiore allo 0.1-1%. La tossina agisce sul potenziale di membrana delle cellule neurali: il meccanismo d'azione è un incremento della permeabilità della membrana agli ioni sodio, con un iniziale aumento dell'eccitabilità, seguito dal blocco della conduzione (Rayner, 1970; Miyahara *et al.*, 1979). Prove cliniche e di laboratorio suggeriscono un possibile riassorbimento del calcio e la degenerazione delle fibre muscolari volontarie (Deichmann *et al.*, 1977; Jones e William, 1982). Non esiste alcun antidoto per l'avvelenamento da ciguatossina.

**Specie: *Gymnothorax undulatus***

<b>PHYLUM</b>	<b>Chordata</b>
<b>SUBPHYLUM</b>	Vertebrata
<b>CLASSE</b>	Actinopterygii
<b>INFRACLASSE</b>	Teleostei
<b>ORDINE</b>	Anguilliformes
<b>FAMIGLIA</b>	Muraenidae
<b>SOTTOFAMIGLIA</b>	Muraeninae
<b>GENERE</b>	<i>Gymnothorax</i>
<b>SPECIE</b>	<b><i>Gymnothorax undulatus</i> (Lacepède, 1803)</b>



Questa specie è molto diffusa nelle acque tropicali dell'Indo-Pacifico ad una latitudine di 32°N e 28°S; è la specie più comune del genere *Gymnothorax* nella zona settentrionale del mar Rosso (Randall e Golani, 1995), presente anche lungo le coste dell'Africa orientale, costa orientale del Giappone, isole Hawaii, e infine nelle coste di Panama e Costa Rica (Froese e Pauly, 2012).



**Figura 11:** Distribuzione geografica della specie *G. undulatus* ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

È una specie marina che vive nelle barriere coralline ad una batimetria che può variare dai 9 ai 110 m. È essenzialmente bentonico e si trova solitamente negli anfratti delle rocce dove si nasconde durante le ore diurne.

È una murena con un corpo allungato, una coda affusolata e testa e mascelle lunghe e strette. Presenta due narici anteriori tubulari e due posteriori caratterizzate da un poro situato sopra il margine anteriore dell'occhio, che si trova vicino all'estremità del muso. I pori branchiali sono distribuiti in prossimità delle aperture branchiali che si trovano invece a metà del corpo. I denti

sono disposti in un'unica fila, ad eccezione di un paio di canini che nei giovani formano una fila interna sul lato della mascella superiore. La pinna dorsale si origina sopra il primo poro branchiale mentre l'ano è posto più vicino alla testa che alla coda. Il numero totale di vertebre va da 126 a 138.

Il corpo ha una colorazione che generalmente va dal grigio al marrone, con macchie strette e irregolari di colore bianco-giallastro nelle forme giovanili, che poi diventeranno macchie dendritiche nell'adulto. Il muso invece non presenta né macchie né spots, mentre un elemento caratteristico di questa specie è una macchia tendente al giallo sopra la testa.



Per quanto riguarda la dieta si nutre di piccoli pesci, polpi e crostacei e presenta un comportamento che in alcuni casi può risultare essere particolarmente aggressivo.

Di questa specie non si conosce ancora la strategia riproduttiva (Randall e Golani, 1995).

**Specie: *Gymnothorax unicolor***

<b>PHYLUM</b>	<b>Chordata</b>
<b>SUBPHYLUM</b>	Vertebrata
<b>CLASSE</b>	Actinopterygii
<b>INFRACLASSE</b>	Teleostei
<b>ORDINE</b>	Anguilliformes
<b>FAMIGLIA</b>	Muraenidae
<b>SOTTOFAMIGLIA</b>	Muraeninae
<b>GENERE</b>	<i>Gymnothorax</i>
<b>SPECIE</b>	<b><i>Gymnothorax unicolor</i> (Delaroche, 1809)</b>



Questa specie è una specie comune nell'Atlantico orientale e nel Mediterraneo: dal sud del Portogallo al Marocco, gli arcipelaghi delle Azzorre delle Canarie, l'isola di Madera e Capo-verde.



**Figura 12:** Distribuzione geografica della specie *G. unicolor* (www.fishbase.org).

Dal punto di vista morfologico la parte anteriore della testa è corta e generalmente depressa al di sotto del livello dell'orbita. La lunghezza della testa rappresenta il 12,1-12,5%. La testa è a forma di corta ogiva, generalmente depressa al di sotto del livello dell'orbita. L'ano è localizzato nella porzione mediana del corpo. La dentizione è complessa: comprende denti caniniformi aguzzi, denti trancianti aguzzi, denti submolariformi corti e massicci. Negli individui giovani, esistono dei denti di sostituzione, distesi sotto la pelle, secondo uno schema caratteristico per l'intera famiglia dei murenidi. La lingua è assente; le labbra sono densamente papillose.

La pinna dorsale è ben visibile, sebbene di altezza media; la pinna anale, di ridotta altezza, è tuttavia nettamente visibile; la pinna pettorale è assente. L'estremità anteriore della pinna dorsale si trova al livello del bordo antero-superiore della fessura branchiale. Il tronco è allungato, la distanza compresa tra il livello del bordo antero-superiore della fessura branchiale ed il livello dell'origine della pinna anale rappresenta circa il 31% della lunghezza totale del corpo.

Il numero caratteristico delle vertebre per *G. unicolor* varia da 136 a 146.

La colorazione generale è bruna più o meno scura, in alcuni punti striata; la parte anteriore del corpo, dietro l'apertura boccale, appare, talvolta, come zigrinata e la zigrinatura appare orlata di castano scuro, così come la parte intermedia tra il livello della fessura branchiale, è di un nettamente in risalto il colore della punta della mandibola. colore del corpo, leggermente



fessura branchiale. La della commisura boccale e oca chiaro che mette bruno scuro del muso e Le pinne sono dello stesso più scure nel bordo distale,

soprattutto nella pinna anale, che presenta una stretta orlatura di color oca chiaro.

Si nutre principalmente di crostacei, molluschi e pesci e ciò è dimostrato dai contenuti stomacali degli esemplari esaminati, che hanno rivelato la presenza di pezzi disintegrati di carapace e pinze di piccoli granchi ed alcuni opercoli di piccoli gasteropodi. Queste preferenze alimentari corrispondono bene alla complessa strategia di cacciatore-stritolatore che si è potuta evidenziare anche dalla dentizione.

### **Genere *Muraena***

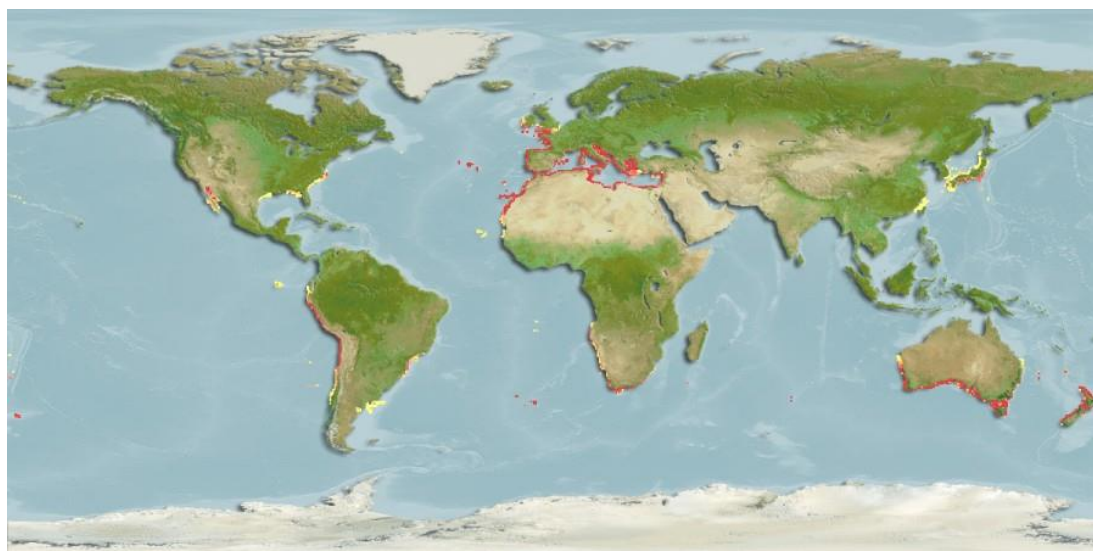
Il genere *Muraena* venne proposto da Artediè nel 1738, per l'insieme dei pesci Anguilliformi e adottato come tale da Lannè nel 1758 dopo aver effettuato la descrizione di *Muraena helena*. Tumberg a Ahl nel 1789 fecero una prima restrizione del genere riservandolo alle specie fornite di pinne pettorali. Jordan e Evermann proposero di restringere il genere *Muraena* al gruppo di specie che presentavano in comune con *Muraena helena* i seguenti caratteri: testa corta e massiccia, sempre alta; mascelle combacianti per tutta la lunghezza; denti caniniformi lunghi e aguzzi; la narice anteriore tubolare situata vicino all'estremità del muso; la narice posteriore ugualmente tubolare (lunga quanto o più di quella anteriore) e situata in prossimità dell'occhio, a livello del suo bordo anteriore e un poco di sotto del suo bordo superiore. Cuvier nel 1798 propose il termine *Murenophis* poi cambiato da Lacèpède nel 1803 in *Muraenophis* per l'insieme di quelle che chiamano le "Murènes", ma attualmente si segue la proposta di Jordan e Evermann utilizzando come specie tipo del genere *Muraena*: *Muraena helena*. Il genere *Muraena* è diffuso in tutti i mari e oceani temperati e tropicali (Blanche e Bauchot, 1972).

**Specie: *Muraena helena***

<b>PHYLUM</b>	<b>Chordata</b>
<b>SUBPHYLUM</b>	Vertebrata
<b>CLASSE</b>	Actinopterygii
<b>INFRACLASSE</b>	Teleostei
<b>ORDINE</b>	Anguilliformes
<b>FAMIGLIA</b>	Muraenidae
<b>SOTTOFAMIGLIA</b>	Muraeninae
<b>GENERE</b>	<i>Muraena</i>
<b>SPECIE</b>	<b><i>Muraena helena</i> (Linnaeus, 1758)</b>



Questa specie è presente nell'oceano Atlantico e nel Mediterraneo; sembrerebbe che il limite più a nord del suo habitat sia la punta occidentale della Gran Bretagna; verso sud è abbondante lungo le coste rocciose del Marocco, nell'arcipelago delle Azzorre, sulle coste del Sahara spagnolo, nell'arcipelago delle Canarie, l'isola di Madera, l'arcipelago di Capo Verde. *M. helena* possiede una distribuzione batimetrica che varia da 0 a 100 m.



**Figura 13:** Distribuzione geografica della specie *M. helena* ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

Questa specie presenta una straordinaria polimorfia, che nel corso degli anni ha determinato una forte diatriba nella classificazione e nella sistematica di questa specie, dovuta all'utilizzo dei semplici caratteri morfologici che la contraddistinguono. Le caratteristiche tipo di questa specie sono varie e differenti. Essa presenta un corpo allungato, alto, compresso anteriormente. Il tronco è molto allungato, la testa è corta, massiccia. Il profilo dorsale è regolarmente convesso, sino al livello della narice posteriore, dove un affossamento segna l'origine del muso,

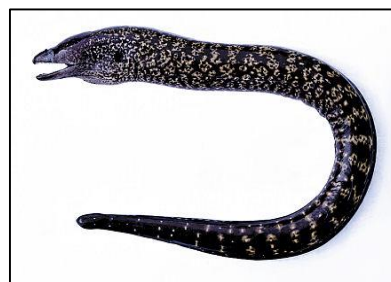
a sua volta regolarmente convesso. La lunghezza della testa è di 27.3-32.8% della distanza preanale e 12.7-15.3% della lunghezza totale del corpo. La narice anteriore è situata nelle vicinanze dell'estremità del muso e ha una forma tubulare: il tubo inalante, nettamente visibile, ha una lunghezza sensibilmente uguale alla metà del diametro oculare. La narice posteriore ha forma tubulare, di lunghezza uguale alla metà, o massimo ai due terzi di quella della narice tubulare. La narice posteriore è circondata da un cerchio di minuscole papille dermiche. Alle estremità cefaliche della linea laterale sono presenti due pori ben visibili, situati circa a metà distanza tra l'origine della pinna dorsale e il bordo inferiore della fessura branchiale. La serie dentaria è composta, essenzialmente, da denti caniniformi aguzzi e ben attaccati che formano una schiera semplice. La lingua è assente. Le pinne dorsale e anale ricoperte dalla pelle, formano un ripiegamento dermico ben visibile. Non è presente alcuna pinna pettorale. Le vertebre sono 139-143.

La colorazione è generalmente bruno-rossastra, variegata di giallo più o meno chiaro, con grandi variazioni individuali nel disegno in relazione all'habitat. Le branchie sono circondate da una macchia nera.

Per quanto riguarda la riproduzione, questa specie si riproduce generalmente in estate producendo uova da 5mm di diametro.

In inverno tende a spostarsi in acque più profonde. Possiede

un rapido accrescimento. Il suo habitat tipico sono scogliere e anfratti dov'è appunto nota la sua forte territorialità. Esce principalmente la notte per cacciare e si nutre principalmente di polpi e altri cefalopodi e di alcuni crostacei. Ha una gola estendibile e uno stomaco capiente. Le prede vengono ingoiate intere o a pezzi (Blanche e Bauchot, 1972).



### ***Citogenetica degli anguilliformi***

I Teleostei, che costituiscono circa il 96% dei pesci viventi, sono il più grande gruppo di vertebrati con più di 20.000 specie. Da prove paleontologiche, la radiazione dei teleostei sarebbe avvenuta circa 250 MAF e una duplicazione genomica è stata dimostrata alla base di tale radiazione, questa potrebbe aver favorito la grande diversificazione di questo taxon. Il superordine Elopomorpha, posto alla base della radiazione evolutiva dei teleostei è un taxon monofiletico (Inoue *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014) e comprende tra gli altri l'ordine Anguilliformes, che è anche quello più ricco di specie (circa 800). La suddivisione in sott'ordini è ancora controversa ma tutti gli studiosi concordano sulla monofilia del sott'ordine Murenoidei (Reece *et al.*, 2010; Tang e Fielitz, 2013) e da tutte le ricostruzioni filogenetiche la famiglia Muraenidae risulta la più basale (Inoue *et al.*, 2001; Obermiller e Pfeiler, 2003; Chen *et al.*, 2014).

Gli anguilliformi appaiono differenziarsi nella struttura del cariotipo rispetto alla situazione generale dei teleostei in cui un cariotipo composto da 48 cromosomi acrocentrici è la condizione ancestrale conservata nella maggior parte dei taxa (Mank e Avise, 2006). Dal punto di vista citogenetico è stato studiato circa il 5% delle specie, distribuite in 7 famiglie (Anguillidae, Congridae, Moringuidae, Muraenidae, Muraenosocidae, Ophichthidae, Sinaphobranchidae) (Klinckhardt *et al.*, 1995; Arai, 2011). La quantità di DNA (misurata su sole 11 specie) varia da 3 a 6 pg/nucleo. Il numero diploide varia da 26 a 50 con un valore modale di 38, altamente conservato nelle famiglie Anguillidae e Congridae. La struttura del cariotipo appare invece molto differenziata, infatti si va da una netta prevalenza di cromosomi acrocentrici a una netta prevalenza di cromosomi bi-bracci, con una generale tendenza alla presenza di un alto numero di cromosomi bi-bracci, particolarmente evidente nelle famiglie Ophichthidae e Muraenidae. Un'affinità filogenetica, basata sui patterns di bandeggio C e G, è stata proposta per le famiglie Anguillidae e Congridae (Salvadori *et al.*, 1994). Rispetto all'ordine Perciformes (il più ricco di specie tra i teleostei), caratterizzato da numero diploide basale di 48, molti cromosomi acrocentrici e un basso contenuto di eterocromatina (Molina, 2007), negli anguilliformi si osservano maggiormente grandi cromosomi meta-submetacentrici e acrocentrici e la presenza di bande cromosomiche strutturali che suggeriscono diversi livelli di organizzazione della cromatina (Bernardi e Bernardi, 1990; Salvadori *et al.*, 1997; Pichiri *et al.*, 2000; Salvadori *et al.*, 2003). Sebbene il pattern di distribuzione dell'eterocromatina sia conosciuto solo per poche specie di anguilliformi, i dati disponibili indicano la presenza di grossi blocchi eterocromatici in posizione pericentromerica, telomerica o che comprendono interi bracci (Deiana *et al.*, 1990; Vasconcelos e

Molina, 2009; Coluccia *et al.*, 2010). In questo taxon, processi di eterocromatinizzazione, insieme a riarrangiamenti cromosomici potrebbero avere avuto un ruolo importante nell'evoluzione del cariotipo e nella differenziazione tra specie (Salvadori *et al.*, 2003; Coluccia *et al.*, 2010). La presenza di cromosomi del sesso differenziati è stata riscontrata in diverse famiglie, ma in una percentuale molto bassa di specie anche se bisogna considerare che per molte specie non è stata indagata. Seguendo la tendenza generale dei teleostei, in questo ordine la determinazione del sesso non è una condizione fissata filogeneticamente, infatti nella stessa famiglia si possono osservare sia specie gonocoriche che ermafrodite, come nella famiglia Muraenidae (Fishelson, 1992).

Anche il tipo di cromosomi del sesso, quando presenti, può variare tra specie all'interno delle famiglie, da XX/XY a ZZ/ZW a sistemi di cromosomi multipli, come nella famiglia Ophichthidae (Arai, 2011).

Lo studio approfondito delle caratteristiche del cariotipo è reso difficile dalla difficoltà nell'ottenimento di bandeggi strutturali di tipo G, Q, R nei pesci, a differenza di altri vertebrati soprattutto mammiferi, a causa di una maggiore uniformità dell'organizzazione del genoma dei pesci privo o carente di quella compartimentalizzazione che sta alla base dei bandeggi strutturali (Bernardi e Bernardi, 1990). Poche sono le eccezioni tra cui, tra gli anguilliformi, le anguille atlantiche, *A. anguilla* e *A. rostrata* (Sola *et al.*, 1984). Un'alternativa è costituita dal bandeggio di replicazione, tecnica di più difficile realizzazione e perciò poco utilizzata nei pesci. Tra gli anguilliformi è stata utilizzata soprattutto nella famiglia Muraenidae.

Maggiormente utilizzato è lo studio delle regioni organizzatrici del nucleolo (NOR) soprattutto con la tecnica dell'impregnazione argentea (Ag-NOR); negli anguilliformi la presenza del NOR in un'unica coppia cromosomica è altamente conservata, con l'unica eccezione di tre coppie cromosomiche in *D. imberbis* (Salvadori *et al.*, 2009; Arai, 2011). Tecniche di citogenetica molecolare come la FISH sono state applicate a pochissime specie per la localizzazione dei geni ribosomiali 45S e 5S, delle sequenze telomeriche e di DNA ripetuto centromerico (Salvadori *et al.*, 1995, 2009; Pichiri, 2000; Coluccia *et al.*, 2010, 2011). Tramite questa tecnica è stato possibile evidenziare nelle due anguille atlantiche la presenza di sequenze telomeriche in posizione interstiziale intersperse con il DNA 45S (Salvadori *et al.*, 1995) mentre nel grongo (*C. conger*) è stata rilevata una colocalizzazione delle due famiglie geniche ribosomiali (Deiana *et al.*, 2006).

### ***Cariologia dei murenidi***

Gli studi cariologici su questa famiglia sono piuttosto scarsi, infatti solo 16 specie appartenenti a tre generi (meno del 10% delle specie esistenti) sono state studiate per struttura del cariotipo e/o dimensione del genoma (Tabella I). Inoltre per la maggior parte di esse gli studi riguardano solo la descrizione del cariotipo, la localizzazione dell'eterocromatina C positiva e/o degli Ag-NOR. Per due specie è nota solo la dimensione del genoma.

La famiglia Muraenidae è l'unica tra gli anguilliformi a discostarsi dal modello generale di 38 cromosomi, infatti la quasi totalità delle specie analizzate ha un numero diploide di 42 cromosomi, con un'unica specie, *Gymnothorax kidako*, che presenta 36 cromosomi (Takai, e Ojima, 1986; Arai, 2011). Per contro, la struttura del cariotipo è altamente differenziata, come mostrato dal numero di bracci (o numero fondamentale, NF) che varia da 42 in *G. pictus* a 84 in *G. miliaris* (Tabella I), e cospicui riarrangiamenti cromosomici sono stati osservati in diverse specie (Salvadori *et al.*, 2003; Vasconcelos e Molina, 2009; Coluccia *et al.*, 2010). La presenza di cromosomi sessuali, del tipo XX/XY, è stata segnalata solamente in una specie, *G. eurostus* (Takai e Ojima, 1986). Bisogna considerare che la biologia riproduttiva in questa famiglia è ancora poco nota e un evidente dimorfismo sessuale è noto solo per la specie *Rhinomuraena quaesita*. Inoltre da studi istologici sono state riscontrate sia specie gonocoriche che ermafrodite, e tra queste ultime sia proterandriche, che proteroginiche che sufficienti (Fishelson, 1992).

L'eterocromatina costitutiva è stata localizzata nella maggior parte delle specie mediante bandeggio C e blocchi C-positivi sono riportati per molte murene.

La caratterizzazione delle coppie cromosomiche è stata ottenuta in *M. helena*, *G. unicolor* e *G. tile* attraverso le bande di replicazione e il loro confronto ha dimostrato la conservazione di alcune coppie e il verificarsi di riarrangiamenti cromosomici, come inversioni pericentriche, in altre (Salvadori *et al.*, 2003; Coluccia *et al.*, 2010). La regione organizzatrice del nucleolo, studiata prevalentemente mediante impregnazione argenticca, è stata localizzata in un'unica coppia cromosomica in tutte le specie, con localizzazione prevalentemente terminale e ma anche interstiziale in due specie (Cau *et al.*, 1988; Deiana *et al.*, 1990; Porto-Foresti *et al.*, 2005; Vasconcelos e Molina, 2009; Coluccia *et al.*, 2010). In *M. helena* e *G. unicolor* è stato dimostrato come un'inversione pericentrica coinvolgente il NOR potrebbe rendere conto della diversa localizzazione (Deiana *et al.*, 1990; Salvadori *et al.*, 2003).

Negli ultimi decenni gli studi citogenetici sui pesci sono notevolmente migliorati dall'uso dell'ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) che consente la localizzazione di specifiche sequenze di DNA. L'applicazione di questa tecnica ai murenidi è, tuttavia, ancora limitata. Ad

oggi, la FISH è stata utilizzata per la localizzazione del DNA ribosomiale 45S, di sequenze centromeriche e telomeriche di *M. helena*, *G. unicolor* e *G. tile* (Salvadori *et al.*, 1995; Pichiri *et al.*, 2000; Coluccia *et al.*, 2010, 2011). I dati finora a disposizione sono troppo scarsi per uno studio citotassonomico della famiglia e necessitano di un ampliamento dell'indagine ad altre specie della famiglia, prendendo in considerazione anche generi ancora non studiati. Inoltre l'applicazione di tecniche di citogenetica molecolare ad un maggior numero di specie potrebbe essere di grande utilità nello studio dell'evoluzione del cariotipo.

**Tabella I.** Dati cariologici sulla famiglia Muraenidae; 2n (numero diploide), NF (numero bracci); ER (enzimi di restrizione)

Specie	DNA pg/nucleo	2n	NF*	Cr sesso	AgNOR	Bande C	Bande ER	Bande replicazione	Bande fluorescenza	FISH	Referenze bibliografiche
<i>G. eurostus</i>		42	54	XX/XY	2	X	X	X			Takai e Ojima, 1985; 1986
<i>G. funebris</i>		42	52			X					Alves <i>et al.</i> , 2014
<i>G. kidako</i>		36	60		2	X					Takai e Ojima, 1985; 1986; Takai, 2007
<i>G. miliaris</i>		42	84		2	X	X	X			Vasconcelos <i>et al.</i> , 2009
<i>G. moringa</i>	4,8										Hinegardner e Rosen, 1972
<i>G. nigromarginatus</i>	5,0										Hinegardner e Rosen, 1972
<i>G. ocellatus</i>		42	76	absent	2						Porto-Foresti <i>et al.</i> , 2005
<i>G. pictus</i>		42	42								Rishi, 1973
<i>G. pictus</i>	3,8	42	70								Khuda-Bukhsh <i>et al.</i> , 1995
<i>G. reevesi</i>		42	76								Rong <i>et al.</i> , 1991
<i>G. tile</i>	5,32	42	76		2					X	Coluccia <i>et al.</i> , 2010a
<i>G. unicolor</i>	4,4	42	54	absent	2	X	X	X	X	X	Deiana <i>et al.</i> , 1990; Salvadori <i>et al.</i> , 1997; Pichiri <i>et al.</i> , 2000; Salvadori <i>et al.</i> , 2003; Coluccia <i>et al.</i> , 2011
<i>G. vicinus</i>		42	56		2	X					Vasconcelos <i>et al.</i> , 2009
<i>Enchelycore nigricans</i>		42	68	absent	2	X					Vasconcelos <i>et al.</i> , 2009
<i>E. pardalis</i>	4,6	42	52		2	X					Takai e Ojima, 1985; 1986; Ojima e Yamamoto, 1990; Takai, 2007
<i>Muraena helena</i>	5,1	42	60	absent	2	X	X	X	X	X	Cau <i>et al.</i> , 1988; Salvadori <i>et al.</i> , 1995; Pichiri <i>et al.</i> , 1995; Ronchetti <i>et al.</i> , 1995; Pichiri <i>et al.</i> , 2000; Salvadori <i>et al.</i> , 2003; Vasconcelos <i>et al.</i> , 2009
<i>M. pavonina</i>		42	52		2	X					Vasconcelos <i>et al.</i> , 2009

## **Bibliografia:**

- Adachi, J., Watanabe, K., Fukui, K., Ohmido, N., & Kosuge, K.** (1997). Chromosomal location and reorganization of the 45S and 5S rDNA in the *Brachyscome lineariloba* complex (Asteraceae). *Journal of Plant Research*, 110(3), 371–377.
- Almada, V. C., Pérez-Portela, R., Robalo, J. I., & Brito, A.** (2009). Phylogenetic relationships of *Gymnothorax bacalladoi* Böhlke and Brito (1987) a poorly known moray of the Macaronesian islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(1), 252–256.
- Aota, S., & Ikemura, T.** (1986). Diversity in G+C content at the third position of codons in vertebrate genes and its cause. *Nucleic Acids Research*, 14(16), 6345–6355.
- Arai, R.** (2011). *Fish karyotypes: a check list*. Springer Science & Business Media.
- Arambourg C.** (1927). *Les poissons fossiles d'Oran. Matériaux pour la carte géologique d'Algérie, 1ère série, Paléontologie 6*.
- Arnheim, N.** (1983). Concerted evolution of multigene families. *Evolution of Genes and Proteins*.
- Baker, W. J., Hedderson, T. A., & Dransfield, J.** (2000). Molecular phylogenetics of *Calamus* (Palmae) and related rattan genera based on 5S nrDNA spacer sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(2), 218–231.
- Belkhir, A., Buchko, J., & Klassen, G. R.** (1992). The 5S ribosomal RNA gene in *Pythium* species: two different genomic locations. *Molecular Biology and Evolution*, 9(6), 1089–1102.
- Benton, M. J.** (1993). *The fossil record 2*. Chapman & Hall London.
- Bernardi, G., & Bernardi, G.** (1990). Compositional transitions in the nuclear genomes of cold-blooded vertebrates. *Journal of Molecular Evolution*, 31(4), 282–293.
- Blanche, J. Bauchot, M. L.** (1972). Contribution à la connaissance des Poissons Anguilliformes de la cote occidentale d'Afrique 1972. *Bulletin dell'I.F.A.N.*, 3, 692–696.
- Böhlke, E.** (1989). *Fishes of the Western North Atlantic: Orders Anguilliformes and Saccopharyngiformes/Ed. Eugenia B. Böhlke*. Sears Foundation for Marine Research, Yale Univ.
- Bohlke, E. B., & McCosker, J. E.** (2001). The moray eels of Australia and New Zealand, with the description of two new species (Anguilliformes: Muraenidae). *RECORDS-AUSTRALIAN MUSEUM*, 53(1), 71–102.
- Böhlke, E. B., & Randall, J. E.** (2000). A review of the moray eels (Anguilliformes: Muraenidae) of the Hawaiian Islands, with descriptions of two new species. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 203–278.
- Böhlke, E. B., & Smith, D. G.** (2002). Type catalogue of Indo-Pacific Muraenidae. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 152(1), 89–172.
- Brock, R. E.** (1972). *A Contribution to the Biology of Gymnothorax Javanicus (Bleeker)*.
- Cabral-de-Mello, D. C., Moura, R. C., & Martins, C.** (2010). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and a complement. *Heredity*, 104(4), 393–400.
- Canapa, A., Cerioni, P. N., Barucca, M., Olmo, E., & Caputo, V.** (2002). A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chromosome Research*, 10(4), 297–304.
- Capriglione, T., Cardone, A., Odierna, G., & Olmo, E.** (1994). Further data on the occurrence and evolution of satellite DNA families in the lacertid genome. *Chromosome Research*, 2(4), 327–330.
- Cau, A., Salvadori, S., Deiana, A. M., Bella, J. L., & Mezzanotte, R.** (1988). The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions, and in situ digestion with restriction endonucleases. *Cytogenetic and Genome Research*, 47(4), 223–226.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P., & Stephan, W.** (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes.
- Chen, J., López, J. A., Lavoué, S., Miya, M., & Chen, W.** (2014). Molecular Phylogenetics and Evolution Phylogeny of the Elopomorpha (Teleostei): Evidence from six nuclear and mitochondrial markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 152–161. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.09.002>
- Coluccia, E., Maria, A., Libertini, A., Salvadori, S., Coluccia, E., Deiana, A. M., Salvadori, S.** (2010). Cytogenetic characterization of the moray eel *Gymnothorax tile* and chromosomal banding comparison in Muraenidae (Anguilliformes) *Marine Biology Research*, 6(1), 106–111.

- Coluccia, E., Pichiri, G., Nieddu, M., Coni, P., Manconi, S., Deiana, A. M.** (2011). Identification of two new repetitive elements and chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in the fish *Gymnothorax unicolor* (Anguilliformes : Muraenidae). *European Journal of Histochemistry*, 55(2), 12.
- Crease, T. J., & Lynch, M.** (1991). Ribosomal DNA variation in *Daphnia pulex*. *Mol. Biol. Evol.*, 8(5), 620–640.
- Deiana, A. M., Coluccia, E., Cannas, R., Pesci, P., Fonnesu, A., & Salvadori, S.** (2006). Colocalization of the ribosomal gene families in *Conger conger* (Anguilliformes, Congridae). *Italian Journal of Zoology*, 73(01), 1–5.
- Deiana, A. M., Salvadori, S., & Cau, A.** (1990). The characterization of somatic chromosomes of *Gymnothorax unicolor* (Delaroche, 1809) by C-banding and NOR staining (Osteichthyes, Anguilliformes). *Genetica*, 81(1), 17–20.
- Deichmann, W. B., MacDonald, W. E., Cubit, D. A., Wunsch, C. E., Bartels, J. E., & Merritt, F. R.** (1977). Pain in jawbones and teeth in ciguatera intoxications. *Fla. Sci.*, 40(3), 227–237.
- Dennis, H., & Wegnez, M.** (1977). Oocytes and liver cells of the teleost fish *Tinca tinca* contain different kinds of 5S rRNA. *Devl Biol*, 59, 228–236.
- Devlin, R. H., McNeil, B. K., Groves, T. D. D., & Donaldson, E. M.** (1991). Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(9), 1606–1612.
- Dover, G. A.** (1989). Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. *Genetics*, 122(1), 249.
- Drouin, G., & De Sa, M. M.** (1995). The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Molecular Biology and Evolution*, 12(3), 481–493.
- Eickbush, T. H., & Eickbush, D. G.** (2007). Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, 175(2), 477–485.
- Evans, H. J., Buckland, R. A., & Pardue, M. Lou.** (1974). Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma*, 48(4), 405–426.
- Ferreira, I. A., & Martins, C.** (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, 39(4), 411–418.
- Fishelson, L.** (1992). Comparative gonad morphology and sexuality of the Muraenidae (Pisces, Teleostei). *Copeia*, 197–209.
- Froese, R., & Pauly, D.** (2012). Fishbase (www database). *World Wide Web Electronic Publications*. Available at: [Http://www. Fishbase. Org](http://www.fishbase.org) (accessed June 2012).
- Gaudant, J.** (2002). La crise messinienne et ses effets sur l'ichthyofaune néogène de la Méditerranée: le témoignage des squelettes en connexion de poissons téléostéens. *Geodiversitas*, 24(3), 691–710.
- Goldman, M. A., Holmquist, G. P., Gray, M. C., Caston, L. A., & Nag, A.** (1984). Replication timing of genes and middle repetitive sequences. *Science*, 224(4650), 686–692.
- Goodpasture, C., & Bloom, S. E.** (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53(1), 37–50.
- Gornung, E., De Innocentiis, S., Annesi, F., & Sola, L.** (2000). Zebrafish 5S rRNA genes map to the long arms of chromosome 3. *Chromosome Research*, 8(4), 362.
- Gregory, T. R., Nicol, J. A., Tamm, H., Kullman, B., Kullman, K., Leitch, I. J., Bennett, M. D.** (2007). Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl 1), D332–D338.
- Gross, M. C., Schneider, C. H., Valente, G. T., Porto, J. I. R., Martins, C., & Feldberg, E.** (2009). Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 127(1), 43–53.
- Günther, A.** (1870). Catalogue of the Fishes in the British Museum. 8. Catalogue of the Physostomi containing the families Gymnotidae, Symbranchidae, Muraenidae, Pegasidae and of the Lophobranchii, Plectognathi, Dipnoi, Ganoidei, Chondropterygii, Cyclostomata, Leptocardii in the collection of the British Museum. *Catalog Fish*, 8, 1–549.
- Hadjiolov, A. A.** (1985). *Ribosome biogenesis in the life cycle of normal and cancer cells*. Springer.
- Hallenberg, C., & Frederiksen, S.** (1994). Characterization of 5S rRNA genes from mouse. *Gene*, 142(2), 291–295.
- Hanson, R. E., Islam-Faridi, M. N., Percival, E. A., Crane, C. F., Ji, Y., McKnight, T. D., Price, H. J.** (1996). Distribution of 5S and 18S–28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative

- diploid ancestors. *Chromosoma*, 105(1), 55–61.
- Heitz, E.** (1931). Die ursache der gesetzmässigen zahl, lage, form und grösse pflanzlicher nukleolen. *Planta*, 12(4), 775–844.
- Hiatt, R. W., & Strasburg, D. W.** (1960). Ecological relationships of the fish fauna on coral reefs of the Marshall Islands. *Ecological Monographs*, 30(1), 65–127.
- Howell, W. M., Denton, T. E., & Diamond, J. R.** (1975). Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 31(2), 260–262.
- Inafuku, J., Nabeyama, M., Kikuma, Y., Saitoh, J., Kubota, S., & Kohno, S.** (2000). Chromosomal location and nucleotide sequences of 5S ribosomal DNA of two cyprinid species (Osteichthyes, Pisces). *Chromosome Research*, 8(3), 193–199.
- Inoue, J. G., Miya, M., Tsukamoto, K., & Nishida, M.** (2001). A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(2), 275–285.
- Inoue, J. G., Miya, M., Tsukamoto, K., & Nishida, M.** (2004). Mitogenomic evidence for the monophyly of elopomorph fishes (Teleostei) and the evolutionary origin of the leptocephalus larva. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1), 274–286.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L.** (1985). Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, 314(6006), 67–73.
- Jensen, L. R., & Frederiksen, S.** (2000). The 5S rRNA genes in *Macaca fascicularis* are organized in two large tandem repeats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1492(2), 537–542.
- Jiménez, S., Schönhuth, S., Lozano, I. J., González, J. A., Sevilla, R. G., Diez, A., Buth, D.** (2007). Morphological, ecological, and molecular analyses separate *Muraena augusti* from *Muraena helena* as a valid species. *Copeia*, 2007(1), 101–113.
- Johnson, G. D., Ida, H., Sakaue, J., Sado, T., Asahida, T., & Miya, M.** (2012). A “living fossil” eel (Anguilliformes: Protanguillidae, fam. nov.) from an undersea cave in Palau. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279(1730), 934–943.
- Jones, William, M. D.** (1982). Presentation given at the Waikiki Aquarium, April 14, 1982.
- Kazazian, H. H. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, 303(5664), 1626–1632.
- Kedes, L. H.** (1979). Histone genes and histone messengers. *Annual Review of Biochemistry*, 48(1), 837–870.
- Kidwell, M. G.** (2005). Transposable elements. *The Evolution of the Genome*, 165–221.
- King, M., Contreras, N., & Honeycutt, R. L.** (1990). Variation within and between nucleolar organizer regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+ 28S in-situ hybridization. *Genetica*, 80(1), 17–29.
- Klinkhardt, M., Tesche, M., & Greven, H.** (1995). *Database of fish chromosomes*. Westarp Wissenschaften.
- Komiya, H., Hasegawa, M., & Takemura, S.** (1986). Differentiation of oocyte- and somatic-type 5S rRNAs in animals. *Journal of Biochemistry*, 100(2), 369–374.
- Korn, L. J., & Brown, D. D.** (1978). Nucleotide sequence of *Xenopus borealis* oocyte 5S DNA: comparison of sequences that flank several related eucaryotic genes. *Cell*, 15(4), 1145–1156.
- Krämer, A.** (1985). 5 S Ribosomal Gene Transcription during *Xenopus* Oogenesis. In *Oogenesis* (pp. 431–451). Springer.
- Kuiter, R. H.** (1998). *Photo guide to fishes of the Maldives*. Sea Challengers.
- Lanfredi, M., Congiu, L., Garrido-Ramos, M. A., dela Herrán, R., Leis, M., Chicca, M., Rejón, M. R.** (2001). Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Research*, 9(1), 47–52.
- Lansdorp, P. M., Verwoerd, N. P., Van De Rijke, F. M., Dragowska, V., Little, M.-T., Dirks, R. W., Tanke, H. J.** (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Human Molecular Genetics*, 5(5), 685–691.
- Leah, R., Frederiksen, S., Engberg, J., & Sørensen, P. D.** (1990). Nucleotide sequence of a mouse 5S rRNA variant gene. *Nucleic Acids Research*, 18(24), 7441.
- Li, Y., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E.** (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11(12), 2453–2465.
- Lieske, E., & Myers, R.** (1994). Collins pocket guide. *Coral Reef Fishes. Indo-Pacific & Caribbean Including the Red Sea*. Haper Collins Publishers, 400.
- Loh, K.-H., Chen, I.-S., Randall, J. E., & Chen, H.-M.** (2008). A review and molecular phylogeny of the moray eel subfamily Uropterygiinae (Anguilliformes: Muraenidae) from Taiwan, with description of a new species.

- Raffles Bulletin of Zoology*, 19, 135–150.
- Long, E. O., & Dawid, I. B.** (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49(1), 727–764.
- Louzada, S., Paço, A., Kubickova, S., Adegá, F., Guedes-Pinto, H., Rubes, J., & Chaves, R.** (2008). Different evolutionary trails in the related genomes *Cricetus cricetus* and *Peromyscus eremicus* (Rodentia, Cricetidae) uncovered by orthologous satellite DNA repositioning. *Micron*, 39(8), 1149–1155.
- Mank, J. E., & Avise, J. C.** (2006). Phylogenetic conservation of chromosome numbers in Actinopterygian fishes. *Genetica*, 127(1-3), 321–327.
- Martins, C., & Galetti Jr, P. M.** (2001). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*, 111(1-3), 439–446.
- Martins, C., & Galetti, P. M.** (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers, 910, 903–910.
- Martins, C., & Wasko, A. P.** (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. *Focus on Genome Research*, 335–363.
- Martins, C., Wasko, A. P., Oliveira, C., Porto-Foresti, F., Parise-Maltempi, P. P., Wright, J. M., & Foresti, F.** (2003). Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenetic and Genome Research*, 98(1), 78–85.
- Martins, C., Wasko, A. P., Oliveira, C., & Wright, J. M.** (2000). Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the Tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Hereditas*, 133(1), 39–46.
- Martins, C. cavalcanti Cabrall -de-Mello D, Targino Valente G, Mazzuchelli J, G. de O. S.** (2010). *Cytogenetic mapping and contribution to the knowledge of animal genomes. Advances in genetics research* 4, 1-81.
- Mashkova, T. D., Serenkova, T. I., Mazo, A. M., Avdonina, T. A., Timofeyeva, M. Y., & Kisselev, L. L.** (1981). The primary structure of oocyte and somatic 5S rRNAs from the loach *Misgurnus fossilis*. *Nucleic Acids Research*, 9(9), 2141–2152.
- McClintock, B.** (1934). The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 21(2), 294–326.
- Medrano, L., Bernardi, G., Couturier, J., Dutrillaux, B., & Bernardi, G.** (1988). Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromosoma*, 96(2), 178–183.
- Mehta, R. S.** (2009). Ecomorphology of the Moray Bite: Relationship between Dietary Extremes and Morphological Diversity\*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(1), 90–103.
- Meyne, J., Baker, R. J., Hobart, H. H., Hsu, T. C., Ryder, O. A., Ward, O. G., Moyzis, R. K.** (1990). Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, 99(1), 3–10.
- Mighell, A. J., Smith, N. R., Robinson, P. A., & Markham, A. F.** (2000). Vertebrate pseudogenes. *FEBS Letters*, 468(2), 109–114.
- Miyahara, J. T., Akau, C. K., & Yasumoto, T.** (1979). Effects of ciguatoxin and maitotoxin on the isolated guinea pig atria. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 25(1), 177–180.
- Molina, W. F.** (2007). Chromosomal changes and stasis in marine fish groups. *Fish Cytogenetics*, 69–110.
- Moran, P., Martinez, J. L., Garcia-Vazquez, E., & Pendas, A. M.** (1996). Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetic and Genome Research*, 75(2-3), 145–150.
- Murakami, M., & Fujitani, H.** (1998). Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). *Genes & Genetic Systems*, 73(1), 9–20.
- Nagoda, N., Fukuda, A., Nakashima, Y., & Matsuo, Y.** (2005). Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect Molecular Biology*, 14(6), 713–717.
- Nakamura, M.** (2009). Sex determination in amphibians. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 20, pp. 271–282). Elsevier.
- Nakayama, I., Foresti, F., Tewari, R., Schartl, M., & Chourrout, D.** (1994). Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma*, 103(1), 31–39.
- Nanda, I., Feichtinger, W., Schmid, M., Schröder, J. H., Zischler, H., & Epplen, J. T.** (1990). Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. *Journal of Molecular*

- Evolution*, 30(5), 456–462.
- Nelson, G. J.** (1966). Gill arches of teleostean fishes of the order Anguilliformes.
- Nelson, J. S.** (2006). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.
- Nielsen, P. E., & Egholm, M.** (1999). An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol*, 1(1-2), 89–104.
- Obermiller, L. E., & Pfeiler, E.** (2003). Phylogenetic relationships of elopomorph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(2), 202–214.
- Pardue, M. Lou, & Gall, J. G.** (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168(3937), 1356–1358.
- Paulasova, P., Andréo, B., Diblík, J., Macek, M., & Pellestor, F.** (2004). The peptide nucleic acids as probes for chromosomal analysis: application to human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos. *Molecular Human Reproduction*, 10(6), 467–472.
- Pellestor, F., Andréo, B., Taneja, K., & Williams, B.** (2003). PNA on human sperm: a new approach for in situ aneuploidy estimation. *European Journal of Human Genetics*, 11(4), 337–341.
- Pendás, A. M., Moran, P., Freije, J. P., & Garcia-Vazquez, E.** (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 67(1), 31–36.
- Pendas, A. M., Moran, P., Martínez, J. L., & Garcia-Vazquez, E.** (1995). Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon brown trout hybrid identification. *Molecular Ecology*, 4(2), 275–276.
- Pichiri, G., Coni, P., Deiana, A. M., Nieddu, M., & Mezzanotte, R.** (2000). On the variability of MboI repeated sequences and 5S rDNA in *Muraena helena* and *Gymnothorax unicolor* (Anguilliformes, Muraenidae). *Chromosome Research*, 8(5), 443–445.
- Porto-Foresti, F., Oliveira, C., & Foresti, F.** (2005). First chromosome characterization in the Neotropical eel, *Gymnothorax ocellatus* (Pisces, Muraenidae). *Cytologia*, 70(3), 283–286.
- Prokopowich, C. D., Gregory, T. R., & Crease, T. J.** (2003). The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 46(1), 48–50.
- Randall, J. E., & Golani, D.** (1995). Review of the moray eels (Anguilliformes: Muraenidae) of the Red Sea. *Bulletin of Marine Science*, 56(3), 849–880.
- Ray, A., & Nordén, B.** (2000). Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *The FASEB Journal*, 14(9), 1041–1060.
- Rayner, M. D.** (1970). Marine toxins from the Pacific. VII: Recent advances in the pharmacology of ciguatoxin. *Food and Drugs from the Sea*. Washington DC, Marine Technological Society.
- Reece, J., Larson, A., & Chase, J. M.** (2010). Phylogenetics and Phylogeography of Moray Eels (Muraenidae), (January).
- Rocco, L., Russo, C., Stingo, V., Aprea, G., & Odierna, G.** (1999). Characterisation of 5S rDNA in *Gasterosteus aculeatus* (Teleostei, Gasterosteidae).
- Russel P. J.** (2007). “Genetica” II edizione, *EdiSES S.r.*, 35.
- Sajdak, S. L., Reed, K. M., & Phillips, R. B.** (1998). Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *Journal of Molecular Evolution*, 46(6), 680–688.
- Salvadori, S., Cau, A., Coluccia, E., Milia, A., & Deiana, A. M.** (1994). Karyotype, C-and G-banding, and nucleolar organizer regions of *Conger conger* (osteichthyes, anguilliformes). *Italian Journal of Zoology*, 61(1), 59–63.
- Salvadori, S., Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., & Deiana, A. M.** (2003). Replication banding in two Mediterranean moray eels: chromosomal characterization and comparison. *Genetica*, 119(3), 253–258.
- Salvadori, S., Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., & Deiana, A. M.** (2009). A ZZ–ZW sex chromosome system in the finless eel *Dalophis imberbis* (Anguilliformes, Ophichtidae). *Genetica*, 135(3), 283–288.
- Salvadori, S., Deiana, A., Elisabetta, C., Florida, G., Rossi, E., & Zuffardi, O.** (1995). Colocalization of (TTAGGG) n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Research*, 3(1), 54–58.
- Salvadori, S., Deiana, A. M., Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., & Milia, A.** (1997). Heterochromatin distribution and structure in *Gymnothorax unicolor* (Anguilliformes, Muraenidae). *Italian Journal of Zoology*, 64(2), 125–129.
- Santini, F., Kong, X., Sorenson, L., Carnevale, G., Mehta, R. S., & Alfaro, M. E.** (2013). A multi-locus

- molecular timescale for the origin and diversification of eels (Order: Anguilliformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3), 884–894.
- Schueler, M. G., Higgins, A. W., Rudd, M. K., Gustashaw, K., & Willard, H. F.** (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science*, 294(5540), 109–115.
- Schwarzacher, H. G., Mikelsaar, A.-V., & Schnedl, W.** (1978). The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenetic and Genome Research*, 20(1-6), 24–39.
- Smith, A. G., Smith, D. G., & Funnell, B. M.** (2004). *Atlas of Mesozoic and Cenozoic coastlines*. Cambridge University Press.
- Smith, D. G.** (2012). *A checklist of the moray eels of the world (Teleostei: Anguilliformes: Muraenidae)* (Vol. 64).
- Sogin, M. L., Hinkle, G., & Leipe, D. D.** (1993). Universal tree of life. *Nature*, 362(6423), 795.
- Sola, L., Camerini, B., and Cataudella, S.** (1984). Cytogenetics of Atlantic eels: C- and G- banding, nucleolus organizer regions, and DNA content. *Cytogenet. Cell Genet.*, 589–598.
- Stein, J., Phillips, R. B., & Devlin, R. H.** (2001). Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenetic and Genome Research*, 92(1-2), 108–110.
- Sumner, A. T.** (1990). *Chromosome banding*. Allen & Unwin Australia.
- Sumner, A. T.** (2003). Euchromatin and the Longitudinal Differentiation of Chromosomes. *Chromosomes: Organization and Function*, 117–132.
- Suzuki, H., Moriwaki, K., & Sakurai, S.** (1994). Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs. *Molecular Biology and Evolution*, 11(4), 704–710.
- Takai, A Ojima, Y.** (1986). Some features on nucleolus organizer regions in fish chromosomes. In *Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the Second International Conference of Indo Pacific Fishes* (pp. 899–909). Ichthyological Society of Japan.
- Taneja, K. L., Chavez, E. A., Coull, J., & Lansdorp, P. M.** (2001). Multicolor fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for enumeration of specific chromosomes in human cells. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 30(1), 57–63.
- Tang, K. L., & Fielitz, C.** (2013). Phylogeny of moray eels (Anguilliformes: Muraenidae), with a revised classification of true eels (Teleostei: Elopomorpha: Anguilliformes). *Mitochondrial DNA*, 24(1), 55-66.
- Taylor, F. J. R.** (1979). Description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. *Developments in Marine Biology*.
- Tjio, J. H., & Levan, A.** (1956). The chromosome number of man. *Hereditas*, 42(1-2), 1–6.
- Vasconcelos, M., & Molina, W. F.** (2009). Cytogenetical studies in five Atlantic Anguilliformes fishes. *Genetics and molecular biology*, 32(1), 83-90.
- Ventura, K., O'Brien, P. C. M., Yonenaga-Yassuda, Y., & Ferguson-Smith, M. A.** (2009). Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four Akodon species (Rodentia, Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. *Chromosome Research*, 17(8), 1063–1078.
- Vitelli, L., Batistoni, R., Andronico, F., Nardi, I., & Barsacchi-Pilone, G.** (1982). Chromosomal localization of 18S+ 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse anuran amphibians. *Chromosoma*, 84(4), 475–491.
- Wasko, A. P., Martins, C., Wright, J. M., & Galetti Jr, P. M.** (2001). Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus Brycon. *Genome*, 44(5), 893–902.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., Panaud, O.** (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8(12), 973–982.



## ***Obiettivi della tesi***

Obiettivo di questo lavoro è l'approfondimento della caratterizzazione citogenetica della famiglia Muraenidae al fine di ricostruire l'evoluzione del cariotipo e fornire utili informazioni per la tassonomia.

In particolare, ha riguardato i seguenti aspetti:

- 1) La determinazione del numero cromosomico e lo studio della struttura del cariotipo in sei specie di murene: *Echidna nebulosa*, *Gymnomuraena zebra*, *Gymnothorax fimbriatus*, *Gymnothorax flavimarginatus*, *Gymnothorax javanicus* e *Gymnothorax undulatus*, mediante l'ottenimento di preparati cromosomici a partire da colture cellulari di linfociti e successiva colorazione delle piastre metafasiche con il colorante di Wright.
- 2) Lo studio sulla distribuzione dell'eterocromatina costitutiva, mediante l'applicazione del bandeggio C. Tale bandeggio può risultare utile anche per la cariotipizzazione e caratterizzazione di molte coppie cromosomiche, nonché per la costruzione degli idiogrammi delle varie specie, rappresentativi del cariotipo.
- 3) Lo studio della localizzazione, mediante l'applicazione dell'ibridazione *in situ* in fluorescenza, dei siti cromosomici contenenti le famiglie geniche ribosomiali, di cui la maggiore (rDNA 45S) corrispondente alla regione organizzatrice del nucleolo (NOR), e la minore, generalmente separata, che contiene i geni che codificano per l'RNA ribosomiale 5S. In particolare il NOR, rappresentando una delle regioni cromosomiche più importanti e studiate sia dal punto di vista dell'organizzazione strutturale e funzionale, sia sotto il profilo dei rapporti filogenetici all'interno di ordini e famiglie, verrà localizzato anche mediante la tecnica dell'impregnazione argentea, mentre per la localizzazione della famiglia genica ribosomiale minore nelle specie *G. fimbriatus*, *G. flavimarginatus*, *G. javanicus*, *G. unicolor* e *M. helena* verrà attuato un approccio di studio di tipo molecolare (estrazione del DNA, amplificazione mediante PCR, clonaggio molecolare, sequenziamento per l'ottenimento di sonde specie-specifiche).
- 4) La localizzazione della sequenza telomerica ripetuta (TTAGGG)<sub>n</sub>, altamente conservata in tutti i Vertebrati. L'eventuale presenza di sequenze telomeriche in posizione intercalare sui cromosomi può fornire informazioni utili su riarrangiamenti cromosomici avvenuti durante l'evoluzione del cariotipo.



# **CAPITOLO 1**

***Caratterizzazione citogenetica e distribuzione  
dell'eterocromatina in sei specie di murene Indopacifiche  
(Anguilliformes: Muraenidae)***

La famiglia Muraenidae è una grande famiglia cosmopolita appartenente all'ordine Anguilliformes (Actinopterygii), che attualmente comprende 16 generi e circa 200 specie di murene diffuse in acque tropicali e subtropicali (Smith, 2012). Nonostante la loro abbondanza e la loro importanza ecologica come predatori, le murene rimangono animali poco studiati (Böhlke e Smith, 2002; Smith, 2012). La famiglia Muraenidae è considerata una famiglia ancestrale di anguilliformi che ha avuto origine nel Pacifico 34-54 milioni di anni fa (Obermiller e Pfeiler, 2003; Wang *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2012) e ha attraversato un evento di diversificazione principale nel tardo Oligocene e Pliocene, che era accompagnato da ripetute invasioni dell'Oceano Atlantico dal nativo Pacifico (Reece *et al.*, 2010). Recenti studi filogenetici pur confermando la monofilia della famiglia Muraenidae e il riconoscimento di due sottofamiglie distinte (Muraeninae e Uropterygiinae), non supportano invece la suddivisione nei generi attualmente riconosciuti (Jiménez *et al.*, 2007; Loh *et al.*, 2008; Almada *et al.*, 2009; Reece *et al.*, 2010; Santini *et al.*, 2013; Tang e Fielitz, 2013). In particolare, il genere *Gymnothorax*, il più ricco di specie della famiglia (circa 120) sembra essere un taxon non-monofiletico.

La citogenetica, studiando la diversificazione cromosomica tra le specie, è potenzialmente in grado di fornire importanti informazioni, utili per chiarire le controversie nella sistematica, tassonomia e filogenesi dei murenidi. Ad oggi, la struttura del cariotipo è conosciuta solo per 14 specie, e per la maggior parte di esse sono disponibili solo i patterns di bandeggio C e la posizione dei siti Ag-NOR (Coluccia *et al.*, 2010; Arai, 2011; Alves *et al.*, 2014). Tra le specie della famiglia si osserva un'elevata conservazione del numero cromosomico diploide di 42; tuttavia, in diverse specie, sono stati osservati riarrangiamenti cromosomici che potrebbero rendere conto di una grande differenziazione della struttura del cariotipo (Salvadori *et al.*, 2003; Vasconcelos e Molina, 2009; Coluccia *et al.*, 2010).

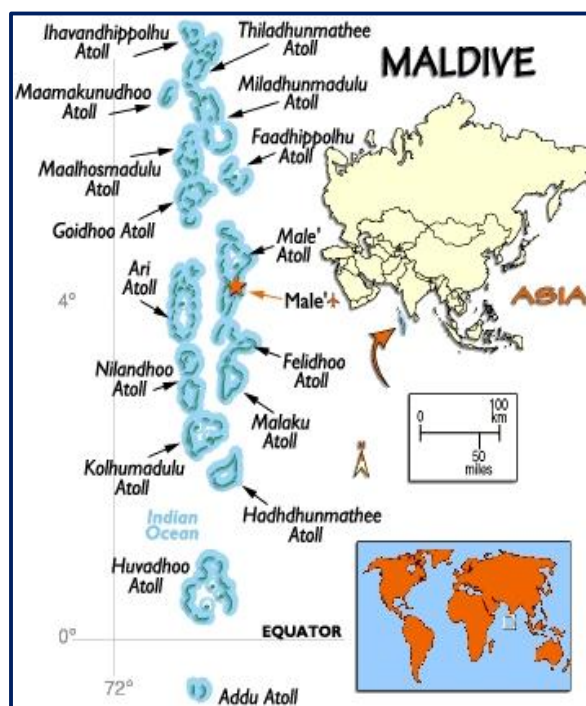
Al fine di fornire nuove informazioni cariologiche per la genomica comparativa, questo studio estende l'analisi citogenetica a sei murene dell'Indo-Pacifico (sottofamiglia Muraeninae). Quattro appartengono al genere più ricco di specie della famiglia: *Gymnothorax fimbriatus* (Bennet 1832), *Gymnothorax flavimarginatus* (Rüppell 1830), *Gymnothorax javanicus* (Bleeker 1859) e *Gymnothorax undulatus* (Lacépède 1803). Le altre due specie incluse in questo studio, *Echidna nebulosa* (Ahl 1789) e *Gymnomuraena zebra* (Shaw 1797), appartengono a due generi che non sono mai stati esaminati citogeneticamente (*Echidna* e *Gymnomuraena*).

In questo studio sono state applicate tecniche di citogenetica classica come la colorazione di Wright e il bandeggio C, al fine di analizzare la struttura del cariotipo e la distribuzione dell'eterocromatina.

## Materiali e Metodi

### Campionamento

I campioni utilizzati per questo lavoro provengono da un campionamento effettuato nella barriera corallina della parte meridionale dell'atollo di Male Nord, nelle isole Maldive (oceano Indiano) (coordinate geografiche:  $4^{\circ}5'14.00''\text{N}$ - $73^{\circ}34'02.93''\text{E}$ ;  $4^{\circ}19'00.90''\text{N}$ - $73^{\circ}28'00.47''\text{E}$ ), ad una profondità di 2-5 metri, tutti catturati mediante lenza con esca, in seguito ad un progetto avvenuto nel 2010. In particolare sono stati pescati: due esemplari di *E. nebulosa* (entrambe femmine), un esemplare di *G. zebra* (di sesso indeterminato), due esemplari di *G. fimbriatus* (un maschio e uno di sesso indeterminato), un esemplare di *G. flavimarginatus* (femmina), otto esemplari di *G. javanicus* (tre femmine, un maschio e quattro di sesso indeterminato), e quattro esemplari di *G. undulatus* (tutte femmine), per un totale di 18 individui. Non essendo presente dimorfismo sessuale, alcuni esemplari sono stati sacrificati per il riconoscimento del sesso, mediante una overdose di anestesia, senza causare dolore, e il sesso è stato determinato dall'osservazione macroscopica e l'analisi istologica delle gonadi. I campioni sono stati raccolti in accordo con la legislazione ambientale Maldiviana (Research Permission OTHR/30 INDIV/2010/1163). Le colture cellulari sono state effettuate in un laboratorio "da campo", allestito *in loco* e le piastre metafasiche, da cui sono stati ricavati i dati cariologici, sono state ottenute mediante allestimento di colture di sangue.



**Figura 1:** Zona di campionamento.

## **Procedimento per l'allestimento delle colture di sangue**

Gli esemplari sono stati anestetizzati in acqua di mare contenente come anestetico il metansulfonato di 3-aminobenzoato di etile (0,2%) (Sigma Aldrich). È stato poi effettuato un prelievo di sangue dall'arteria dorsale mediante una siringa eparinata; quattro/cinque gocce di sangue intero (circa 200 µl) sono stati aggiunti ad un terreno di coltura composto da 8 ml di RPMI 1640 (GIBCO), 2 ml di siero bovino fetale (GIBCO), 0,1 ml di penicillina-streptomina (GIBCO), 0,1 ml di fitoemoagglutinina (M GIBCO), 0,1 ml di L-glutamina 200 mM, (GIBCO). Le colture sono state incubate a 28°C per 72 ore, quindi è stata aggiunta Colcemid GIBCO ad una concentrazione finale di 0,12 µg/ml per 1 ora e mezza. Le colture sono state centrifugate a 1200 rpm per 6 minuti, sottoposte a shock ipotonico per rompere le membrane cellulari con KCl 0,075 M a 32°C per 30 minuti. I preparati sono stati quindi centrifugati a 1000 rpm per 6 min. e, dopo aver aspirato il surnatante, il pellet è stato fissato secondo il metodo Terzoli che prevede l'uso in successione di tre reagenti: miscela di Ibrahimov (92 ml di H<sub>2</sub>O distillata, 3 ml di alcool metilico, 5 ml di acido acetico), alcool metilico puro, fissativo di Carnoy (metanolo:acido acetico glaciale, 3:1). Dopo ogni passaggio i preparati sono stati centrifugati a 1200 rpm per 6 min. ed è stato eliminato il surnatante.

Per allestire i vetrini, due o tre gocce del preparato sono state fatte cadere, con una pipetta Pasteur, su un vetrino portaoggetti. I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico in contrasto di fase per la ricerca delle piastre metafasiche e successivamente trattati con colorazioni differenti. Più di 80 piastre metafasiche sono state analizzate per ciascuna specie di murena.

## **Colorazione di Wright**

I cromosomi metafasici sono stati colorati mediante il colorante di Wright, colorante nucleare che evidenzia indistintamente tutta la cromatina. Il colorante in polvere viene sciolto in alcool metilico (0,25 g in 100 ml) e dopo completa solubilizzazione, che richiede circa un'ora, la soluzione viene incubata per 48-72 ore a 37° C. I vetrini vengono colorati immergendoli nella soluzione diluita 1:3 in tampone fosfato 1/15 M (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O) a pH 6.8, per 9 minuti.

## **Costruzione dei cariogrammi**

I vetrini sono stati osservati tramite microscopio Zeiss Axiophot e le piastre metafasiche sono state acquisite al computer con fotocamera Hamamatsu tramite l'utilizzo di un software di

cariotipizzazione Cromowin Plus (TESI IMAGING). Dalle piastre metafasiche sono stati ritagliati ed appaiati i cromosomi omologhi, ottenendo diversi cariogrammi per ogni specie. Avvalendosi dello stesso software, per ogni cariogramma, sono state misurate le lunghezze relative (L.R.) e l'indice centromerico (I.C.) di ogni coppia cromosomica. La lunghezza relativa viene calcolata come lunghezza percentuale del singolo cromosoma rispetto alla lunghezza totale del genoma aploide, ed è necessaria perchè i differenti gradi di contrazione della cromatina, nelle diverse piastre metafasiche, rendono di difficile utilizzo la misurazione delle lunghezze assolute di ogni cromosoma. L'indice centromerico viene calcolato come rapporto percentuale tra la lunghezza del braccio corto (l) e la lunghezza totale del cromosoma (lt), ed è indicato nell'espressione sottostante:

$$\text{I.C.} = l \times 100 / l_t$$

Sono stati selezionati almeno dieci cariogrammi per specie.

Riportando i valori delle L.R. e I.C. di ogni cariogramma nel software di elaborazione dati Excel, sono state calcolate le medie delle L.R. e I.C. di ciascuna coppia e le medie delle lunghezze relative del braccio corto e del braccio lungo di ogni coppia cromosomica, calcolata in base ai valori degli indici centromerici. I dati ottenuti hanno permesso di costruire due istogrammi, dove nel primo è stata riportata la media delle L.R di ciascuna coppia cromosomica, mentre nel secondo la media degli I.C.

In base a questi dati è stato costruito l'idiogramma che rappresenta graficamente le caratteristiche di ciascuna coppia cromosomica; utilizzando un apposito software di elaborazione grafica Photoshop.

Le coppie cromosomiche sono state classificate come metacentriche, submetacentriche, subtelocentriche o acrocentriche in accordo con Levan *et al.* (1964). L'indice centromerico varia da 0 a 50: da 0 a 12,5 i cromosomi sono considerati acrocentrici (centromero in posizione mediana); da 12,5 a 25 subtelocentrici (centromero in posizione submediana); da 25 a 37,5 submetacentrici (centromero in posizione subterminale); da 37,5 a 50 metacentrici (centromero in posizione terminale).

Il numero di bracci (numero fondamentale, NF) è stato calcolato contando i metacentrici e i submetacentrici come bi-bracci e gli acrocentrici come mono-bracci, come proposto da Phillips e Rab (2001) per i salmonidi.

**Bandeggio C**

Il bandeggio C è stato effettuato secondo la tecnica di Cau *et al.* (1988) su vetrini invecchiati sette giorni: questi sono stati immersi in una soluzione di HCl 1N a temperatura ambiente per 3 minuti, incubati in una soluzione di Ba(OH)<sub>2</sub> (0.05g/ml) per 3 min. a 50°C, dopo averli risciacquati alternativamente in H<sub>2</sub>O distillata e in HCl 0,1 N per 6 volte e poi incubati a 60°C per 60 min. in una soluzione di 2xSSC (NaCl 1.7 g% e Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 0,82 g%) a pH 7. I vetrini sono stati infine colorati con il colorante di Wright diluito 1:2 in tampone per 9-10 minuti.

Le piastre metafasiche sono state osservate con un microscopio ZEISS Axio Imager.M1 e acquisite al computer tramite telecamera digitale HAMAMATSU utilizzando il software dedicato CROMOWIN PLUS (TESI Imaging).

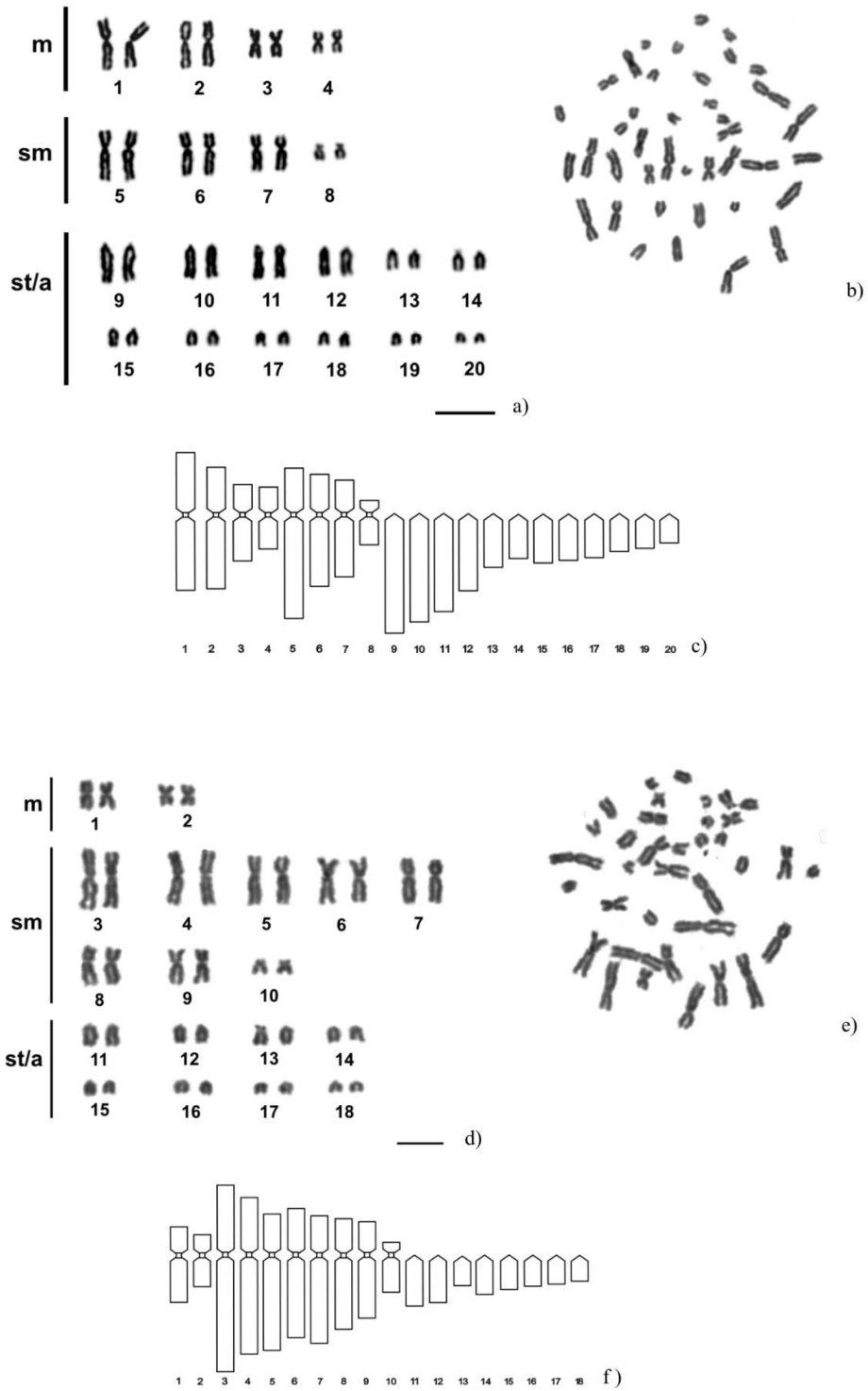
## ***Risultati***

### **Descrizione del cariotipo**

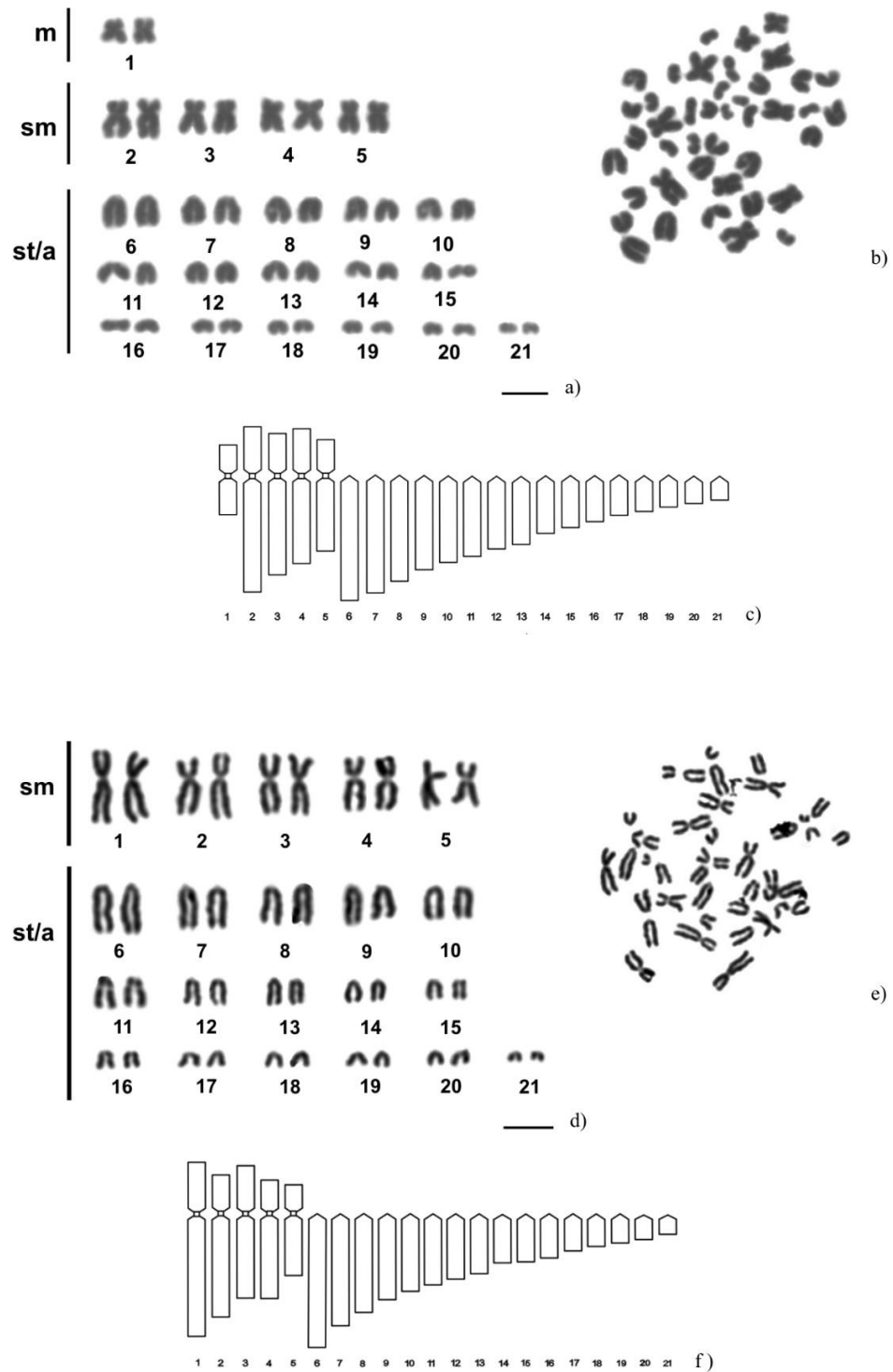
Le coppie cromosomiche sono state ordinate nel cariotipo, in tre gruppi: uno costituito dai cromosomi metacentrici, uno dai cromosomi submetacentrici e l'ultimo costituito dai cromosomi acrocentrici e subtelocentrici. All'interno dei tre gruppi i cromosomi sono stati disposti in ordine lunghezza decrescente.

Per quanto riguarda la specie *G. javanicus*, l'unica per la quale sono stati analizzati sia individui di sesso maschile che femminile, non sono state osservate differenze nel cariotipo tra esemplari di sesso diverso, ed il cariotipo è risultato caratterizzato da un numero cromosomico diploide di 40, e costituito da 4 coppie di cromosomi metacentrici, 4 di submetacentrici e 12 di subtelo/acrocentrici [Figura 2 (a)]. Per quanto riguarda invece *G. flavimarginatus*, è stato stabilito un numero cromosomico diploide pari a  $2n = 36$ , e un cariotipo composto da 2 coppie di cromosomi metacentrici, 8 coppie di submetacentrici e 8 coppie di subtelo/acrocentrici [Figura 2 (d)]. Il cariotipo di *G. fimbriatus* è risultato composto da 42 cromosomi comprendenti 1 coppia di cromosomi metacentrici, 4 coppie di cromosomi submetacentrici e 16 coppie di cromosomi acrocentrici [Figura 3 (a)] e quello di *G. undulatus* ugualmente con  $2n=42$ , è costituito da 5 coppie di cromosomi submetacentrici e 16 coppie di cromosomi acrocentrici [Figura 3 (d)]. Il cariotipo di *E. nebulosa* è risultato composto da 42 cromosomi di cui 3 coppie di cromosomi metacentrici, 8 coppie di cromosomi submetacentrici e 10 coppie di cromosomi subtelo-acrocentrici [Figura 4 (a)] e, infine, nella specie *G. zebra*, con numero cromosomico diploide sempre pari a  $2n=42$  il cariotipo risulta composto da 9 coppie di submetacentrici e 12 coppie di subtelo/acrocentrici [Figura 4 (d)].

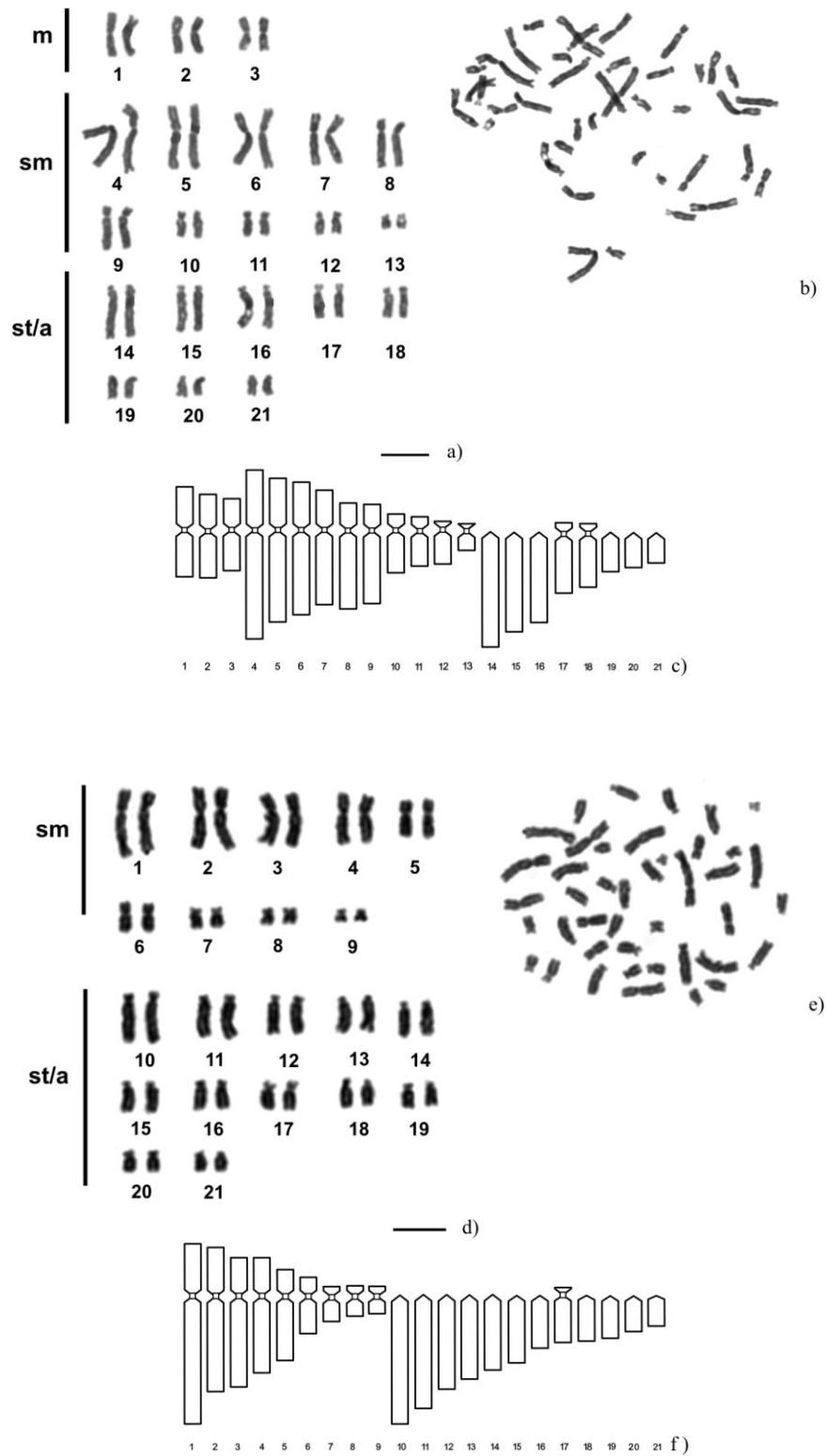
Utilizzando le medie delle misurazioni del braccio corto e braccio lungo, ricavate dal programma Excel, è stato costruito l'idiogramma del genoma aploide di ogni singola specie, mediante il software di elaborazione grafica CorelDraw [Figure: 2 (c) (f), 3 (c) (f), 4 (c) (f)].



**Figura 2:** Cariogrammi di *G. javanicus* (a) e *G. flavimarginatus* (d) dopo colorazione di Wright e relative piastre metafasiche (b, e); idiogrammi di *G. javanicus* (c) e di *G. flavimarginatus* (f); m=cromosomi metacentrici, sm=cromosomi submetacentrici, st=cromosomi subtelocentrici, a=cromosomi acrocentrici). La barra rappresenta 5 µm.



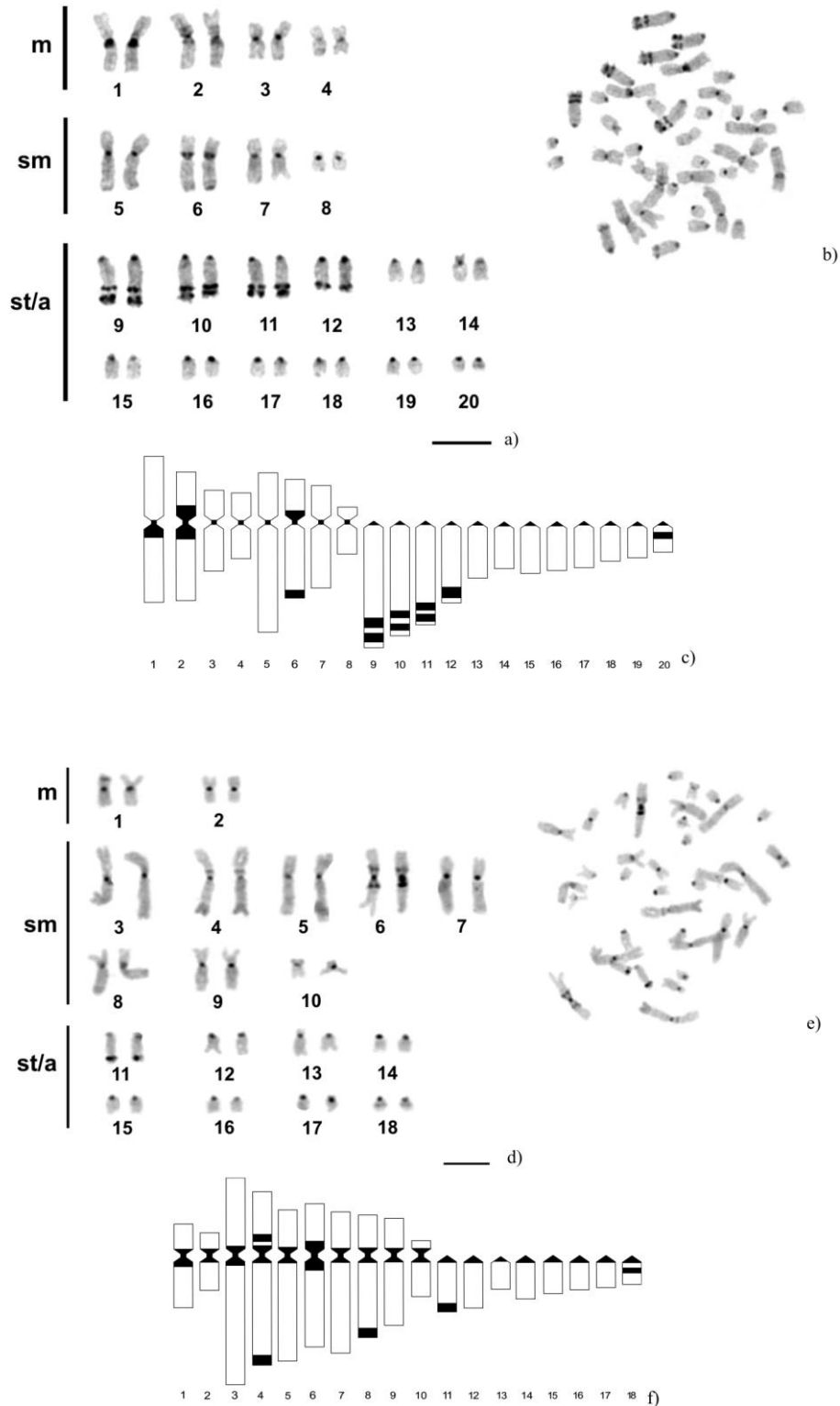
**Figura 3:** Cariogrammi di *G. fimbriatus* (a) e *G. undulatus* (d) dopo colorazione di Wright e relative piastre metafasiche (b, e); idiogrammi di *G. fimbriatus* (c) e di *G. undulatus* (f); m=cromosomi metacentrici, sm=cromosomi submetacentrici, st=cromosomi subtelocentrici, a=cromosomi acrocentrici). La barra rappresenta 5 µm.



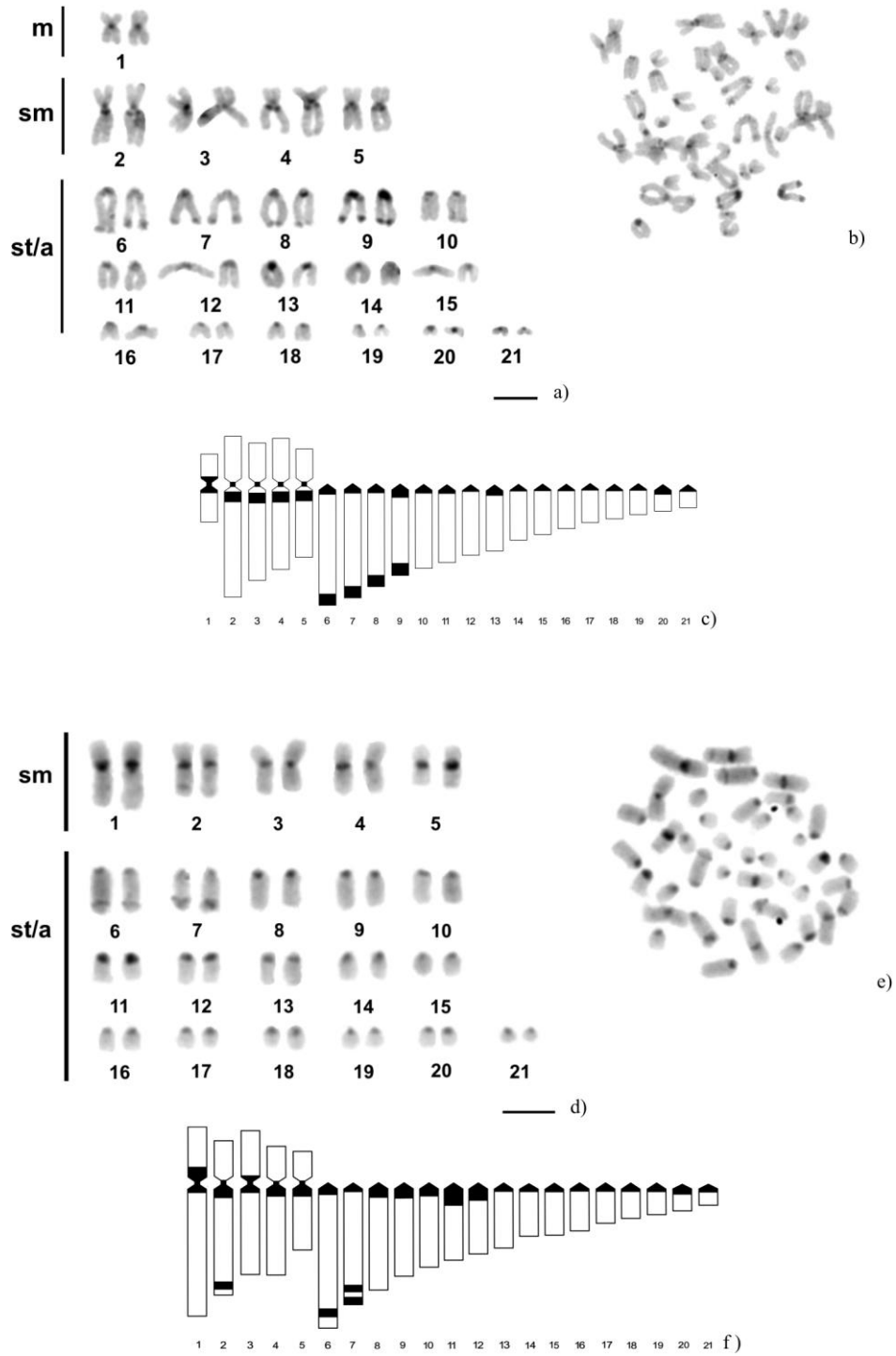
**Figura 4:** Cariogrammi di *E. nebulosa* (a) e *G. zebra* (d) dopo colorazione di Wright e relative piastre metafasiche (b, e); idiogrammi di *E. nebulosa* (c) e di *G. zebra* (f); m=cromosomi metacentrici, sm=cromosomi submetacentrici, st=cromosomi subtelocentrici, a=cromosomi acrocentrici). La barra rappresenta 5 µm.

## **Bandeggio C**

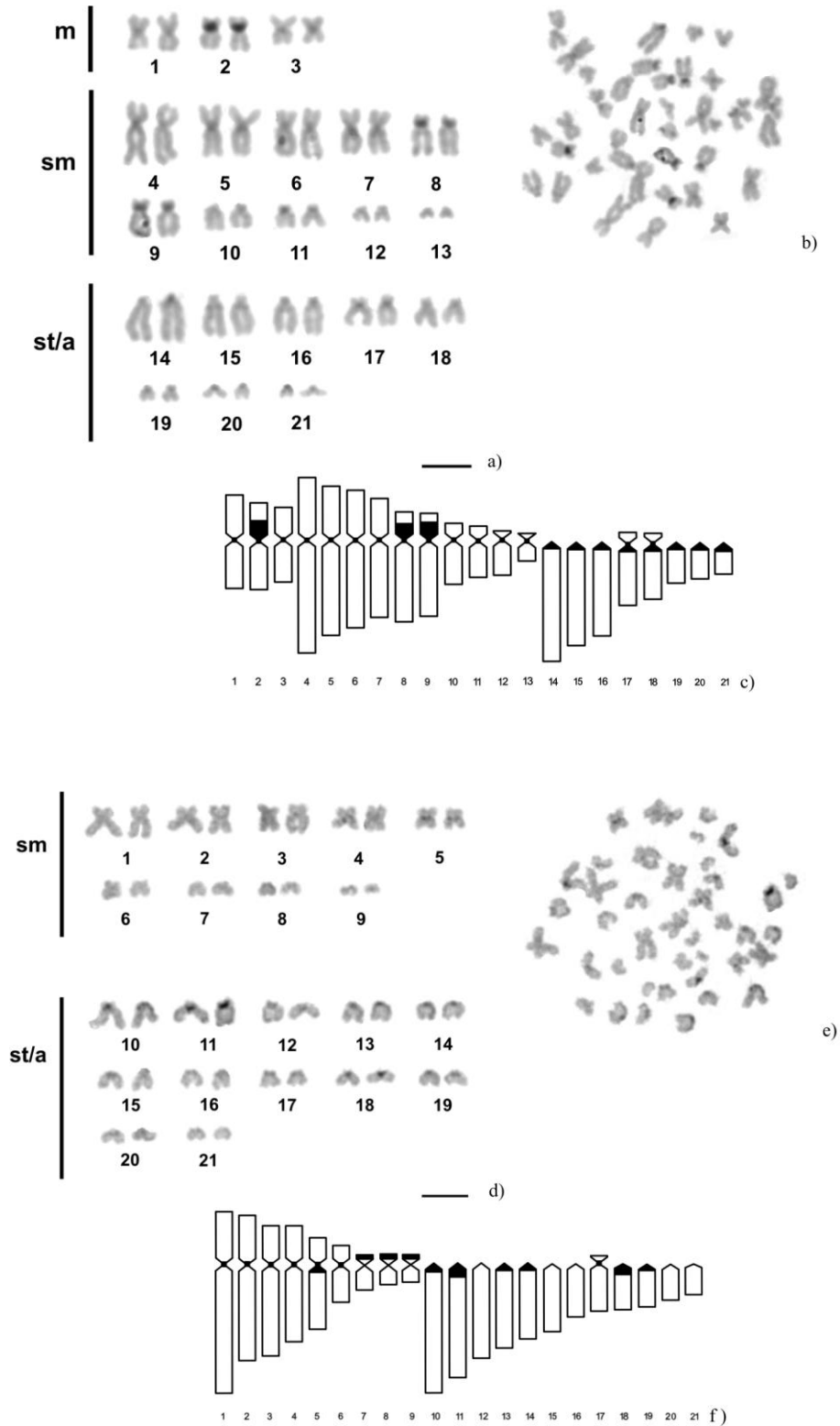
Dopo la tecnica del bandeggio C sono state evidenziate bande eterocromatiche in posizione centromerica sui cromosomi di tutte le specie. Inoltre, sono stati rilevati blocchi eterocromatici C-positivi specie-specifici in ogni specie studiata. In particolare in *G. javanicus*, grossi blocchi C-positivi sono stati rilevati nelle aree paracentromeriche e pericentromeriche dei cromosomi 1, 2 e 6, e nelle regioni telomeriche e subtelomeriche dei bracci lunghi dei cromosomi 6 e 9-12 (Figura 5 a, b, c). In *G. flavimarginatus*, le bande C sono risultate essere localizzate nelle regioni prossimali di ambedue i bracci del cromosoma 6, nel braccio corto del cromosoma 4 e interstizialmente nel braccio lungo del cromosoma 18. Inoltre, una banda distale è stata spesso rilevata nel braccio corto di un omologo della coppia cromosomica n. 1 (Figura 5 d, e, f). In *G. fimbriatus*, l'eterocromatina C-positiva è risultata essere localizzata nelle regioni prossimali dei bracci lunghi dei cromosomi 2-5 e 9, e nelle regioni telomeriche dei cromosomi 6-9 (Figura 6 a, b, c). In *G. undulatus*, le bande C sono risultate localizzate nelle aree paracentromeriche dei cromosomi 1-5 e 11, e nelle regioni telomeriche-subtelomeriche dei cromosomi 2, 6 e 7 (Figura 6 d, e, f). In *E. nebulosa*, sono state osservate regioni C-positive nel braccio corto dei cromosomi 2, 8 e 9 (Figura 7 a, b, c) e in *G. zebra*, l'eterocromatina è risultata localizzata solo nelle regioni centromeriche e paracentromeriche di molti cromosomi (Figura 7 d, e, f).



**Figura 5:** Cariogrammi di *G. javanicus* (a) e *G. flavimarginatus* (d) dopo bandeggio C e relative piastre metafasiche (b, e); idiogrammi rappresentanti le bande C di *G. javanicus* (c) e di *G. flavimarginatus* (f); m=cromosomi metacentrici, sm=cromosomi submetacentrici, st=cromosomi subtelocentrici, a=cromosomi acrocentrici). La barra rappresenta 5 µm.



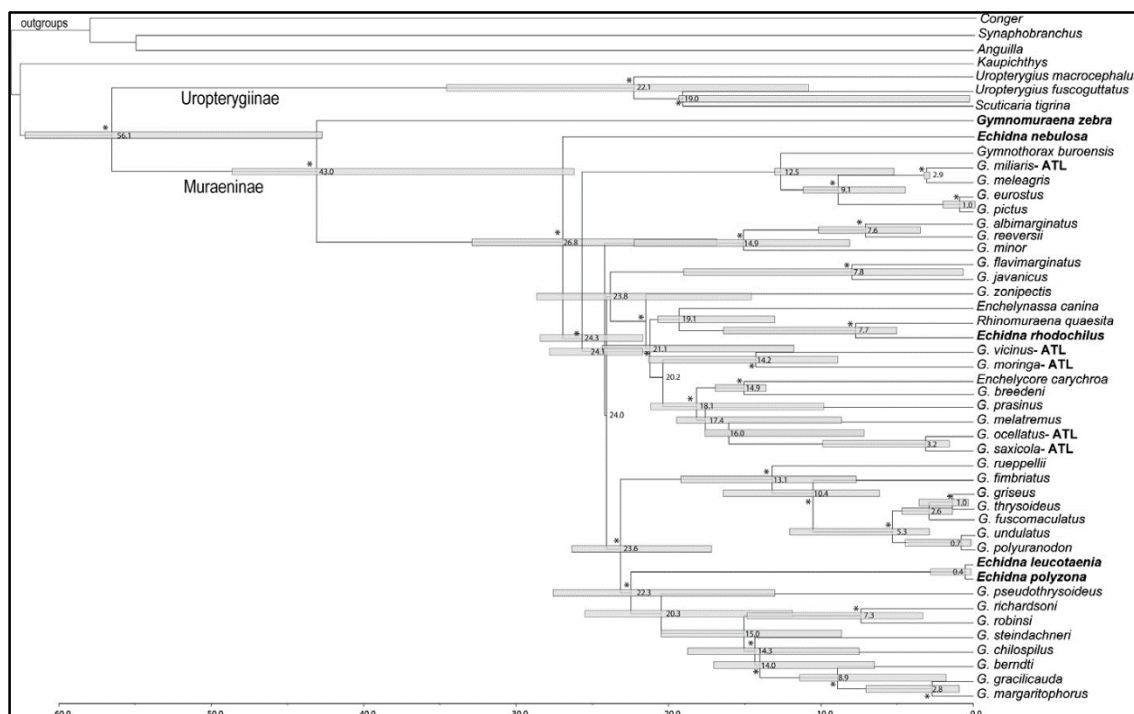
**Figura 6:** Cariogrammi di *G. fimbriatus* (a) e *G. undulatus* (d) dopo bandeggio C e relative piastre metafasiche (b, e); idiogrammi rappresentanti le bande C di *G. fimbriatus* (c) e di *G. undulatus* (f); m=cromosomi metacentrici, sm=cromosomi submetacentrici, st=cromosomi subtelocentrici, a=cromosomi acrocentrici). La barra rappresenta 5 µm.



**Figura 7:** Cariogrammi di *E. nebulosa* (a) e *G. zebra* (d) dopo bandeggio C e relative piastre metafasiche (b, e); idiogrammi rappresentanti le bande C di *E. nebulosa* (c) e di *G. zebra* (f); m=cromosomi metacentrici, sm=cromosomi submetacentrici, st=cromosomi subtelocentrici, a=cromosomi acrocentrici). La barra rappresenta 5 µm.

## Discussione

In questo studio, quattro delle sei specie di murene analizzate hanno evidenziato lo stesso numero cromosomico ( $2n=42$ ). Un cariotipo composto da 42 cromosomi potrebbe essere considerata la condizione ancestrale per la famiglia Muraenidae, essendo la condizione più frequentemente riscontrata e più diffusa tra tutti i generi finora studiati. Un più basso numero diploide riscontrato in *G. flavimarginatus* ( $2n=36$ ), era stato precedentemente riportato nella murena *Gymnothorax kidako* (Takai e Ojima, 1986) (Tabella II). Tuttavia i dati citogenetici su *G. flavimarginatus* sono stati ottenuti da una singola femmina e di conseguenza sarebbero necessari ulteriori studi su altri esemplari per confermare il numero diploide di questa specie. Il numero cromosomico diploide di  $2n=40$  riscontrato in *G. javanicus* in questo studio, non era stato riportato in questa famiglia. La riduzione del numero diploide riscontrata in *G. javanicus*, *G. flavimarginatus* e *G. kidako* è compatibile con recenti ricostruzioni filogenetiche molecolari che pongono queste specie in una posizione derivata (Reece *et al.*, 2010; Santini *et al.*, 2013; Tang e Fielitz, 2013) (Figura 8).



**Figura 8:** Filogenesi dei murenidi (Reece *et al.*, 2010)

Contrariamente ad altre famiglie di teleostei come la famiglia Serranidae, caratterizzata da un cariotipo altamente conservato (Molina, 2007), nella famiglia Muraenidae, nonostante la conservazione del numero diploide, i dati qui riportati, confermano una struttura del cariotipo altamente diversificata, come indicato dall'ampio range del numero di bracci (NF) che varia da

42 in *G. pictus* a 84 in *G. miliaris* (Rishi, 1973; Vasconcelos e Molina, 2009) (Tabella I). In studi precedenti le variazioni nel numero di bracci, sono state correlate alla presenza di inversioni pericentriche e a variazioni della quantità di eterocromatina (Salvadori *et al.*, 2003). I risultati di questo studio suggeriscono la presenza di ulteriori riarrangiamenti cromosomici quali fusioni Robertsoniane. In particolare la variazione nel numero cromosomico diploide tra *G. javanicus* ( $2n=40$ ) e *G. flavimarginatus* ( $2n=36$ ), ma non nel numero di bracci (NF=56 per entrambi) potrebbe essere dovuta ad una fusione centrica che ha coinvolto quattro coppie di cromosomi acrocentrici che si sono uniti a formare due coppie di cromosomi bi-bracci. Una stretta correlazione tra queste due specie è stata evidenziata da una filogenesi molecolare basata su geni mitocondriali e nucleari, con un tempo di divergenza tra di loro minore di 10 milioni di anni (Reece *et al.*, 2010).

Per la maggior parte delle specie qui studiate è stata rilevata una grossa quantità di eterocromatina costitutiva, con patterns di bande C specie-specifici che hanno permesso un migliore appaiamento dei cromosomi omologhi. La presenza di grossi blocchi eterocromatici, localizzati principalmente in posizione pericentromerica e telomerica, sembra essere una caratteristica comune per la famiglia Muraenidae (Cau *et al.*, 1988; Salvadori *et al.*, 1997; Porto-Foresti *et al.*, 2005; Vasconcelos e Molina, 2009; Alves *et al.*, 2014). Le variazioni in quantità, posizione e proprietà dell'eterocromatina tra specie suggeriscono che l'eterocromatina costitutiva possa giocare un ruolo importante nell'evoluzione del cariotipo nella famiglia Muraenidae, come già dimostrato per la famiglia Cyprinidae (Ueda *et al.*, 2001). In generale, è noto che l'eterocromatina possa direttamente determinare riarrangiamenti cromosomici (Raskina *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2010). Allo stesso modo, in questo studio, la peculiare presenza in *G. javanicus* di due bande C positive sub-telomeriche nelle più grandi coppie di cromosomi acrocentrici potrebbe essere derivata da duplicazioni che hanno coinvolto l'eterocromatina telomerica. La presenza di un'unica banda telomerica nelle grandi coppie di cromosomi acrocentrici, è stata precedentemente riportata per *M. helena* e *G. tile* (Cau *et al.*, 1988; Coluccia *et al.*, 2010).

**Tabella I:** Dati citogenetici sulla famiglia Muraenidae; 2n (numero diploide), NF (numero di bracci), m (cromosomi metacentrici), sm (submetacentrici), st (subtelocentrici), a (acrocentrici).

Specie	2n	NF	Formula cariotipica	Cromosomi del sesso	Referenze bibliografiche
<i>Echidna nebulosa</i>	42	68	6m+20sm+16st/a		presente studio
<i>Gymnomuraena zebra</i>	42	60	18sm+24st/a		presente studio
<i>Gymnothorax fimbriatus</i>	42	52	2m+8sm+32a		presente studio
<i>G. undulatus</i>	42	52	10sm+32 st/a		presente studio
<i>G. javanicus</i>	40	56	8m+8sm+24 st/a	absent	presente studio
<i>G. flavimarginatus</i>	36	56	4m+16sm+16a		presente studio
<i>G. eurostus</i>	42	54	12m-sm+30a	XY	Takai & Ojima, 1985
<i>G. funebris</i>	42	52	6m+4sm+32a		Alves <i>et al.</i> , 2014
<i>G. kidako</i>	36	60	16m+8sm+12a		Takai & Ojima, 1985
<i>G. miliaris</i>	42	84	14m+18sm+10st		Vasconcelos e Molina, 2009
<i>G. ocellatus</i>	42	76	16m+18sm+8a	absent	Porto-Foresti <i>et al.</i> , 2005
<i>G. pictus</i>	42	42	42a		Rishi, 1973
<i>G. pictus</i>	42	70	14m+14sm+14a		Khuda-Buksh <i>et al.</i> , 1995
<i>G. reevesi</i>	42	76	34m-sm + 8a		Rong <i>et al.</i> , 1991
<i>G. tile</i>	42	76	34m-sm + 8a		Coluccia <i>et al.</i> , 2010
<i>G. unicolor</i>	42	54	12m-sm + 30a	absent	Deiana <i>et al.</i> , 1990
<i>G. vicinus</i>	42	56	8m + 6sm + 28a		Vasconcelos e Molina, 2009
<i>Enchelycore nigricans</i>	42	68	6m+8sm+12st+16a	absent	Vasconcelos e Molina, 2009
<i>E. pardalis</i>	42	52	8m+2sm+32a		Takai & Ojima, 1985
<i>Muraena helena</i>	42	60	18m-sm+24a	absent	Cau <i>et al.</i> , 1988
<i>M. pavonina</i>	42	52	6m+4sm+32a		Vasconcelos e Molina, 2009

## **Bibliografia:**

- Almada, V. C., Pérez-Portela, R., Robalo, J. I., & Brito, A.** (2009). Phylogenetic relationships of *Gymnothorax bacalladoi* Böhlke and Brito (1987) a poorly known moray of the Macaronesian islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(1), 252–256.
- Alves, M. A. O., Monteiro-Junior, J. E., Oliveira, C. A. M., Silveira, R. M., Costa, I. R., & Maggioni, R.** (2014). Chromosomes of *Gymnothorax funebris* and the karyotypical differentiation within *Gymnothorax* (Anguilliformes: Muraenidae). *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 1127–1132.
- Arai, R.** (2011). Fish karyotypes: a checklist. *Springer Science & Business Media*.
- Böhlke, E. B., & Smith, D. G.** (2002). Type catalogue of Indo-Pacific Muraenidae. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 152(1), 89–172.
- Cau, A., Salvadori, S., Deiana, A. M., Bella, J. L., & Mezzanotte, R.** (1988). The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions, and in situ digestion with restriction endonucleases. *Cytogenetic and Genome Research*, 47(4), 223–226.
- Coluccia, E., Maria, A., Libertini, A., Salvadori, S., Coluccia, E., Deiana, A. M., Salvadori, S.** (2010). Cytogenetic characterization of the moray eel *Gymnothorax tile* and chromosomal banding comparison in Muraenidae (Anguilliformes) *Marine Biology Research*, 6(1), 106–111.
- Inoue, J. G., Miya, M., Tsukamoto, K., & Nishida, M.** (2004). Mitogenomic evidence for the monophyly of elopomorph fishes (Teleostei) and the evolutionary origin of the leptocephalus larva. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1), 274–286.
- Jiménez, S., Schönhuth, S., Lozano, I. J., González, J. A., Sevilla, R. G., Diez, A., Buth, D.** (2007). Morphological, ecological, and molecular analyses separate *Muraena augusti* from *Muraena helena* as a valid species. *Copeia*, 2007(1), 101–113.
- Johnson, G. D., Ida, H., Sakaue, J., Sado, T., Asahida, T., & Miya, M.** (2012). A “living fossil” eel (Anguilliformes: Protanguillidae, fam. nov.) from an undersea cave in Palau. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279(1730), 934–943.
- Khuda-Bukhsh, A. R.** (1995). Diploid numbers and chromosome formulae of some 29 species of Indian teleosts (Pisces). *Chromosome Information Service: CIS*, (58), 38–39.
- Loh, K.-H., Chen, I.-S., Randall, J. E., & Chen, H.-M.** (2008). A review and molecular phylogeny of the moray eel subfamily Uropterygiinae (Anguilliformes: Muraenidae) from Taiwan, with description of a new species. *Raffles Bulletin of Zoology*, 19, 135–150.
- Martins, C. cavalcanti Cabrall -de-Mello D, Targino Valente G, Mazzuchelli J, G. de O. S.** (2010). Cytogenetic mapping and contribution to the knowledge of animal genomes. *Advances in genetics research*, 4, 1–81.
- Molina, W. F.** (2007). Chromosomal changes and stasis in marine fish groups. *Fish Cytogenetics*, 69–110.
- Obermiller, L. E., & Pfeiler, E.** (2003). Phylogenetic relationships of elopomorph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(2), 202–214.
- Phillips, R., & Rab, P.** (2001). Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 76(01), 1–25.
- Porto-Foresti, F., Oliveira, C., & Foresti, F.** (2005). First chromosome characterization in the Neotropical eel, *Gymnothorax ocellatus* (Pisces, Muraenidae). *Cytologia*, 70(3), 283–286.
- Raskina, O., Barber, J. C., Nevo, E., & Belyayev, A.** (2008). Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3–4), 351–357.

- Reece, J., Larson, A., & Chase, J. M.** (2010). Phylogenetics and Phylogeography of Moray Eels (Muraenidae), (January).
- Rishi, K. K.** (1973). A preliminary report on the karyotypes of eighteen marine fishes. *Res Bull Punjab Univ*, 4, 161–162.
- Rong, S. B., Zhang, T. G., Zang, W. H., & Chen, J. D.** (1991). The karyotype of *Gymnothorax reevesi*. *Tropic Oceanology*, 10, 98–100.
- Salvadori, S., Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., & Deiana, A. M.** (2003). Replication banding in two Mediterranean moray eels: chromosomal characterization and comparison. *Genetica*, 119(3), 253–258.
- Salvadori, S., Deiana, A. M., Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., & Milia, A.** (1997). Heterochromatin distribution and structure in *Gymnothorax unicolor* (Anguilliformes, Muraenidae). *Italian Journal of Zoology*, 64(2), 125–129.
- Santini, F., Kong, X., Sorenson, L., Carnevale, G., Mehta, R. S., & Alfaro, M. E.** (2013). A multi-locus molecular timescale for the origin and diversification of eels (Order: Anguilliformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3), 884–894.
- Smith, D. G.** (2012). A checklist of the moray eels of the world (Teleostei: Anguilliformes: Muraenidae) (*Vol. 64*).
- Takai, A. Ojima, Y.** (1986). Some features on nucleolus organizer regions in fish chromosomes. In *Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the Second International Conference of Indo Pacific Fishes* (pp. 899–909). Ichthyological Society of Japan.
- Tang, K. L., & Fielitz, C.** (2013). Phylogeny of moray eels (Anguilliformes: Muraenidae), with a revised classification of true eels (Teleostei : Elopomorpha : Anguilliformes). *Mitochondrial DNA*, 24(1), 55-66.
- Ueda, T., Naoi, H., & Arai, R.** (2001). Flexibility on the karyotype evolution in bitterlings (Pisces, Cyprinidae). *Genetica*, 111(1-3), 423–432.
- Vasconcelos, M., & Molina, W. F.** (2009). Cytogenetical studies in five Atlantic Anguilliformes fishes. *Genetics and molecular biology*, 32(1), 83-90.
- Wang, C., Kuo, C., Mok, H., & Lee, S.** (2003). Molecular phylogeny of elopomorph fishes inferred from mitochondrial 12S ribosomal RNA sequences. *Zoologica Scripta*, 32(3), 231–241

#### **SITI INTERNET:**

<http://www.fishbase.org>

<http://www.aquariumdomain.com>

<http://www.discoverlife.org>

<http://www.treccani.it/>

<http://pbs.bishopmuseum.org>



## **CAPITOLO 2**

***Studio della regione organizzatrice del nucleolo e delle  
sequenze telomeriche mediante bandeggio cromosomico e***

***FISH in sei specie di murene Indopacifiche***

***(Anguilliformes: Muraenidae)***

Negli eucarioti, i geni ribosomiali sono organizzati in due famiglie geniche altamente ripetute organizzate in clusters ripetuti in tandem: la famiglia genica maggiore codificante per gli rRNA 28S, 18S e 5.8S che vengono inizialmente trascritti come rRNA 45S, e la famiglia genica ribosomiale minore codificante per il 5S rRNA. La famiglia genica ribosomiale maggiore, localizzata nella regione organizzatrice del nucleolo (NOR), è una delle porzioni del genoma degli eucarioti più studiata in quanto facilmente identificabile tramite l'impregnazione argantica. Nei pesci il numero e la localizzazione degli Ag-NOR rappresenta uno dei pochi markers cromosomici utili per analisi citotassonomiche e filogenetiche (Amemiya e Gold, 1990; Jenkin *et al.*, 1992; Gornung, 2013). Inoltre questa regione è identificabile anche mediante bandeggio con CMA<sub>3</sub> e mitramicina, fluorocromi che mettono in evidenza il DNA ricco in basi GC (Gornung, 2013).

Il numero e localizzazione del NOR rappresentano un'importante fonte d'informazioni per le analisi cariologiche soprattutto nei pesci, nei quali sono difficilmente ottenibili bandeggi eucromatici di tipo G o Q, a causa della peculiare struttura della cromatina (Medrano *et al.*, 1988; Sumner, 1990). Inoltre negli ultimi decenni, gli studi citogenetici sui pesci sono stati notevolmente migliorati dall'uso dell'ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) che è stata finora utilizzata principalmente per la localizzazione cromosomica di sequenze ribosomiali, centromeriche e telomeriche. I NOR sono stati mappati mediante FISH in 330 specie di teleostei, che rappresentano circa 1,3% delle specie esistenti, un piccola percentuale rispetto alla localizzazione tramite l'impregnazione argantica (Gornung, 2013), che però non è in grado di individuare eventuali cluster ribosomiali non attivi trascrizionalmente.

La sequenza ripetuta (TTAGGG)<sub>n</sub> rappresenta la sequenza telomerica più diffusa negli animali ed altamente conservata tra i vertebrati e perciò di facile localizzazione tramite FISH. Inoltre in molte specie, oltre alla posizione terminale prevista, sono state localizzate sequenze telomeriche interstiziali (ITS) (Meyne *et al.*, 1990), la cui identificazione è un utile strumento per la comprensione di riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti i telomeri. La distribuzione cromosomica delle sequenze telomeriche è stata esaminata in circa 80 specie di pesci e nel 42% di queste è stata evidenziata la presenza di ITS (Ocalewicz, 2013).

In questo lavoro è stata studiata la localizzazione del NOR e delle sequenze telomeriche mediante FISH, impregnazione argantica e bandeggio con CMA<sub>3</sub>, in sei specie di murene tropicali (ordine Anguilliformi, famiglia Muraenidae) diffuse nell'oceano Indo-pacifico: *Gymnothorax fimbriatus* (Bennet 1832), *Gymnothorax flavimarginatus* (Rüppell 1830), *Gymnothorax javanicus* (Bleeker 1859), *Gymnothorax undulatus* (Lacépède 1803), *Echidna nebulosa* (Ahl 1789) e *Gymnomuraena zebra* (Shaw 1797).

## **Materiali e metodi**

### **Impregnazione argentica**

L'impregnazione argentica è stata ottenuta seguendo la tecnica di Rufas *et al.* (1985) con alcune modifiche. In particolare: 0,2 g di AgNO<sub>3</sub> sono stati sciolti in 0,2 ml di una soluzione di acido formico (2 gocce di acido formico in 100 ml di acqua distillata). I vetrini sono stati trattati con 100 µl di questa soluzione per 2-5 min. a 60°C in camera umida e successivamente colorati in Wright-tampone fosfato (1:3) per 6-10 minuti.

### **Colorazione con il fluorocromo CMA<sub>3</sub>**

La colorazione con il fluorocromo cromomicina A<sub>3</sub> è stata ottenuta secondo Schweizer (1976). In particolare: 0,5 mg di CMA<sub>3</sub> sono stati sciolti in 1 ml del tampone d'incubazione (10 ml di tampone Mc Ilvaine pH=7,10 ml di acqua distillata, 47 µl di cloruro di magnesio 1 M). Ciascun vetrino è stato incubato con 150 µl della soluzione di CMA<sub>3</sub>, coperto con un coprioggetto, al buio e a temperatura ambiente; dopo un'ora è stato risciaquato in acqua fontis, montato con un coprioggetto utilizzando una soluzione montante (10 ml di tampone Mc Ilvaine, 10 ml di glicerina, 48 µl di MgCl<sub>2</sub> 1M) e lasciato per 2-4 giorni a 37°C. La colorazione con questo fluorocromo è stata applicata anche ai vetrini precedentemente ibridati con il 45S rDNA e decolorati.

### **Ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) del rDNA 45S**

La FISH è stata eseguita secondo Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000), apportando alcune modifiche.

### **Marcatura della sonda**

È stata utilizzata una sonda di rDNA 45S di *Xenopus laevis*, contenente un'intera unità trascrizionale di *Xenopus laevis* clonata in un plasmide pBR322 nel sito HindII, e marcata utilizzando un kit di marcatura per Nick Translation (ROCHE) e come marcatore la biotina-16-dUTP (ROCHE) e seguendo il protocollo del kit, le sonde sono state incubate per due ore a 15°C, precipitate per una notte a -20°C dopo aver aggiunto EDTA 0.2M a pH=8 (1/10 della miscela), NaCl 250mM, etanolo assoluto ghiacciato (2+1/2 volte il volume della miscela). Dopo centrifugazione a 13000 RPM per 20 min., lavaggio in etanolo al 80% ghiacciato e ulteriore centrifugazione, la sonda è stata lasciata asciugare e risospesa in una miscela d'ibridazione composta da 50% di formammide, 20% di destran solfato (SIGMA) e 2xSSC.

### **Pre-trattamento vetrini**

È stato effettuato un pre-trattamento dei vetrini delle varie specie, per eliminare l'RNA presente ed eventuali residui di citoplasma, allo scopo di ottenere dei preparati migliori per l'applicazione della tecnica della FISH.

Sono stati eseguiti 3 passaggi in PBS per 5' seguiti dalla disidratazione nella scala ascendente degli alcoli (70%, 80%, 100% per 3' in ognuno), a temperatura ambiente. Subito dopo, tutti i vetrini sono stati sottoposti al pretrattamento tramite RNasi (SIGMA), alla concentrazione di 100µg/ml a 37°C per 1h, in una camera umida impregnata di 2xSSC. Dopo aver risciacquato in 2xSSC (4 lavaggi di 4' ciascuno), i vetrini sono stati nuovamente disidratati mediante la serie ascendente degli alcoli e incubati in una soluzione di FA buffer (MgCl<sub>2</sub> al 1,6% in PBS pH=7,5) per 5 min. e successivamente in formaldeide diluita all'1% nella soluzione di FA buffer per 10'; dopo risciacquo in PBS per 5 min., i vetrini sono stati disidratati con la serie degli alcoli e asciugati.

### **Denaturazione, ibridazione e rilevamento del segnale**

I vetrini, trattati con l'RNasi, sono stati denaturati in formammide al 70% in 2xSSC a 70°C per due minuti e disidratati mediante la scala ascendente degli alcoli ghiacciati (50%, 70%, 80%, 100%); su ogni vetrino sono stati aggiunti 30 µl di sonda, precedentemente denaturata per 8 minuti a 70°C, ed è stato messo un coprioggetto in parafilm. L'ibridazione è stata effettuata in camera umida, per una notte a 37°C. I lavaggi post-ibridazione sono stati effettuati, a bassa stringenza, mediante 3 incubazioni successive di 5 minuti ciascuna in formammide al 50% in 2xSSC a 37°C seguite da 3 incubazioni di 5 minuti ciascuna in 2xSSC a 37°C. Il rilevamento del segnale d'ibridazione è stato effettuato incubando i vetrini con avidina coniugata con isotiocianato di fluorescina (FITC) (VECTOR) che emette una fluorescenza giallo-verde, per 30 min. a 37°C in camera umida. I vetrini sono stati poi contro-colorati per contrasto con ioduro di propidio (1 µg/ml in 2xSSC) per 7 min. e con DAPI (0,5µg/ml in 2xSSC) per 7 min.

I vetrini sono stati montati con un coprioggetto utilizzando 2 gocce di montante antifading (Vector) e osservati al microscopio in fluorescenza ZEISS Axio Imager.M1 utilizzando i filtri specifici per fluorescina, DAPI e propidio. Le piastre metafasiche contenenti il segnale d'ibridazione sono state acquisite con una fotocamera digitale HAMAMATSU C8484 e elaborate al computer mediante software dedicato di cariotipizzazione CROMOWIN PLUS (TESI Imaging).

**Ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) di sequenze telomeriche**

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza è stata effettuata utilizzando una sonda PNA (acido peptido-nucleico), coniugata con fluorescina, contenente la sequenza telomerica (TTAGGG)<sub>n</sub> (DAKO). L'ibridazione è stata effettuata tramite l'utilizzo di un kit per FISH di PNA telomerico (DAKO) seguendo le istruzioni fornite dalla ditta.

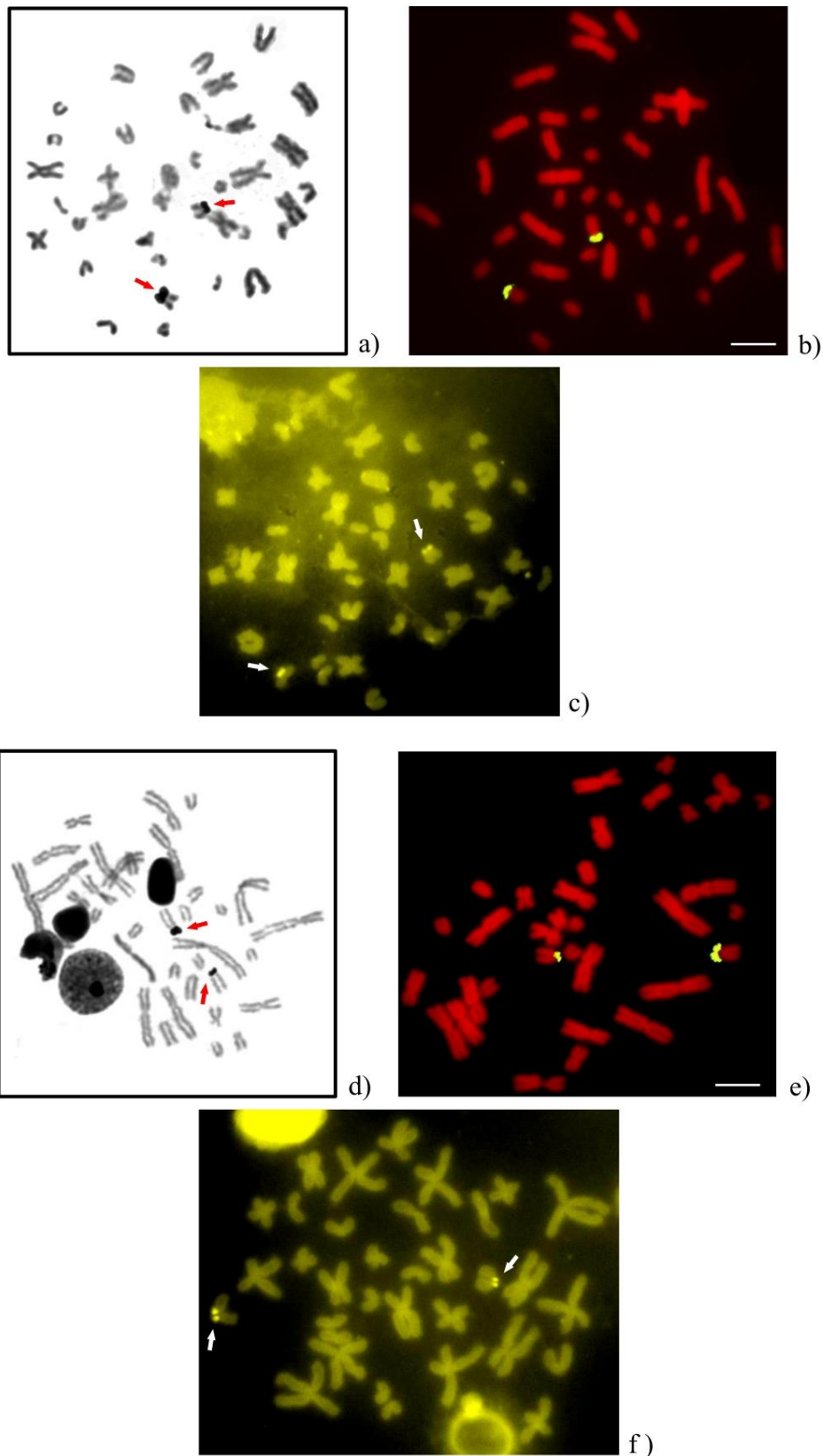
## ***Risultati***

### **Regioni organizzatrici nucleolari**

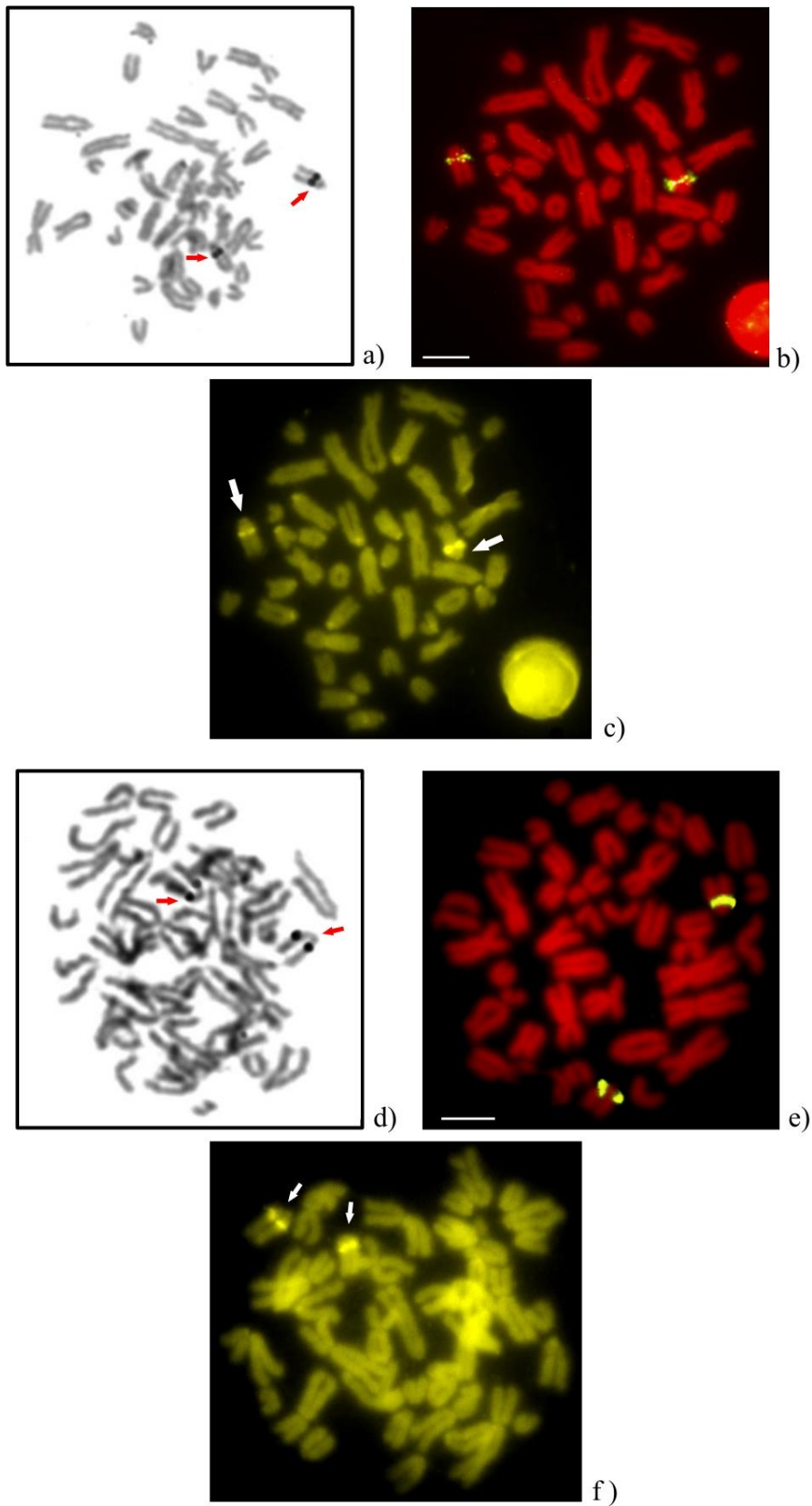
L'impregnazione argentica ha permesso di rilevare la presenza di NOR trascrizionalmente attivi in una sola coppia cromosomica, in tutte le specie studiate. Inoltre nei nuclei interfasicci sono stati osservati sempre due nucleoli, in tutte le specie.

In *G. javanicus* e *G. flavimarginatus* i siti Ag-NOR sono risultati localizzati nel braccio corto dei cromosomi 14 e 13, rispettivamente [Figura 1 (a), (d)]; in *G. fimbriatus* e *G. undulatus*, i NOR sono risultati localizzati a livello interstiziale nel braccio lungo dei cromosomi 9 e 11, rispettivamente [Figura 2 (a), (d)], e in *E. nebulosa* e *G. zebra*, in posizione terminale nel braccio corto del cromosoma 17 [Figura 3 (a), (d)].

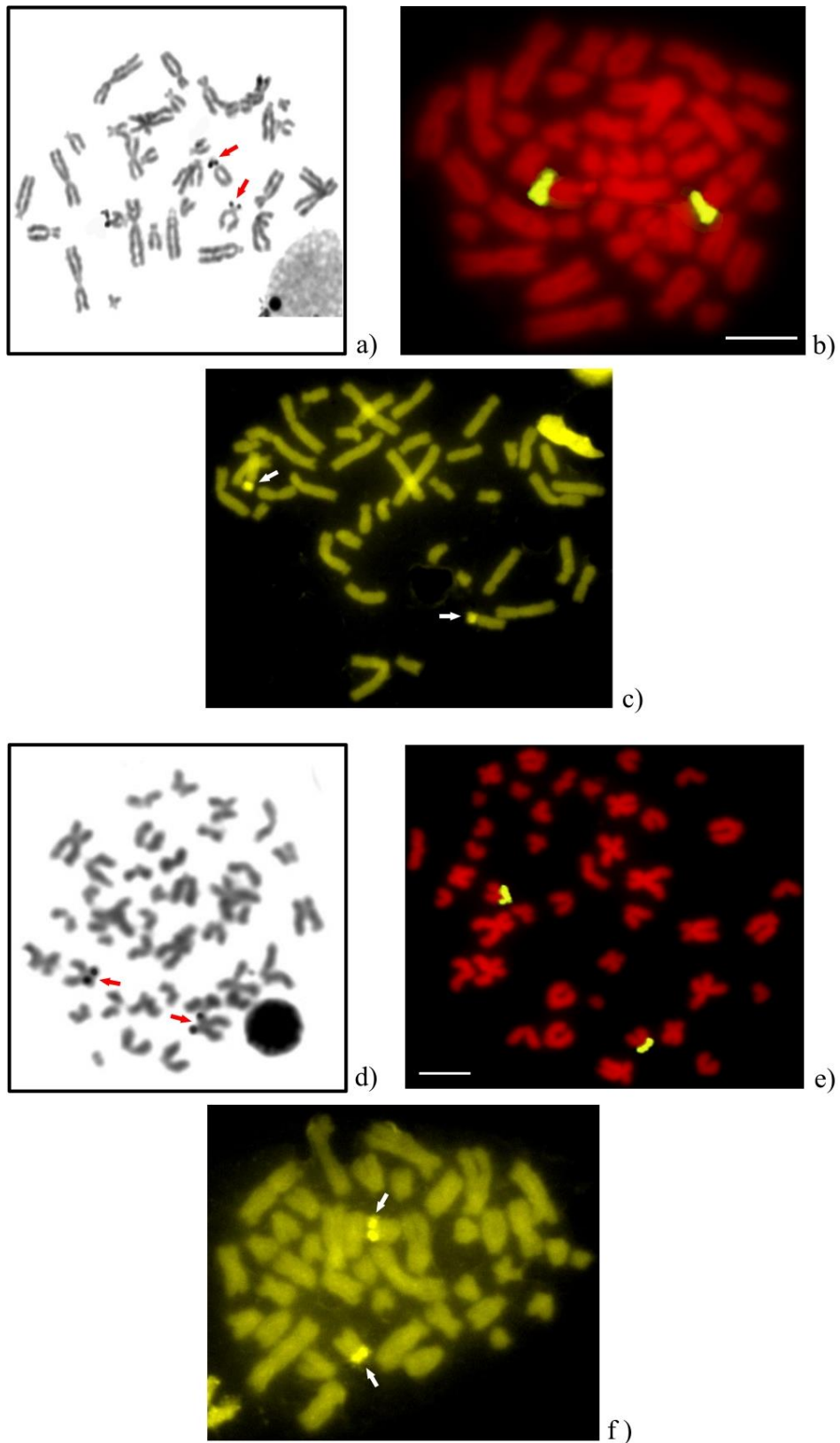
La tecnica della FISH con una sonda di rDNA 45S, ha prodotto segnali fluorescenti, in una sola coppia, in tutte le specie studiate, corrispondenti ai siti Ag-NOR [Fig. 1b), 1e); 2b), 2e); 3b), 3e); 4]. La colorazione in successione delle stesse piastre metafasiche, con impregnazione argentica e CMA<sub>3</sub>, o FISH e CMA<sub>3</sub>, ha evidenziato una brillante fluorescenza in un'unica regione, in tutte le specie, e ha permesso di evidenziare che le regioni CMA<sub>3</sub> fluorescenti sono risultate corrispondenti sia alle regioni positive all'impregnazione argentica che a quelle precedentemente marcate dalla sonda di rDNA 45S [Figure 1c), 1f); 2c), 2f); 3c), 3f); 4]. Con tutte le tecniche utilizzate è stato osservato un polimorfismo di lunghezza tra omologhi di questa regione in tutte le specie studiate (Figura 4).



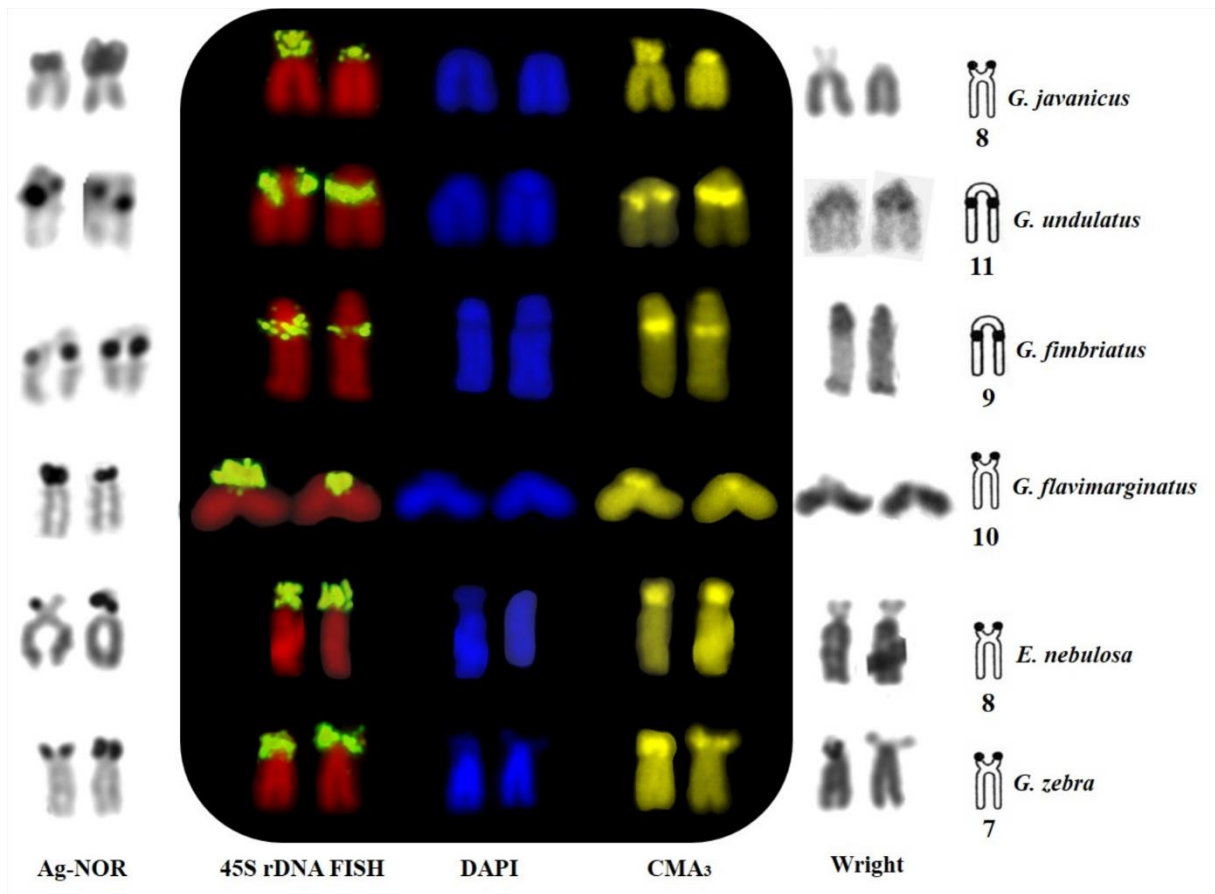
**Figura 1:** Localizzazione del NOR nelle piastre metafasiche di *G. javanicus* (a, b, c) e *G. flavimarginatus* (d, e, f) dopo impregnazione argentea (a, d), ibridazione in situ in fluorescenza con rDNA 45S (b, e) e colorazione con il fluorocromo CMA<sub>3</sub> (c, f). Le frecce indicano le coppie cromosomiche sede del NOR.



**Figura 2:** Localizzazione del NOR nelle piastre metafasiche di *G. fimbriatus* (a, b, c) e *G. undulatus* (d, e, f) dopo impregnazione argentea (a, d), ibridazione in situ in fluorescenza con rDNA 45S (b, e) e colorazione con il fluorocromo CMA<sub>3</sub> (c, f). Le frecce indicano le coppie cromosomiche sede del NOR.



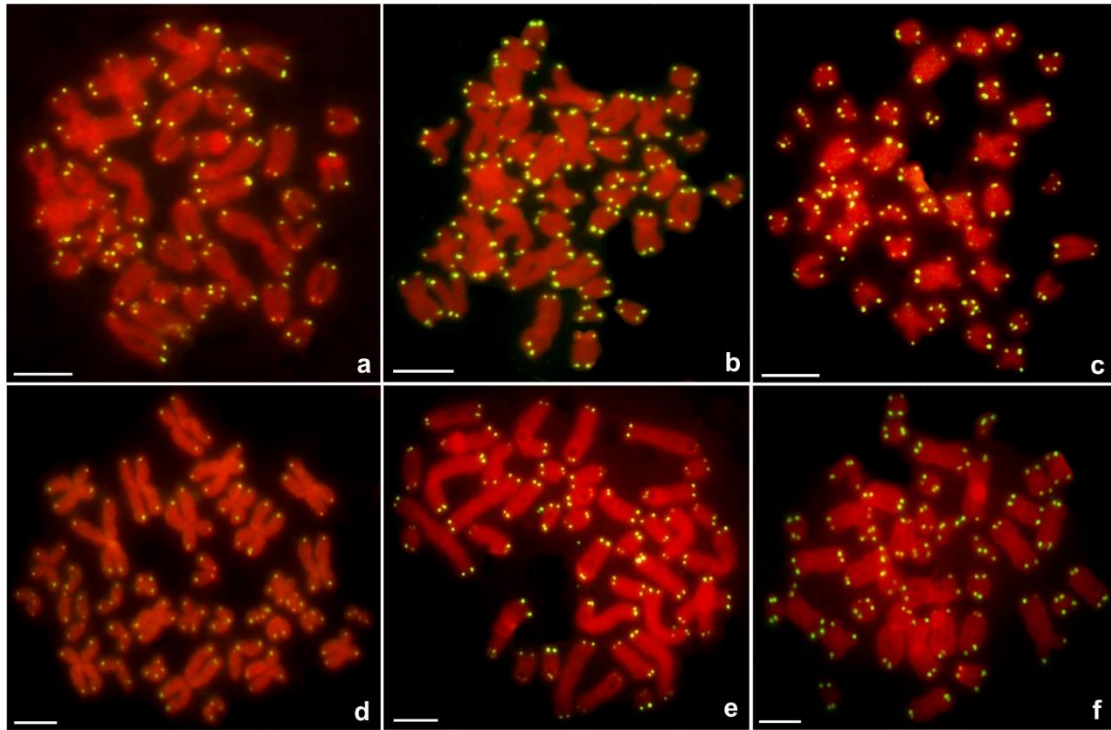
**Figura 3:** Localizzazione del NOR nelle piastre metafasiche di *E. nebulosa* (a, b, c) e *G. zebra* (d, e, f) dopo impregnazione argentea (a, d), ibridazione in situ in fluorescenza con rDNA 45S (b, e) e colorazione con il fluorocromo CMA<sub>3</sub> (c, f). Le frecce indicano le coppie cromosomiche sede del NOR.



**Figura 4:** Coppia cromosomica sede del NOR nelle specie studiate con tutte le tecniche utilizzate.

### Sequenze telomeriche

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza di una sonda telomerica contenente la sequenza (TTAGGG)<sub>n</sub> ha evidenziato segnali fluorescenti sulle estremità terminali di tutti i bracci cromosomici in tutte le specie studiate. In nessuna specie è stato rilevato alcun segnale in posizione non telomerica (interstiziale o centromerica) (Figura 5).



**Figura 5:** Localizzazione cromosomica delle sequenze telomeriche in *G. undulatus* (a), *E. nebulosa* (b), *G. zebra* (c), *G. flavimarginatus* (d), *G. fimbriatus* (e) e *G. javanicus* (f).

## ***Discussione***

In questo studio la famiglia genica ribosomiale maggiore, localizzata nella regione organizzatrice del nucleolo (NOR), è risultata presente in un'unica coppia cromosomica in tutte le sei specie di murene. Il mappaggio diretto dei geni ribosomiali tramite FISH ha confermato i risultati ottenuti tramite impregnazione argentea ed escluso la presenza di clusters ribosomiali trascrizionalmente non attivi. La presenza di una singola coppia contenente il NOR è la condizione comune all'interno della famiglia Muraenidae e la più frequente tra gli Anguilliformi. All'interno dell'ordine, sono stati riportati siti di rDNA 45S multipli per una sola specie, *Dalophis imberbis* (Delaroche 1809) (Salvadori *et al.*, 2009). La presenza di un singolo NOR è anche la condizione più frequente e considerata plesiomorfica per tutti i teleostei (Gornung, 2013). In questo studio, l'analisi sequenziale delle stesse piastre metafasiche mediante FISH di rDNA 45S e bandeggio con CMA<sub>3</sub> ha dimostrato che i NOR sono regioni ricche in guanina e citosina in tutte le specie studiate, una condizione comunemente riscontrata nella maggior parte degli organismi.

La distribuzione cromosomica dei clusters di rDNA 45S differisce tra le specie e sono stati osservati due tipi di localizzazione: in quattro specie si trovano in posizione terminale in una coppia simile per morfologia e dimensione, nelle restanti due la posizione è interstiziale e anche in questo caso su cromosomi simili.












Nella famiglia Muraenidae la posizione terminale del NOR su un cromosoma bi-bracci è la condizione più frequente (presente in oltre il 75% delle specie), localizzata sul braccio corto in otto specie e sul braccio lungo in *G. ocellatus* (Takai e Ojima, 1986; Cau *et al.*, 1988; Porto-Foresti *et al.*, 2005; Vasconcelos e Molina, 2009; Coluccia *et al.*, 2010). Le restanti quattro specie studiate presentano la localizzazione interstiziale su un cromosoma acrocentrico, condizione che potrebbe essere considerata derivata (Tabella I). Riarrangiamenti cromosomici come inversioni pericentriche coinvolgenti i clusters ribosomiali potrebbero spiegare il cambiamento della posizione del NOR da terminale a interstiziale, come già dimostrato tra *M. helena* e *G. unicolor* (Salvadori *et al.*, 1997; Salvadori *et al.*, 2003). Inoltre, l'eterocromatina associata al NOR potrebbe aver contribuito alla traslocazione dei siti di DNA ribosomiale in molte specie, come dimostrato in altri teleostei (Gornung, 2013).

La sequenza telomerica (TTAGGG)<sub>n</sub> è altamente conservata tra i vertebrati, inclusi i pesci. Tra i murenidi questa sequenza ripetuta è risultata confinata alle regioni terminali di tutti i bracci cromosomici, sia nelle specie oggetto di questo studio che nelle specie studiate precedentemente, come *M. helena*, *G. unicolor* e *G. tile* (Salvadori *et al.*, 1995; Coluccia *et al.*, 2010; Coluccia *et al.*, 2011). In alcuni casi, le sequenze telomeriche potrebbero trovarsi in

posizione interstiziale (sequenze telomeriche interstiziali, ITS<sub>s</sub>) e il loro rilevamento potrebbe essere molto informativo, in quanto possono essere considerati la testimonianza di avvenuti riarrangiamenti cromosomici come inversioni e fusioni che hanno coinvolto i telomeri, che si sarebbero così trovati in posizione interstiziale (Meyne *et al.*, 1990; Ocalewicz, 2013) Tra gli Anguilliformi, la presenza di ITS<sub>s</sub> è stata riportata solo nelle anguille atlantiche *Anguilla anguilla* (L. 1758) e *Anguilla rostrata* (LeSueur 1817) (Salvadori *et al.*, 1995). In queste due specie le sequenze telomeriche sono risultate intersperse con le sequenze ribosomiali del NOR, probabilmente a causa di crossing-over diseguali che possono coinvolgere le sequenze ripetute. Nella famiglia Muraenidae i clusters ribosomiali si sono rivelati utili markers citotassonomici che hanno permesso di dimostrare come inversioni pericentriche abbiano causato cambiamenti nella morfologia cromosomica tra specie. Questo tipo di riarrangiamento rende conto della diversificazione del numero di bracci già riscontrato tra le specie. Questi risultati sono molto promettenti dato che nella famiglia Muraenidae, come nella maggior parte dei pesci, i bandeggi longitudinali, che vengono utilizzati per l'identificazione di riarrangiamenti cromosomici tra specie, sono di difficile ottenimento.

I dati presentati in questo studio forniscono importanti informazioni sulla differenziazione cromosomica all'interno della famiglia Muraenidae. Sarebbero necessari ulteriori studi di citogenetica molecolare su altre specie della famiglia per chiarire meglio l'evoluzione del cariotipo e la filogenesi in questo gruppo.

**Tabella I.** Localizzazione della regione organizzatrice del nucleolo nella famiglia Muraenidae.

species	NORs	references
<i>Echidna nebulosa</i>	2 	Presente studio
<i>Gymnomuraena zebra</i>	2 	Presente studio
<i>Gymnothorax fimbriatus</i>	2 	Presente studio
<i>G. undulatus</i>	2 	Presente studio
<i>G. javanicus</i>	2 	Presente studio
<i>G. flavimarginatus</i>	2 	Presente studio
<i>G. eurostus</i>	2 	Takai & Ojima, 1985; 1986
<i>G. kidako</i>	2 	Takai & Ojima, 1985; 1986
<i>G. miliaris</i>	2 	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2009
<i>G. ocellatus</i>	2 	Porto-Foresti <i>et al.</i> , 2005
<i>G. tile</i>	2 	Coluccia <i>et al.</i> , 2010a
<i>G. unicolor</i>	2 	Deiana <i>et al.</i> , 1990
<i>G. vicinus</i>	2 	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2009
<i>Enchelycore nigricans</i>	2 	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2009
<i>E. pardalis</i>	2 	Takai & Ojima, 1985; 1986
<i>Muraena helena</i>	2 	Cau <i>et al.</i> , 1988
<i>M. pavonina</i>	2 	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2009

## **Bibliografia:**

- Amemiya, C. T., & Gold, J. R.** (1990). Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae): Chromosomal NOR phenotypes of 12 species, with comments on cytosystematic relationships among 50 species. *Hereditas*, *112*(3), 231–247.
- Cau, A., Salvadori, S., Deiana, A. M., Bella, J. L., & Mezzanotte, R.** (1988). The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions, and in situ digestion with restriction endonucleases. *Cytogenetic and Genome Research*, *47*(4), 223–226.
- Coluccia, E., Deiana, A. M., Libertini, A., & Salvadori, S.** (2010). Cytogenetic characterization of the moray eel *Gymnothorax tile* and chromosomal banding comparison in Muraenidae (Anguilliformes). *Marine Biology Research*, *6*(1), 106–111.
- Coluccia, E., Pichiri, G., Nieddu, M., Coni, P., Manconi, S., Deiana, A. M., Mezzanotte, R.** (2011). Identification of two new repetitive elements and chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in the fish *Gymnothorax unicolor* (Anguilliformes: Muraenidae). *European Journal of Histochemistry*, *55*(2), 12.
- Deiana, A. M., Salvadori, S., & Cau, A.** (1990). The characterization of somatic chromosomes of *Gymnothorax unicolor* (Delaroche, 1809) by C-banding and NOR staining (Osteichthyes, Anguilliformes). *Genetica*, *81*(1), 17–20.
- Gornung, E.** (2013). Twenty Years of Physical Mapping of Major Ribosomal RNA Genes across the Teleosts. *Cytogenetic and genome research*, *141*(2-3), 90-102.
- Jenkin, J. D., Li, Y. C., & Gold, J. R.** (1992). Cytogenetic Studies in North American Minnows (Cyprinidae). XXVI. Chromosomal NOR phenotypes of 21 species from the Western United States. *Cytologia*, *57*(4), 443–453.
- Medrano, L., Bernardi, G., Couturier, J., Dutrillaux, B., & Bernardi, G.** (1988). Chromosome banding and genome compartmentalization in fishes. *Chromosoma*, *96*(2), 178–183.
- Meyne, J., Baker, R. J., Hobart, H. H., Hsu, T. C., Ryder, O. A., Ward, O. G., Moyzis, R. K.** (1990). Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG) n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, *99*(1), 3–10.
- Ocalewicz, K.** (2013). Telomeres in fishes. *Cytogenetic and Genome Research*, *141*(2-3), 114–125.
- Porto-Foresti, F., Oliveira, C., & Foresti, F.** (2005). First chromosome characterization in the Neotropical eel, *Gymnothorax ocellatus* (Pisces, Muraenidae). *Cytologia*, *70*(3), 283–286.
- Rufas, J. S., Esponda, P., & Gosálvez, J.** (1985). NOR and nucleolus in the spermatogenesis of acridoid grasshoppers. *Genetica*, *66*(2), 139–144.
- Salvadori, S., Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., & Deiana, A. M.** (2003). Replication banding in two Mediterranean moray eels: chromosomal characterization and comparison. *Genetica*, *119*(3), 253–258.
- Salvadori, S., Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., & Deiana, A. M.** (2009). A ZZ–ZW sex chromosome system in the finless eel *Dalophis imberbis* (Anguilliformes, Ophichtidae). *Genetica*, *135*(3), 283–288.
- Salvadori, S., Deiana, A., Elisabetta, C., Florida, G., Rossi, E., & Zuffardi, O.** (1995). Colocalization of (TTAGGG) n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Research*, *3*(1), 54–58.
- Salvadori, S., Deiana, A. M., Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., & Milia, A.** (1997). Heterochromatin distribution and structure in *Gymnothorax unicolor* (Anguilliformes, Muraenidae). *Italian Journal of Zoology*, *64*(2), 125–129.
- Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, P.** (2000). *Practical in situ Hybridization*. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Schweizer, D.** (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, *58*(4), 307–324.
- Sumner, A. T.** (1990). *Chromosome banding*. Allen & Unwin Australia.
- Takai, A Ojima, Y.** (1986). Some features on nucleolar organizer regions in fish chromosomes. In *Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the Second International Conference of Indo Pacific Fishes* (pp. 899–909). Ichthyological Society of Japan.
- Vasconcelos, M., & Molina, W. F.** (2009). Cytogenetical studies in five Atlantic Anguilliformes fishes.



## **CAPITOLO 3**

***Studio della famiglia genica ribosomiale minore (rDNA 5S)***

***mediante FISH in specie di murene Atlantiche e***

***Indopacifiche (Anguilliformes: Muraenidae)***

Gli studi sui geni ribosomiali hanno assunto una grande importanza in animali e piante, soprattutto per la caratterizzazione di popolazioni e specie e per le ricostruzioni filogenetiche. Negli eucarioti superiori ripetizioni in tandem di geni ribosomiali sono organizzati in due famiglie geniche composte da centinaia di migliaia di copie (Hadjiolov, 1985). La principale classe di rDNA comprende i geni che codificano per gli rRNA 18S, 5,8S e 28S, localizzati nella regione organizzatrice del nucleolo (NOR) (Long e Dawid, 1980), mentre il DNA che codifica per l'rRNA 5S rappresenta la famiglia ribosomiale minore. Lo studio delle sequenze nucleotidiche e della distribuzione cromosomica delle due famiglie geniche hanno contribuito alla comprensione della struttura, organizzazione ed evoluzione dei genomi (Martins *et al.*, 2003). L'rDNA 5S consiste di copie multiple di una sequenza codificante di 120 paia di basi altamente conservata, separata da uno spaziatore non trascritto (NTS) variabile tra specie (Long e Dawid, 1980). Questa famiglia ribosomiale è molto meno studiata citogeneticamente rispetto alla famiglia ribosomiale 45S, in quanto l'ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) è l'unica tecnica per la sua localizzazione cromosomica e la grande variabilità delle sequenze spaziatrici rende in molti casi necessario l'uso di sonde di rDNA 5S specie-specifiche. Nei pesci, data la scarsità di dati genomici, la localizzazione cromosomica dei geni per l'rRNA 5S si dimostra di grande importanza per la comprensione della struttura e organizzazione delle sequenze ripetute nei cromosomi.

L'rDNA 5S è stato mappato in poche specie di pesci, con una localizzazione sia in un'unica coppia che in più coppie cromosomiche (Martins e Wasko, 2004). Questi geni sono stati trovati in posizione sintenica con i geni ribosomiali 45S in alcune specie come *Salmo salar* e *Conger conger* (Pendás *et al.*, 1994; Deiana *et al.*, 2006); mentre in altri casi sono stati localizzati in coppie cromosomiche differenti come altre specie di Salmonidi, le anguille atlantiche e *Micropterus salmoides* (Fujiwara *et al.*, 1998; Moran *et al.*, 1996; Nieddu *et al.*, 1998; Deiana *et al.*, 2000). Tuttavia la differente distribuzione cromosomica di NOR e 5S rDNA sembra essere la situazione più frequentemente osservata nei pesci e nei vertebrati in generale (Martins e Wasko, 2004).

Per ampliare la caratterizzazione citogenetica della poco studiata famiglia Muraenidae (teleostei, anguilliformi), in questo studio è stata per la prima volta studiata mediante FISH l'organizzazione cromosomica della famiglia genica ribosomiale minore in cinque specie di murene di diversa provenienza geografica, *Gymnothorax fimbriatus* (Bennet, 1832), *Gymnothorax flavimarginatus* (Rüppell 1830), *Gymnothorax javanicus* (Bleeker, 1859) dell'oceano Indo-pacifico e *Muraena helena* (L. 1758) e *Gymnothorax unicolor* (Delaroche, 1809) distribuite nell'oceano Atlantico e mar Mediterraneo. La presenza sia di similitudini che

differenze nella organizzazione cromosomica dell'rDNA 5S tra le specie studiate suggerisce una complessa dinamica dell'evoluzione cromosomica in questa famiglia.

## ***Materiali e metodi***

### **Campionamento**

Sono stati esaminati 6 esemplari di *Muraena helena* e 3 esemplari di *Gymnothorax unicolor* catturati nelle acque della Sardegna Meridionale con attrezzi fissi: nasse e palamiti. Gli individui sono stati mantenuti in acquario per tutto il tempo dello studio e riconosciuti attraverso le loro lunghezze, di alcuni è stato determinato il sesso mediante analisi istologica delle gonadi. Inoltre sono stati esaminati gli esemplari di *G. javanicus*, *G. flavimarginatus* e *G. fimbriatus* catturati nelle acque della repubblica delle Maldive già utilizzati nelle analisi precedenti.

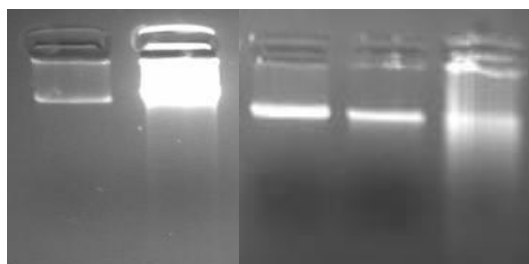
### **Estrazione del DNA**

Il DNA genomico totale è stato estratto da una porzione di muscolo fresco (5-10 mg) e conservato in etanolo assoluto a -20°C seguendo il metodo del Salting out (Miller *et al.*, 1988) che, rispetto ad altre tecniche come le colonnine a membrana silicea o il fenolo-cloroformio note per l'alto grado di purificazione degli acidi nucleici, è risultato più idoneo per piccole porzioni di muscolo, fornendo quantitativi di DNA maggiori a scapito di una più bassa purificazione che comunque non ha influito negativamente nelle analisi successive. Il salting out è una tecnica di estrazione molto efficiente ed economica, infatti il suo protocollo non prevede l'utilizzo di kit commerciali e utilizza reagenti non tossici, a differenza ad esempio del fenolo-cloroformio. La tecnica prevede la precipitazione delle proteine e il loro allontanamento dalla soluzione acquosa contenente il DNA, in base al principio di variazione della forza ionica dovuta all'aggiunta di un sale, in questo caso NaCl > 6M: gli ioni del sale aggiunto competono con gli ioni presenti nella soluzione per le molecole di solvente, facilitando l'aggregazione proteica.

Il muscolo è stato sminuzzato accuratamente e immerso in una soluzione di lisi (EDTA 0,1M e TRIS 0,05M), in SDS (sodio dodecilsolfato) al 10% e K-proteinasasi (20mg/ml), che provoca la lisi delle membrane cellulari e degrada le proteine; inoltre inibisce le nucleasi endogene che potrebbero danneggiare il DNA. Il trattamento con enzimi proteolitici e detergenti, seguito dal trattamento con soluzione satura di sali (NaCl >5M), fa precipitare le proteine lasciando l'acido nucleico in soluzione acquosa. Il DNA in soluzione è stato concentrato per precipitazione, aggiungendo alcool isopropilico, e pulito dai residui proteici attraverso lavaggi in etanolo al 70%. Eliminato l'eccesso di alcool i campioni sono stati idratati con acqua sterile e conservati in freezer a -20°C.

### **Analisi quantitativa/qualitativa del DNA estratto mediante elettroforesi**

L'analisi quantitativa e qualitativa è stata fatta sottoponendo il DNA estratto a elettroforesi orizzontale su gel di agaroso (matrice di supporto) all'1,5%, a cui è stato aggiunto l'etidio di bromuro come colorante intercalante fluorescente che si lega al DNA in modo aspecifico, e che è stato immerso in un buffer ionico (tampone TAE o TBE 1X). I campioni (5µl) sono stati caricati nei pozzetti del gel dopo aver aggiunto una piccolissima goccia di colorante (blue di bromofenolo+glicerolo) e la cella elettroforetica è stata collegata ad una sorgente d'energia elettrica per permettere la migrazione del DNA verso l'elettrodo positivo. Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato visualizzato in un transilluminatore UVIDOC (GAS9500/910, UVITEC) che emette radiazioni a tre lunghezze d'onda UV: 254, 302, 366 nm, per l'identificazione delle bande di DNA (Figura 1).



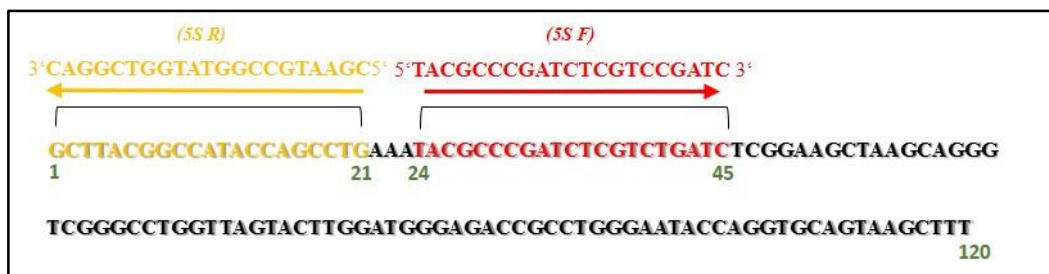
**Figura 1:** Alcuni estratti delle specie oggetto di studio, in ordine: estratto di *G. fimbriatus*, *G. flavimarginatus*, *M. helena*, *G. unicolor* e *G. javanicus*.

### **Amplificazione del 5S rDNA**

La frazione di DNA corrispondente alla famiglia genica ribosomiale minore di ciascuna specie è stata ottenuta mediante la reazione di polimerizzazione a catena, nota come PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis e Faloona, 1987), utilizzando i primers indicati da Pendás *et al.* (1994):

- **5SF (5'-TACGCCGATCTCGTCCGATC-3')**, dalla posizione 24 alla posizione 45 del gene conservato da 120 paia di basi;
- **5SR (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3')**, dalla posizione 1 alla posizione 21 del gene da 120 bp.

Si tratta di primers complementari a sequenze adiacenti localizzate nella regione conservata del rDNA 5S dei salmonidi, caratterizzati da una direzione di amplificazione divergente (in modo tale da poter amplificare mediante PCR tutta l'unità ripetitiva del 5S) (Figura 2).



**Figura 2:** Disegno dei due primers costruiti da Pendàs *et al.*, (1994), sulla regione genica del rDNA 5S

La reazione di amplificazione di 25 µl totali conteneva i seguenti reagenti: Buffer, con una concentrazione finale di [1X], dNTPs [0.2 mM], MgCl<sub>2</sub> [2.5 mM], primers [0.8 picomoli/campione], Taq-polimerasi [0.8 Unità/campione], DNA template (1µl/campione) e H<sub>2</sub>O sterile a volume. Le amplificazioni sono state eseguite in un termociclatore Eppendorf® Mastercycler Nexus, utilizzando il profilo descritto in Tabella I.

FASE	Temperatura	Durata	Ripetizioni
Denaturazione iniziale	94 °C	3 min	
Denaturazione	94 °C	30 s	
Annealing	64-65° C	30 s	35 cicli
Estensione	72 °C	1 min	
Estensione finale	72 °C	5 min	

**Tabella I:** Profilo termico per l'amplificazione della regione d'interesse.

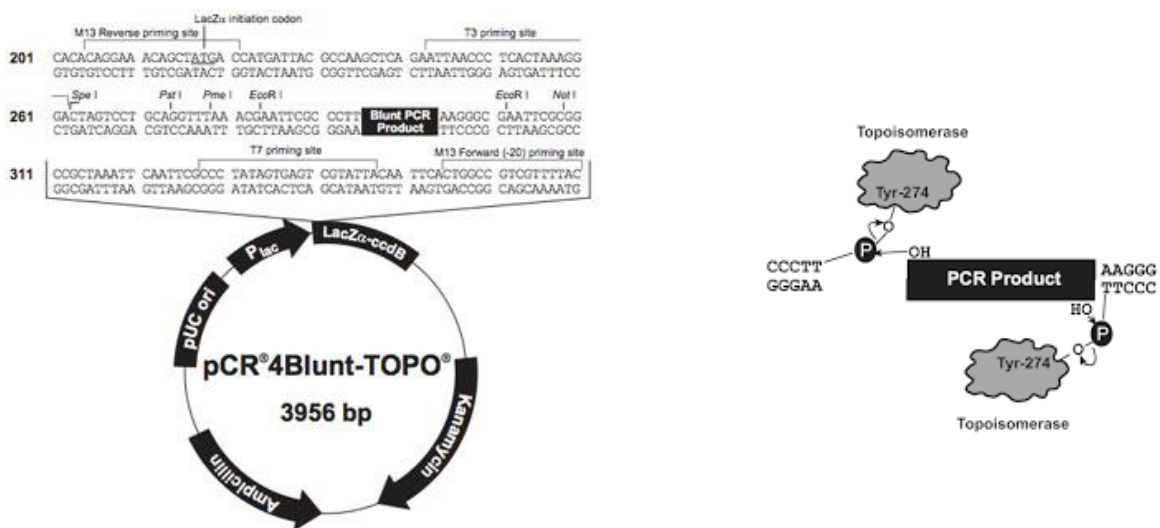
Gli amplificati ottenuti sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica orizzontale su gel di agaroso all'1,5%, (5 µl di ciascun campione) utilizzando la stessa strumentazione e metodologia precedentemente descritta per l'analisi degli estratti e in presenza di un marcatore molecolare di peso noto composto da quattordici singoli frammenti, da 100 a 3000 paia di basi (Thermo Scientific O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use).

I frammenti amplificati sono stati scelti in base alla banda che si presentava più netta e pulita e con minor residuo di dimeri di primers e utilizzati sia per l'ibridazione *in situ* (FISH) che per il clonaggio e sequenziamento.

## Clonaggio molecolare

Il clonaggio è stato eseguito utilizzando il TOPO TA CLONING<sup>®</sup> Kit For Sequencing (Invitrogen) contenente cellule di *Escherichia coli* (One Shot<sup>®</sup> TOP 10 Chemically Competent *E. coli*) trasformabili con il vettore plasmidico pCR<sup>®</sup> 4-TOPO<sup>®</sup> (10 ng/uL DNA plasmidico in: 50% glicerolo, 50 mM Tris-HCl (pH=7.4), 1mM EDTA, 2mM DTT, 0.1% Triton X-100, 100ug/mL BSA, 30 uM fenolo rosso). Il kit TOPO TA Cloning per il sequenziamento è stato scelto per l'efficienza e la facilità di utilizzo. Non sono richieste ligasi, enzimi di restrizione, procedure POST-PCR o primers contenenti specifiche sequenze. Il vettore plasmidico pCR<sup>®</sup> 4-TOPO<sup>®</sup>, caratterizzato dal marcatore selettivo dominante per la resistenza all'Ampicillina, viene fornito linearizzato con: una singola 3' Timidina (T) terminale per il clonaggio e una Topoisomerasi legata covalentemente al vettore (denominata vettore "attivato"). La Taq-polimerasi ha un'attività terminal-transferasica che aggiunge una singola deossiadenosina (A) all'estremità 3' termiale del prodotto di PCR. Il vettore linearizzato fornito da questo kit ha un singolo residuo 3' deossitimidina (T) terminale. Questo permette all'inserto di PCR di legarsi efficientemente al vettore (Figura 3).

La Topoisomerasi I (dal virus *Vaccinia*) lega il duplice DNA in siti specifici e rompe il legame in un filamento. L'energia liberata dalla rottura del legame fosfodiesterico dopo la sequenza 5'-CCCTT, è utilizzata nella formazione di un legame covalente tra l'estremità dove è presente il fosfato in 3', del filamento rotto, e il residuo tirosilico (Tyr-274) della Topoisomerasi I. Il legame fosfo-tirosilico tra il DNA e l'enzima può essere successivamente attaccato dall'ossidrilie in 5' del filamento originale interrotto, invertendo la reazione e rilasciando così la Topoisomerasi (Figura 3). Questo kit di clonaggio sfrutta questa reazione per clonare in modo efficiente i prodotti di PCR.



**Figura 3:** Vettore pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> contenuto nel kit di clonaggio TOPO TA CLONING<sup>®</sup> (Invitrogen).

Per quanto riguarda la selezione positiva dei ricombinanti, pCR-4-TOPO permette una selezione diretta degli stessi attraverso la distruzione di un gene di *E. coli* letale, *ccdB*. Il vettore contiene il gene *ccdB* fuso con la terminazione-C del frammento *lacZα* (Figura 3). La ligazione del prodotto di PCR distrugge l'espressione del gene *ccdB-lacZα* permettendo la crescita di soli ricombinanti positivi al momento della trasformazione nelle cellule competenti TOP 10. Le cellule che contengono il vettore non-ricombinante vengono uccise subito dopo il piastramento. Pertanto, lo screening blu/bianco non è richiesto.

La prima fase del clonaggio è stata l'inserzione del DNA da clonare nel plasmide:

In 6 µl totali sono stati diluiti da 0.7 a 1.2 µl (a seconda della luminosità della banda) di DNA amplificato (prodotto di PCR), 1 µl di soluzione salina (NaCl 1,2M e MgCl<sub>2</sub> 0,06M), H<sub>2</sub>O fino ad un volume di 5 µl e per ultimo 1 µl di vettore plasmidico pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>. La soluzione è stata agitata gentilmente ed incubata per 30' a temperatura ambiente e successivamente posta in ghiaccio.

La seconda fase è stata la Trasformazione: 2 µl della reazione precedente (reazione *TOPO cloning*) sono stati aggiunti ad una provetta contenente cellule di *E. coli*. Per rendere le cellule di *E. coli* competenti, il mix è stato incubato in ghiaccio per 20', poi sottoposto a shock termico per 1'e 30'' a 42°C e riposto nuovamente in ghiaccio. Si è proceduto all'aggiunta di 250 µl di S.O.C. medium (2% triptone, 0.5% estratto di lievito, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucosio) alle cellule, e lasciato in agitazione in posizione verticale (a 300 rpm) e col tappo leggermente svitato per 1 ora a 37°C.

La terza fase è consistita nel Piastramento delle cellule e Crescita delle stesse:

Sono state precedentemente preparate delle piastre petri con un terreno di coltura solido Luria-Bertani (1% di Triptone, 0.5% di estratto di Lievito, 1% di NaCl a pH 7, 1.5 % di Agar, 0.1% di NaOH 1M) e 50 µg/ml Ampicillina. Sono stati piastrati volumi differenti di cellule trasformate (da 60 a 100 µl) in modo da ottenere, almeno per una piastra, una spaziatura delle colonie che ne facilitasse il prelievo. Le piastre sono state incubate overnight a 37°C. Il giorno successivo, dopo che le cellule di *E. coli* hanno originato colonie sulle piastre con terreno solido, si è proceduto al prelievo di alcune colonie, quelle il più possibile isolate, attraverso l'utilizzo di un puntale per micropipetta pulito. Nella fase dello Screening delle colonie sono state prelevate o 'piccate' dalle piastre circa 100 colonie e trasferite ciascuna all'interno di un pozzetto di una piastra da PCR da 96, dove erano stati precedentemente aliquotati 12 µl di H<sub>2</sub>O sterile, e dove sono state lisate a 96°C per 6'.

Si è proceduto, infine, all'Amplificazione delle colonie lisate, utilizzando la coppia di primers universali M13 FORWARD (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') e M13 REVERSE (5' CAGGAAACAGCTATGAC-3'), disegnati sulla sequenza del plasmide.

Le condizioni per l'amplificazione, su un volume totale di reazione di 20 µl, sono state: Buffer [1x], dNTPs [0.2 mM], MgCl<sub>2</sub> [2.5 mM], primers [2 picomoli/campione], Taq-polimerasi [0.5 Unità/campione], 1 µl di DNA templato (colonia lisata) su campione e H<sub>2</sub>O sterile a volume. Il profilo termico è stato il seguente:

FASE	Temperatura	Durata	Ripetizioni
<b>Denaturazione iniziale</b>	95 °C	2 min	
<b>Denaturazione</b>	95 °C	30 s	
<b>Annealing</b>	56° C	1 min	33 cicli
<b>Estensione</b>	72 °C	1'30''	
<b>Estensione finale</b>	72 °C	5 min	

**Tabella II:** Profilo termico per l'amplificazione delle colonie lisate.

Tutti gli amplificati sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica orizzontale su gel di agaroso all'1,8 %, caricando da 1 a 5 µl di ciascun campione per pozzetto e in presenza di un marcatore molecolare di peso noto composto da quattordici singoli frammenti, da 100 a 3000 paia di basi (Thermo Scientific O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use), utilizzando la stessa strumentazione e metodologia precedentemente descritta per l'analisi degli estratti. In seguito al clonaggio sono state selezionate 300 colonie per ciascuna delle cinque specie oggetto di questa parte dello studio, e successivamente amplificate, 3 piastre da PCR da 96, per un totale di 288 (c.ca 300) inserti per specie. Di questi, circa 30 (per specie) sono stati scelti, in base alla banda che si presentava più netta e pulita e con minor residuo di dimeri di primers e mandati a sequenziare presso il servizio di sequenziamento Macrogen.

### **Analisi e allineamento**

Il sequenziamento di alcuni cloni è stato effettuato, mediante il servizio Ez-seq di Macrogen®, su un unico filamento utilizzando il primer M13-Forward. La qualità dei cromatogrammi è stata buona per la maggior parte delle sequenze. Dopo il taglio delle porzioni plasmidiche adiacenti all'inserto clonato, le sequenze sono state allineate con il programma Clustal W implementato

in MEGA versione 6 (Tamura *et al.*, 2013) e sottoposte alla ricerca BLAST/N sul sito NCBI (National Center for Biotechnology Information) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

### **Ibridazione *in situ* in fluorescenza del rDNA 5S**

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza è stata effettuata utilizzando le sonde di rDNA 5S specie-specifiche di *G. fimbriatus*, *G. flavimarginatus*, *G. javanicus*, *G. unicolor* e *M. helena*, ottenute per amplificazione per PCR del DNA genomico di ogni specie, e utilizzandole sia direttamente che dopo clonaggio. In particolare sono stati utilizzati i cloni: n° 165 2pD9 (3000 bp) e n° 230 3pC5 (2500 bp) per la specie *G. fimbriatus*, i cloni n°71 1pB9 (2500 bp) e n° 168 2pA9 (2500 bp) per *G. flavimarginatus*, i cloni n°5 1pA4 (2500 bp) n°7 1pC5 (2500bp) per *G. javanicus*, i cloni n°127 2pB4 (2500 bp) e n° 157 3pD8 (2500 bp) per *G. unicolor* e i cloni n° 77 1pD10, n° 110 2pC2 e n° 193 3pH1 per *M. helena*.

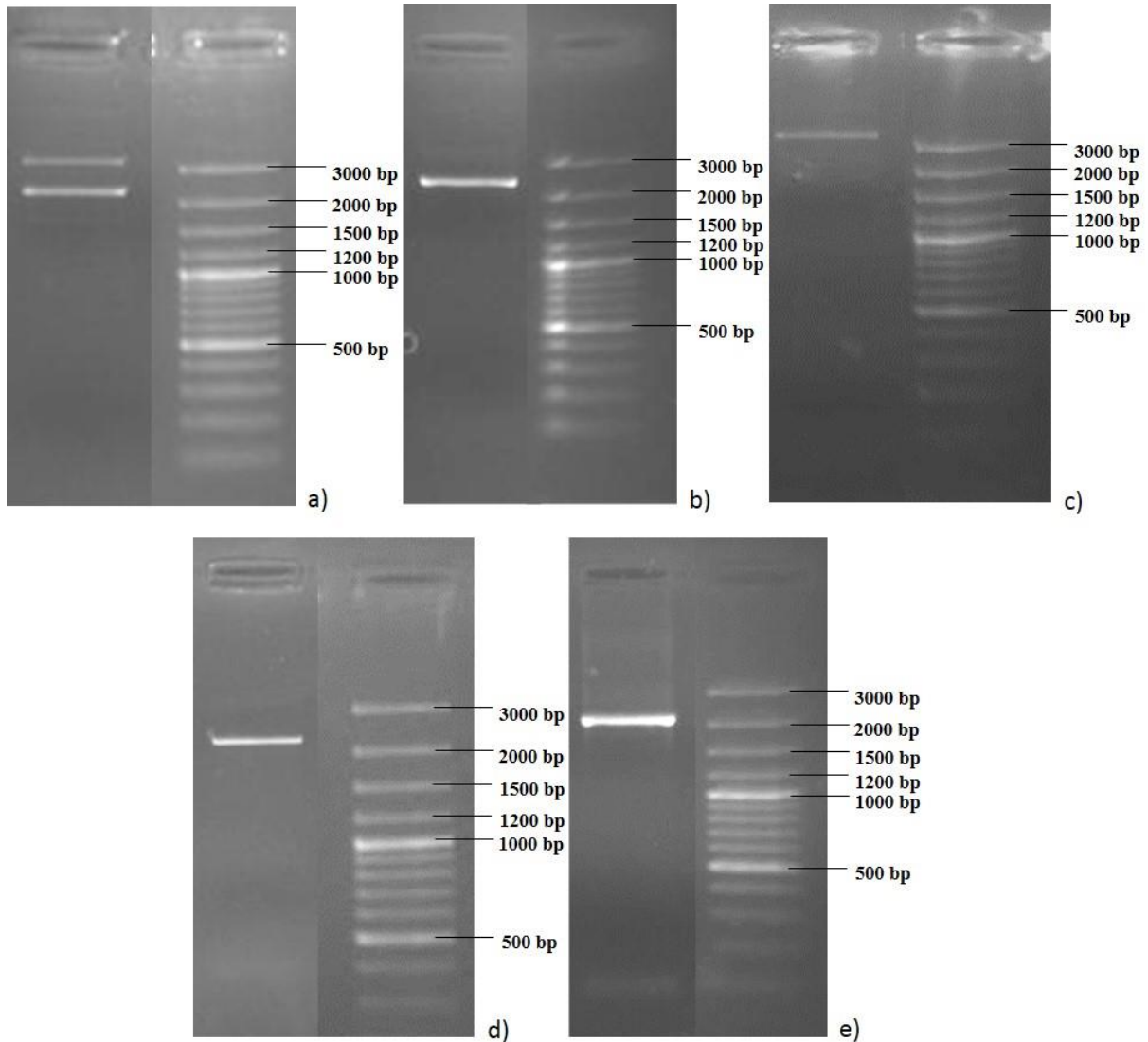
La FISH è stata eseguita secondo Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000). In particolare, le sonde sono state marcate mediante Nick translation utilizzando un kit di marcatura (ROCHE) e come marcatore la biotina-16-dUTP (ROCHE) o la digossigenina-11-dUTP (ROCHE), seguendo il protocollo del kit.

I preparati cromosomici delle cinque specie di murene sono stati ottenuti mediante colture cellulari di linfociti secondo (Cau *et al.*, 1988). I vetrini sono stati pretrattati con RNasi (SIGMA) (100µg/ml in 2xSSC) per 1 ora a 37 °C e denaturati a 70 °C per 2 min. in formammide al 70% in 2xSSC. Dopo denaturazione della sonda per 8 min. a 70 °C, l'ibridazione è stata fatta a 37 °C per 16 ore. I lavaggi post-ibridazione sono stati effettuati ad alta stringenza mediante 2 incubazioni successive di 5 minuti ciascuna in 0,1xSSC a 42°C, seguite da 2 incubazioni in 2xSSC a 37°C e un'incubazione di 5 minuti a 37°C in Tween 20 (0,025% in 2xSSC). Per il rilevamento del segnale d'ibridazione delle sonde marcate con biotina, è stata utilizzata avidina coniugata con isotiocianato di fluorescina (FITC) (VECTOR) o extravidina coniugata con tetrametil-iso-tiocianato di rodamina (TRITC) (SIGMA), per 30 min. a 37°C in camera umida, con una singola amplificazione. Per il rilevamento delle sonde marcate con digossigenina è stato utilizzata un'anti-digossigenina coniugata con FITC o TRITC (SIGMA). L'utilizzo di fluorocromi di diverso colore è stato necessario per gli esperimenti di FISH doppia effettuati sulla specie *G. fimbriatus*, dove sono state ibridate contemporaneamente la sonda di rDNA 5S e una sonda di rDNA 45S di *Xenopus laevis*. Dopo la FISH i vetrini sono stati decolorati e colorati con il colorante di Wright per una migliore comprensione ed identificazione delle coppie cromosomiche o è stato applicato il bandeggio C secondo la tecnica di Cau *et al.* (1988) per la contemporanea visualizzazione delle regioni eterocromatiche.

## Risultati

### Amplificazione e sequenziamento

L'amplificazione del DNA ribosomiale 5S, ha permesso di ottenere frammenti di lunghezza compresa tra 2000 e 3000 bp in tutte le specie (Figura 4).



**Figura 4:** Bande elettroforetiche degli amplificati di rDNA 5S di: *G. javanicus* (a); *G. flavimarginatus* (b); *G. fimbriatus* (c); *M. helena* (d) e *G. unicolor* (e). A destra in ciascuna foto il marcatore da 3000 bp.

Dopo clonaggio, l'amplificazione degli inserti ha permesso di ottenere dei frammenti di lunghezza compresa tra 2000 e 3000 bp, corrispondenti agli amplificati d'origine (Figura 5).

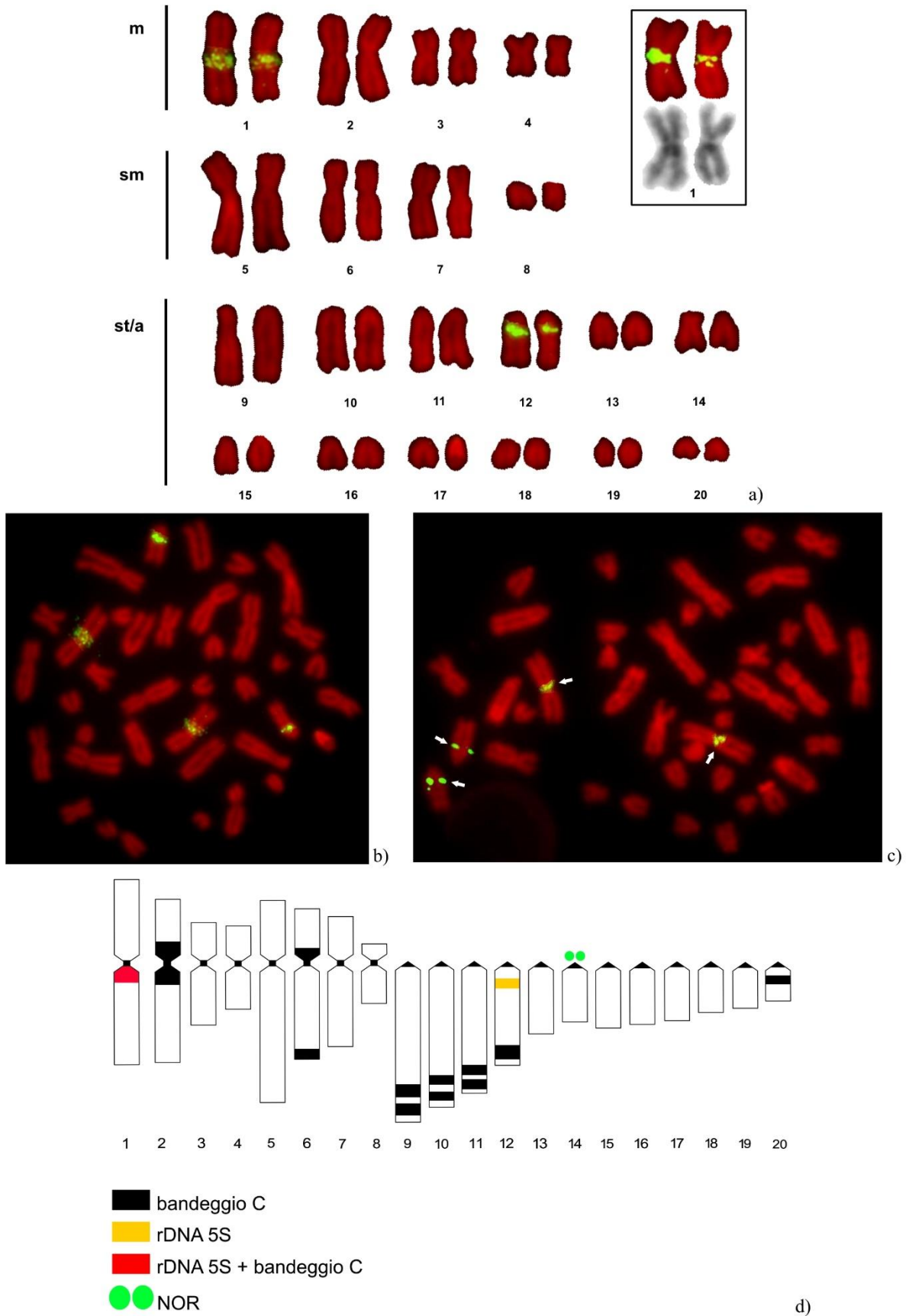


## FISH di rDNA 5S

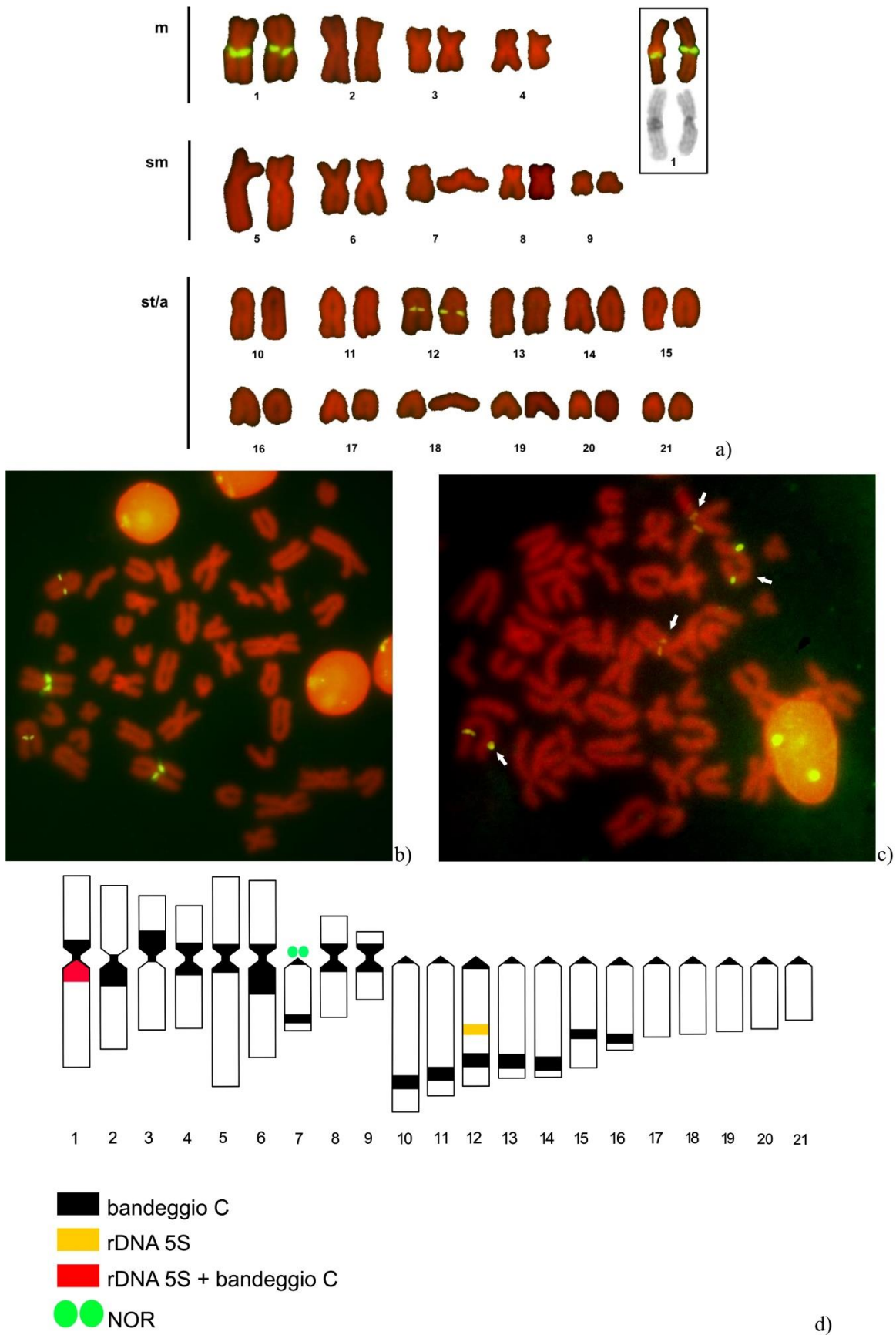
L'ibridazione *in situ* in fluorescenza delle sonde di rDNA 5S specie-specifiche, sia di quelle ottenute mediante amplificazione per PCR, che di quelle ottenute dai singoli cloni, ha permesso di localizzare a livello cromosomico la famiglia genica ribosomiale minore in tutte le cinque specie analizzate:

- ✓ In *G. javanicus* e *M. helena*, la FISH ha prodotto un risultato simile. I segnali fluorescenti sono stati localizzati in due coppie cromosomiche: in posizione sottocentromerica nella coppia metacentrica n°1 del complemento e in posizione interstiziale nella coppia acrocentrica n°12. Il successivo trattamento di bandeggio C delle stesse piastre metafasiche ha evidenziato la sovrapposizione dei segnali fluorescenti del cromosoma 1 con una banda C positiva. L'ibridazione dei cloni ha confermato il risultato ottenuto precedentemente con la sonda dell'amplificato, con differenze nell'intensità dei segnali presenti nella coppia metacentrica n°1, che apparivano spesso molto deboli o non visibili (Figure 7 e 8).
- ✓ In *G. fimbriatus*, la FISH ha prodotto segnali fluorescenti in tre coppie cromosomiche: a livello sottocentromerico nella coppia acrocentrica n°9, nella coppia acrocentrica n°10 sia a livello centromerico che in posizione prossimale e infine nella coppia n°11 nella regione subtelomerica. L'ibridazione contemporanea del rDNA 5S e del rDNA 45S sulle stesse piastre metafasiche (FISH doppia), ha mostrato segnali fluorescenti corrispondenti alle due sonde nella stessa coppia cromosomica n°9, in posizione adiacente ma non sovrapposta, con il 5S rDNA in posizione più prossimale. Il successivo trattamento di bandeggio C sulle stesse piastre metafasiche ha evidenziato la presenza nella stessa regione di una banda C positiva. L'ibridazione effettuata utilizzando i cloni ha confermato il risultato precedentemente ottenuto con la sonda dell'amplificato con differenze nell'intensità dei segnali presenti nella coppie n.10 e 11, che apparivano spesso molto deboli o non visibili (Figura 9).
- ✓ In *G. flavimarginatus* la FISH ha prodotto segnali fluorescenti in tre coppie cromosomiche: a livello paracentromerico della coppie submetacentriche n°3 e 8 e in posizione pericentromerica nei cromosomi 6. Il successivo trattamento di bandeggio C delle stesse piastre metafasiche ha evidenziato la sovrapposizione dei segnali fluorescenti con una banda C positiva nei cromosomi 6 e 8. Nel cromosoma 3 la banda C positiva è risultata adiacente ma non sovrapposta. L'ibridazione effettuata utilizzando i cloni ha confermato il risultato precedentemente ottenuto con la sonda dell'amplificato, con differenze nell'intensità dei segnali presenti nelle coppie 6 e 8, che apparivano spesso molto deboli o non visibili (Figura 10).

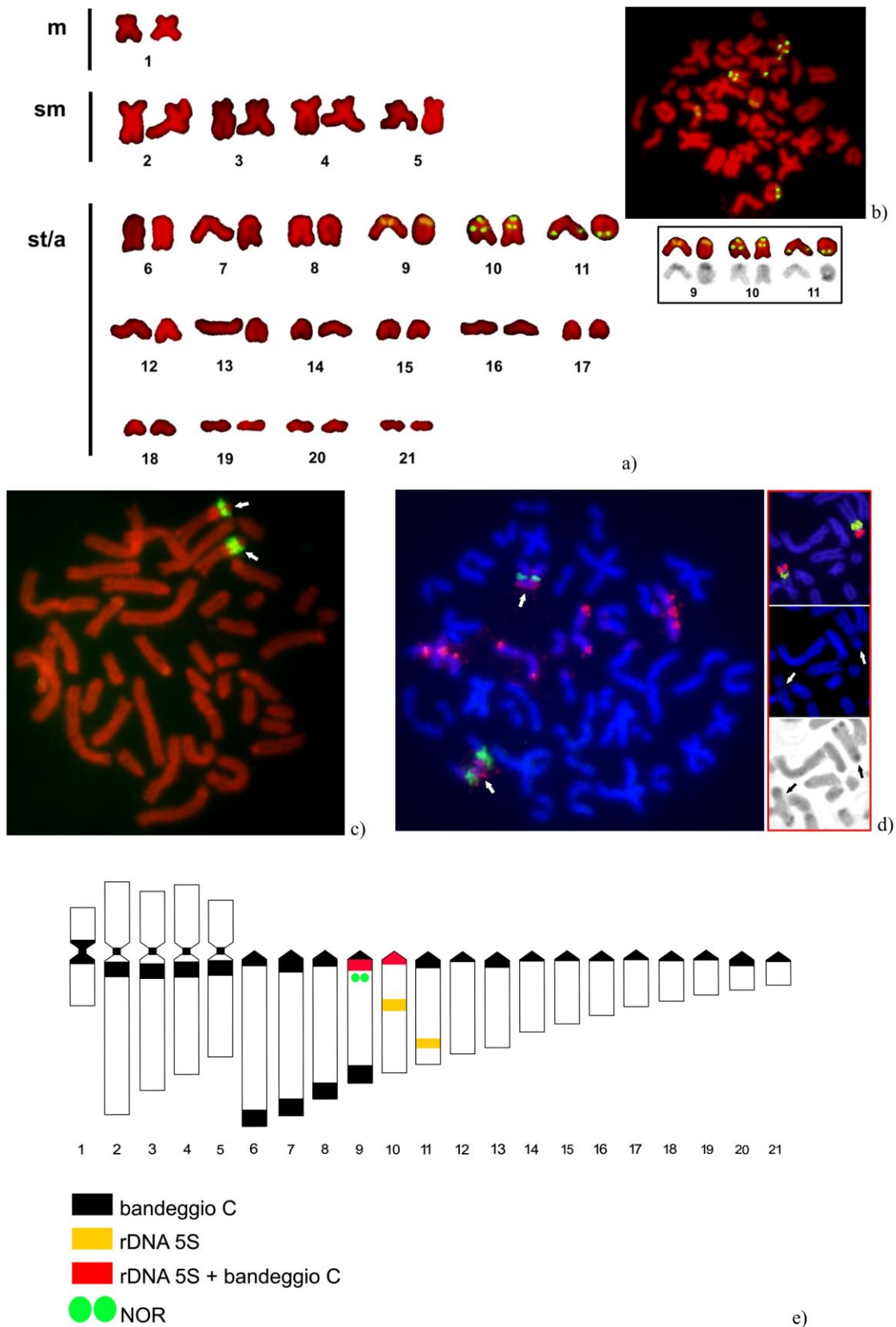
- ✓ In *G. unicolor*, la FISH ha prodotto segnali fluorescenti in una sola coppia cromosomica: a livello interstiziale della coppia acrocentrica n°10, sia utilizzando come sonda l'amplificato che i cloni (Figura 11).



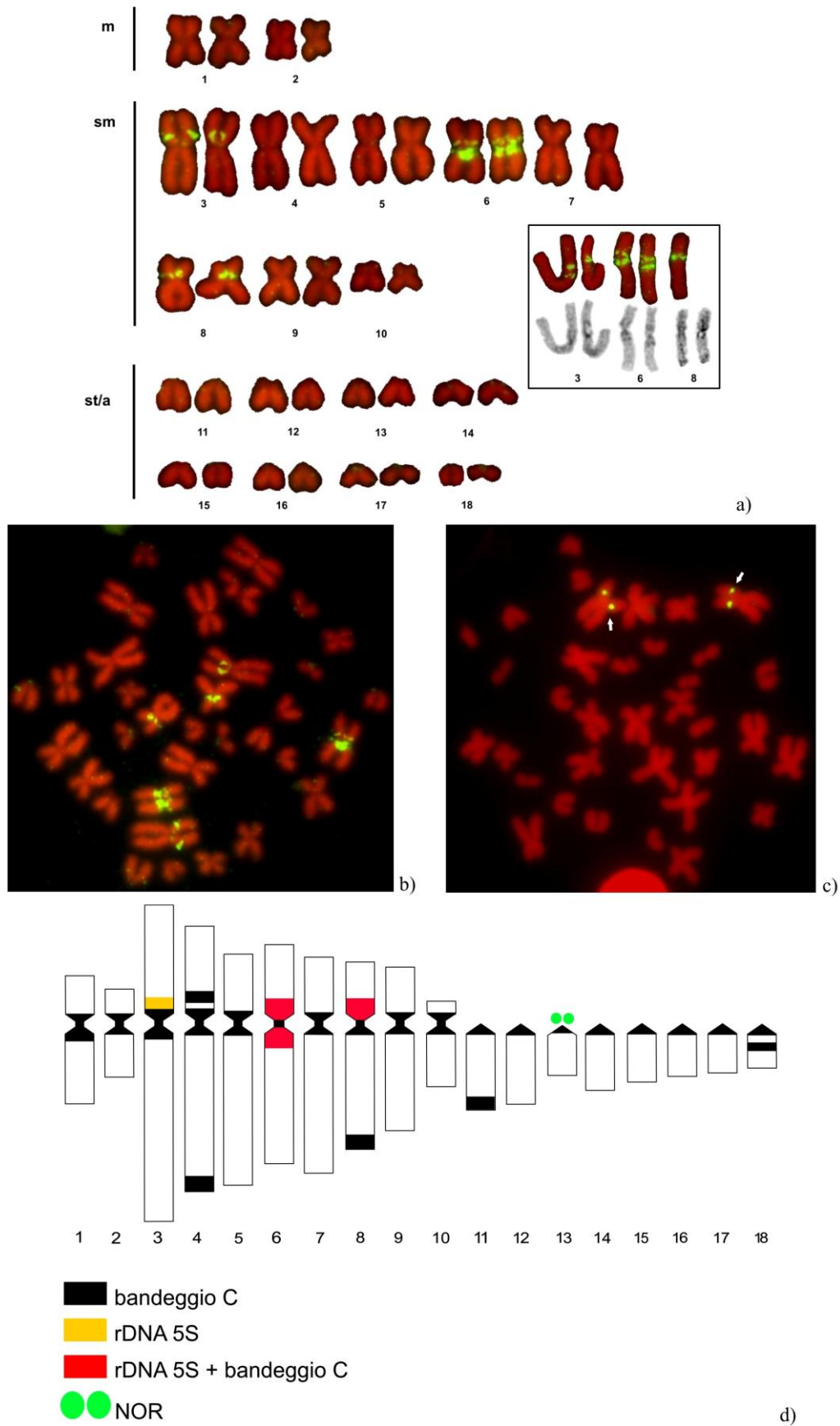
**Figura 7:** Localizzazione del rDNA 5S in *G. javanicus*: cariogramma (a) e relativa piastra metafasica (b) dopo ibridazione *in situ* in fluorescenza; piastra metafasica dopo FISH di un clone (c); idiogramma in cui sono rappresentati il bandeggio C e la localizzazione dei geni ribosomiali (d). Le frecce indicano i segnali di FISH. Nel riquadro è rappresentata la coppia cromosomica n°1 dopo FISH e successivo bandeggio C.



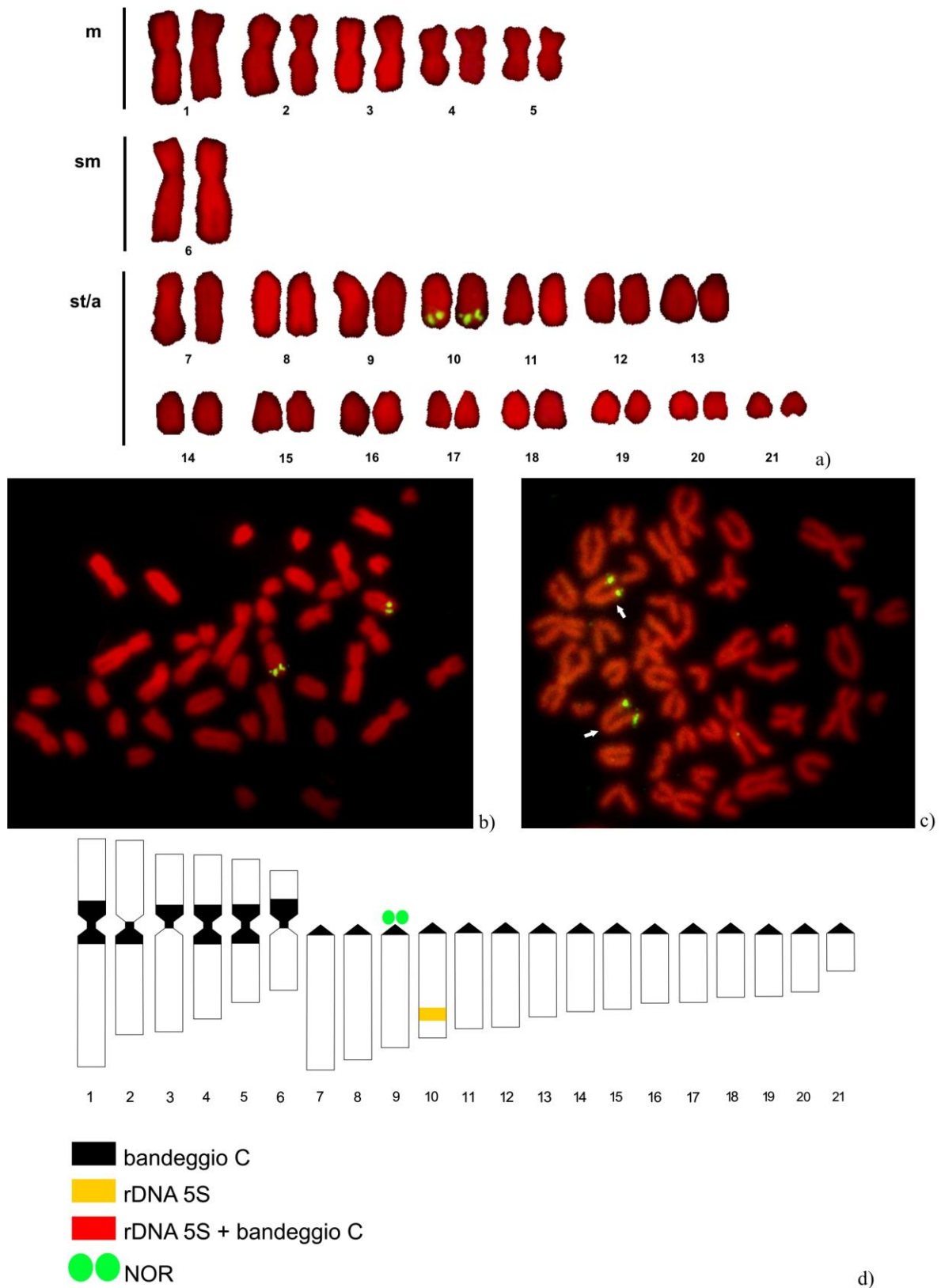
**Figura 8:** Localizzazione del rDNA 5S in *M. helena*: cariogramma (a) e relativa piastra metafasica (b) dopo ibridazione *in situ* in fluorescenza; piastra metafasica dopo FISH di un clone (c); idiogramma in cui sono rappresentati il bandeggio C e la localizzazione dei geni ribosomiali (d). Le frecce indicano i segnali di FISH. Nel riquadro è rappresentata la coppia cromosomica n°1 dopo FISH e successivo bandeggio C.



**Figura 9:** Localizzazione del rDNA 5S in *G. fimbriatus*: cariogramma (a) e relativa piastra metafasica (b) dopo ibridazione *in situ* in fluorescenza; piastra metafasica dopo FISH di un clone (c); piastra metafasica dopo FISH doppia (d); idiogramma in cui sono rappresentati il bandeggio C e la localizzazione dei geni ribosomiali (e). Le frecce indicano i segnali di FISH. Nel riquadro sono rappresentate le coppie cromosomiche n°9, 10, 11 dopo FISH e successivo bandeggio C.



**Figura 10:** Localizzazione del rDNA 5S in *G. flavimarginatus*: cariotogramma (a) e relativa piastra metafasica (b) dopo ibridazione *in situ* in fluorescenza; piastra metafasica dopo FISH di un clone (c); idiogramma in cui sono rappresentati il bandeggio C e la localizzazione dei geni ribosomiali (d). Le frecce indicano i segnali di FISH. Nel riquadro sono rappresentate le coppie cromosomiche n° 3, 6, 8 dopo FISH e successivo bandeggio C.



**Figura 11:** Localizzazione del rDNA 5S in *G. unicolor*: cariogramma (a) e relativa piastra metafasica (b) dopo ibridazione *in situ* in fluorescenza; piastra metafasica dopo FISH di un clone (c); idiogramma in cui sono rappresentati il bandeggio C e la localizzazione dei geni ribosomiali (d). Le frecce indicano i segnali di FISH.

## ***Discussione***

Differenti tipi di organizzazione cromosomica della famiglia ribosomiale 5S sono stati evidenziati nelle cinque specie di murene studiate. In una sola specie l'rDNA è stato localizzato in un'unica coppia mentre nelle altre specie è risultato presente in 2- 3 coppie cromosomiche. La presenza di cluster multipli di geni ribosomiali 5S è comunemente trovata nei pesci, a differenza di altri vertebrati come mammiferi in cui è prevalentemente riportato in una sola coppia cromosomica (Martins e Wasko, 2004).

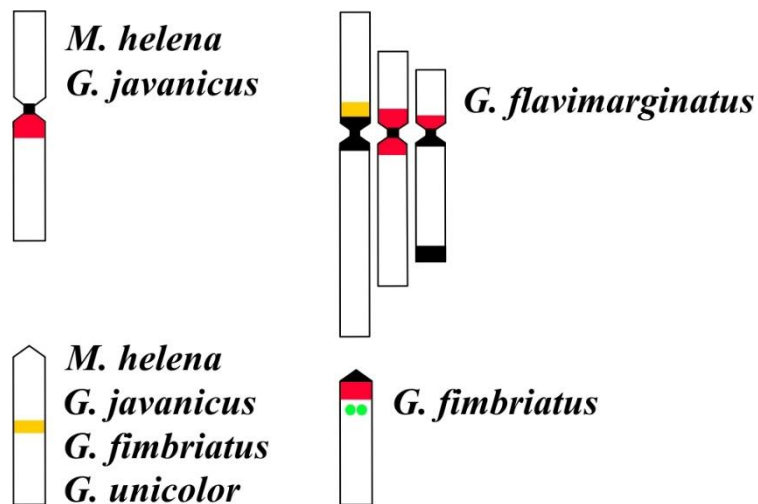
La localizzazione interna al cromosoma, evidenziata in tutte le specie, è in accordo con la situazione più frequentemente riscontrata nei vertebrati; è stato ipotizzato che questa posizione interna sia vantaggiosa per la protezione di queste sequenze da riarrangiamenti a cui sono particolarmente soggette le sequenze ripetute (Martins e Wasko, 2004).

Dei diversi loci 5S, alcuni risultano conservati tra le specie di murene studiate mentre altri appaiono specie-specifici. In *M. helena* e *G. javanicus* si osserva una distribuzione simile di tutti i cluster mentre le altre specie presentano solo alcuni loci comuni. In quasi tutte le specie sono presenti i geni 5S in uno o più cromosomi acrocentrici e la localizzazione in un cromosoma bi-bracci in posizione paracentromerica, è comune a tre specie: *M. helena*, *G. javanicus* e *G. flavimarginatus*. Il fatto che questi ultimi cluster siano presenti nelle specie con il maggior numero di cromosomi bi-bracci (Tabella III) e in associazione con regioni eterocromatiche, suggerisce che i riarrangiamenti cromosomici alla base delle differenziazioni della struttura del cariotipo (Coluccia *et al.*, 2015) possano aver coinvolto questa famiglia genica. Inoltre la localizzazione pericentromerica nel cromosoma 6 di *G. flavimarginatus*, potrebbe confermare l'ipotesi della presenza di una fusione centrica che avrebbe determinato un cariotipo di 36 cromosomi, il più basso riscontrato nella famiglia (Coluccia *et al.*, 2015). La presenza di regioni eterocromatiche potrebbe rendere conto della variabilità dell'intensità dei segnali riscontrata per alcuni loci 5S, che potrebbe essere legata ad un polimorfismo dell'eterocromatina associata. Non è da escludere la presenza di differenti tipi di 5S dovuti a variazioni nell'NTS, o a pseudogeni (Martins *et al.*, 2002) già riscontrati in molte specie come nel caraciforme *Leporinus* (Martins e Galetti 2001), e in anfibi del genere *Engystomops* (Rodrigues *et al.*, 2012). I geni ribosomiali 5S sono risultati localizzati su cromosomi diversi dal NOR precedentemente studiato (Coluccia *et al.*, 2015) in quattro specie, mentre in *G. fimbriatus* sono risultati sintonici sulla stessa coppia cromosomica ma non sovrapposti. Le sequenze ribosomiali 5S sono state localizzate in regioni eterocromatiche in molte specie animali colocalizzate con retrotrasposoni ed altri elementi ripetitivi, come ad esempio nelle famiglie di pesci Ciclidae ed Erythrinidae (Gross *et al.* 2009; Morescalchi *et al.*, 2011; Ferreira *et al.* 2008). L'associazione con i geni

ribosomiali 45S è la più frequente (Pendas *et al.*, 1994; Moran *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 2006). Tra gli anguilliformi i geni 5S sono stati localizzati in un'unica coppia nelle anguille atlantiche *A. anguilla* e *A. rostrata* e nel grongo *C. conger* (Martinez *et al.*, 1996; Nieddu *et al.*, 1998; Deiana *et al.*, 2006), in quest'ultima specie in associazione con il NOR.

Questi risultati confermano che complessi riarrangiamenti cromosomici hanno differenziato la struttura del cariotipo delle murene. Tuttavia un approfondimento dello studio della famiglia genica ribosomiale minore e l'ampliamento dell'analisi citogenetica ad altre specie della famiglia sono necessari per poter studiare l'evoluzione del cariotipo e contribuire alla ricostruzione dei rapporti filogenetici all'interno della famiglia.

**Tabella III: Localizzazione cromosomica del rDNA 5S**



**Bibliografia:**

- Cau, A., Salvadori, S., Deiana, A. M., Bella, J. L., & Mezzanotte, R.** (1988). The characterization of *Muraena helena* L. mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions, and in situ digestion with restriction endonucleases. *Cytogenetic and Genome Research*, 47(4), 223–226.
- Coluccia, E., Deidda, F., Cannas, R., Lobina, C., Cuccu, D., Deiana, A. M., & Salvadori, S.** (2015). Comparative cytogenetics of six Indo-Pacific moray eels (Anguilliformes: Muraenidae) by chromosomal banding and fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Fish Biology*, 87(3), 634–645.
- Deiana, A. M., Cau, A., Salvadori, S., Coluccia, E., Cannas, R., Milia, A., & Tagliavini, J.** (2000). Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Perciformes, Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome. *Chromosome Research*, 8(3), 213–218.
- Deiana, A. M., Coluccia, E., Cannas, R., Pesci, P., Fonnesu, A., & Salvadori, S.** (2006). Colocalization of the ribosomal gene families in Conger conger (Anguilliformes, Congridae). *Italian Journal of Zoology*, 73(01), 1–5.
- Ferreira, I. A., & Martins, C.** (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, 39(4), 411–418.
- Fujiwara A, Abe S, Yamaha E, Yamazaki F, Y. M.** (1998). Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes Atushi Fujiwara, Syuiti Abe, Etsuro Yamaha, Fumio Yamazaki &. *Chromosome Research*, 6, 463–471.
- Gross, M. C., Schneider, C. H., Valente, G. T., Porto, J. I. R., Martins, C., & Feldberg, E.** (2009). Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 127(1), 43–53.
- Hadjiolov, A. A.** (1985). *Ribosome biogenesis in the life cycle of normal and cancer cells*. Springer.
- Long, E. O., & Dawid, I. B.** (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49(1), 727–764.
- Martinez JL, Mòran P, Garcia-Vàsquez E, Pendàs AM** (1996). Chromosomal localization of the major and minor 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla Anguilla*). *Cytogenet Cell Genet* 73:149-152.
- Martins, C., & Galetti, P. M.** (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers, 910, 903–910.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempi PP, Wright JM, Foresti F** (2002). Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet Genome Res* 98:78-85.
- Martins, C., & Wasko, A. P.** (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. *Focus on Genome Research*, 335–363.
- Martins, C., Wasko, A. P., Oliveira, C., Porto-Foresti, F., Parise-Maltempi, P. P., Wright, J. M., & Foresti, F.** (2003). Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenetic and Genome Research*, 98(1), 78–85.
- Martins, C., Ferreira, I. A., Oliveira, C., Foresti, F. and Galetti Jr., P. M.** (2006). A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*, 127, 133-141.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H.** (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.
- Moran, P., Martinez, J. L., Garcia-Vazquez, E., & Pendas, A. M.** (1996). Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetic and Genome Research*, 75(2-3), 145–150.
- Morescalchi, M. A., Stingo, V., & Capriglione, T.** (2011). Cytogenetic analysis in *Polypterus ornatipinnis* (Actinopterygii, Cladistia, Polypteridae) and 5S rDNA. *Marine genomics*, 4(1), 25-31.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A.** (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350.
- Nieddu, M., Pichiri, G., Coni, P., Salvadori, S., Deiana, A. M., & Mezzanotte, R.** (1998). A comparative analysis of European and American eel (*Anguilla anguilla* and *Anguilla rostrata*) genomic DNA: 5S rDNA polymorphism permits the distinction between the two populations. *Genome*, 41(5), 728–732.

- Pendás, A. M., Moran, P., Freije, J. P., & Garcia-Vazquez, E.** (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 67(1), 31–36.
- Rodrigues, D. S., Rivera, M., & Lourenço, L. B.** (2012). Molecular organization and chromosomal localization of 5S rDNA in Amazonian Engystomops (Anura, Leiuperidae). *BMC genetics*, 13(1), 1.
- Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, P.** (2000). *Practical in situ Hybridization*. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S.** (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, mst197.



## **Conclusioni**

Dai risultati di questo studio sulla caratterizzazione citogenetica mediante tecniche di citogenetica classica e molecolare di diverse specie di murena, possono essere tratte alcune conclusioni. In primo luogo la conservazione del numero diploide di 42 all'interno della famiglia appare meno rispettata con l'aumento delle specie con numero cromosomico differente, mentre è confermata la grande diversificazione del cariotipo dovuto a riarrangiamenti cromosomici ed in particolare inversioni pericentriche e fusioni robertsoniane che possono essere alla base del cambiamento sia del numero di bracci che del numero cromosomico.

Un altro aspetto riguarda l'eterocromatina costitutiva, presente in grande quantità nella maggior parte delle specie di murene, di cui si possono riconoscere regioni conservate tra molte specie e altre che hanno subito duplicazioni o amplificazioni. Dato il ruolo riconosciuto all'eterocromatina come causa di riarrangiamenti, si potrebbe ipotizzare che cambiamenti delle regioni eterocromatiche possano aver accompagnato, se non guidato eventi di speciazione nella famiglia Muraenidae.

Un interessante aspetto riguarda la localizzazione delle famiglie geniche ribosomiali. Il NOR, presente in un'unica coppia in tutte le specie, ha una posizione terminale nella maggior parte di esse, mentre la posizione interstiziale potrebbe essere derivata da un'inversione pericentrica come precedentemente dimostrato tra le specie mediterranee. La prima localizzazione di geni ribosomiali 5S nelle murene ha messo in evidenza una complessa dinamica nell'organizzazione cromosomica, che comprende sia cluster conservati che specie-specifici e, in una specie, una associazione sintenica con il NOR.

La grande diversificazione della struttura del cariotipo delle murene, sotto tutti gli aspetti indagati in questa ricerca, le differenzia da molte famiglie di teleostei marini in cui il cariotipo è estremamente conservato; i cambiamenti nell'organizzazione cromosomica potrebbero avere un ruolo chiave negli eventi di speciazione della famiglia, che hanno portato alla formazione di un gran numero di specie, molte delle quali simpatriche.

In generale, questo lavoro di tesi rappresenta un'importante contributo allo studio citotassonomico della famiglia Muraenidae utile per chiarire meglio l'evoluzione del cariotipo in questo gruppo e supportare le analisi filogenetiche.