



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR  
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS MARINHAS E TROPICAIS  
LABOMAR/UFC

**Citogenética de *Gymnothorax funebris* (Ranzani, 1840)  
(Anguiliformes: Muraenidae)**

Maria Aparecida Oliveira Alves

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

Co-orientador: Prof. Dr. Itayguara Ribeiro da Costa

Fortaleza-CE

2012

MARIA APARECIDA ALVES OLIVEIRA

**Citogenética de *Gymnothorax funebris* (Ranzani, 1840)  
(Anquiliformes: Muraenidae)**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais do LABOMAR/UFC como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

Co-orientador: Prof. Dr. Itayguara Ribeiro da Costa

Fortaleza-CE

2012

Fortaleza, 17 de dezembro de 2012.

Tese defendida e aprovada pela seguinte banca examinadora:

---

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni  
(orientador)

---

Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto  
(Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar)

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Guilherme  
(EMBRAPA – Centro de Pesquisa Agropecuária Meio Norte – CPAMN - Parnaíba)

---

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo  
(Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia)

---

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro  
(Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia)

Dedico este trabalho aos meus pais  
falecidos e ao meu filho Emanuel

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

## Agradecimentos

Primeiramente a Deus por ter me concedido firmeza e sabedoria para superar todos os obstáculos os quais pareciam impossíveis de vencê-los.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Maggioni pela confiança em aceitar-me como orientanda, bem como pela amizade, apoio e ajuda.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Itayguara Ribeiro da Costa, pela amizade, ajuda e pela orientação concedida. Graças à soma destes fatores importantes foi possível a elaboração e realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Maria Maciel Melo, minha amiga, a qual sempre ao longo de minha vida acadêmica ajudou-me em todas as circunstâncias e seu apoio de foi fundamental importância para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela amizade, ajuda e apoio dado e a disponibilidade que sempre teve em orientar-me.

Aos professores, Prof. Dr. Paulo Cascon e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Cascon, verdadeiros amigos que sempre estiveram disponíveis para apoiar-me nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. José Edvar Monteiro Júnior pela amizade, apoio, ajuda e contribuição, a qual foi importante para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Manuel Furtado de Andrade, meu amigo, através do qual, como primeiro orientador, foi possível ter acesso ao doutorado, apesar dos acidentes de percurso.

Ao Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra (UFPE), pelos ensinamentos passados sobre citogenética, apoio e amizade, os quais foram valiosos.

Às professoras, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vilna Maia e Maria José de Souza (UFPE), pelos conhecimentos que me transmitiram e que foram importantes.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Arlete Aparecida Soares pelo apoio e disponibilidade que sempre teve em ajudar-me.

Ao Hudson e Ricardo da H8K – Importação e Exportação de Peixes Ornamentais Ltda., os quais contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Ao Professor Carlos Lineu Frota Bezerra pela amizade, ajuda e apoio dado para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia pelo apoio dado como, Robson, Bruce, Edvaldo e Adalberto, bem como Evandro e Sr. Wellington.

Ao apoio concedido pela Diretora do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (UFC) Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone da Silveira Sá Borges, estando sempre disponível em ajudar-me.

Aos amigos fiéis Carlos Augusto, Raisa e Irapuan, os quais foram de fundamental importância pelo apoio e ajuda prestados para este trabalho.

Às amigas do Laboratório de Genética Molecular, Suelen e Marina, as quais sempre me ajudaram e apoiaram.

A todos os estudantes, bolsistas do Laboratório de Genética Molecular, Lucas, Paloma, Juliana, Bruno, Ednésio, Lainy, Antônio e ao Rodrigo, os quais cada um contribuiu com uma parcela de ajuda.

Aos meus pais falecidos, responsáveis pela minha existência.

A todos os meus familiares, bem como a Felipe Augusto meu sobrinho que muito contribuiu para realização deste trabalho.

Ao meu filho Emanuel, pelo incentivo e apoio.

Enfim, a todos os que tiveram sua parcela de contribuição direta ou indiretamente e aos que tiveram postura de indiferença, que me induziram a lutar em busca de meus objetivos para a realização deste trabalho.

## RESUMO

No presente trabalho foi realizado o estudo citogenético da moréia verde *Gymnothorax funebris*. O número cromossômico obtido,  $2n = 42$ , e o número fundamental,  $NF = 52$ , corroboram os dados já relatados para o gênero, onde o número cromossômico parece ser conservado. O cariótipo de *G. funebris* foi representado por 3 pares de cromossomos metacêntricos (1-3), 2 submetacêntricos (4-5) e 16 acrocêntricos (6-21). Foi observado que *G. funebris* apresentou um cariótipo assimétrico pela proporção de acrocêntricos comparada com outras espécies do gênero. A análise de similaridade cariotípica agrupou *G. funebris* e as demais espécies com cariótipos assimétricos (alta proporção de cromossomos acrocêntricos) como *G. eurustus*, *G. unicolor* e *G. vicinus*. O padrão de distribuição da heterocromática no cariótipo (bandamento C) em *G. funebris*, mostrou grandes blocos heterocromáticos paracêntricos nos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e no primeiro par acrocêntrico mostrou blocos heterocromáticos nas extremidades dos braços longos e curtos, e no restante dos acrocêntricos a presença de bandas teloméricas de menor tamanho na extremidade dos braços curtos. Os dados aqui obtidos corroboram que as inversões pericêntricas e fusões cromossômicas tenham desempenhado um papel relevante na evolução da família Muraenidae.

**Palavras-chave:** número cromossômico, Citotaxonomia, evolução, Muraenidae.

## ABSTRACT

In the present work the cytogenetic study of the green moray *Gymnothorax funebris* is presented. The chromosome number,  $2n = 42$ , and the fundamental number,  $FN = 52$ , found for the species, agree to previous results for the genus, which the chromosome number is thought to be conservative. The *G. funebris* karyotype was represented by three pairs of metacentric (1<sup>st</sup> to 3<sup>rd</sup> pairs), two pairs of submetacentric (4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> pairs) and 16 pairs of acrocentric (6<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> pairs) chromosomes. It was observed that *G. funebris* had an asymmetric karyotype when compared to other species within the genus. A karyotype similarity analysis revealed grouping of *G. funebris* with species presenting high proportion of acrocentric chromosomes, such as *G. eurostus*, *G. unicolor* and *G. vicinus*. The heterochromatin distribution pattern revealed by C-banding in *G. funebris*, showed large paracentric heterochromatic blocks in metacentric and submetacentric chromosomes. Among the acrocentric chromosomes, heterochromatic blocks were found at the tips of the long and short arms (in the 6th pair), while for the remaining, smaller telomeric bands were found at the tips of the short arms. The presented data support the view that paracentric inversions and chromosome fusions have a major role in the family Muraenidae evolution.

**Key words:** chromosome number, Citotaxonomy, evolution, Muraenidae.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
Figura 1 – Classificação das ordens (-iformes) e subordens (-oidei) dos peixes Elopomorfos e estimativas de diversidade (NELSON, 1994; ROBINS, 1989). São representados, primeiro o estágio larval e posteriormente a forma do corpo de cada um dos grupos. (Adaptado de INOUE <i>et al.</i> , 2004).....	7
Figura 2 - Relações filogenéticas entre os peixes ósseos, apresentada por Inoué <i>et al.</i> (2004) enfatizando as relações de parentesco entre os diferentes grupos de Elopomorpha.....	8
Tabela 1. Principais famílias e gêneros da ordem Anguilliformes de acordo com Nelson (2006).....	10
Figura 3 – Representantes de gêneros da família Muraenidae. A – <i>Echelycore nigricans</i> , B – <i>E. pardalis</i> , C – <i>Gymnothorax ocellatus</i> , D – <i>G. vicinus</i> , E – <i>Muraena helena</i> , F – <i>M. pavonina</i> . As imagens foram retiradas no site Fish database (www.fishbase.org, acesso em novembro de 2012).....	14
Tabela 2. Lista de espécies do gênero <i>Gymnothorax</i> . Fonte: Froese, Rainer, and Daniel Pauly, eds. (2011). Species of <i>Gymnothorax</i> (FishBase. Versão de Junho de 2011).....	15
<b>A espécie-alvo: <i>Gymnothorax funebris</i> (Ranzani, 1840)</b> .....	<b>19</b>
Figura 4 – A e B - Aspecto geral da espécie em estudo, <i>Gymnothorax funebris</i> , C – Distribuição geográfica de <i>G. funebris</i> (Computer Generated Map for <i>Gymnothorax funebris</i> (Green moray). www.aquamaps.org, version of Aug. 2010. Web. Accessed 7 Dec. 2012).....	21
<b>Importância da citogenética</b> .....	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>24</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>27</b>

<b>Capítulo 1 - Revisão sobre os estudos cariológicos em Anguiliformes - números cromossômico e fundamental, cariótipos e principais técnicas, enfazando a família Muraenidae.....</b>	<b>28</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>29</b>
Tabela 3. Famílias e espécies da ordem Anguilliformes com dados cariotípicos disponíveis na literatura. ....	32
Tabela 4 - Espécies da família Muraenidae que dispõem de dados sobre o valor-C (tamanho do genoma). 2n: número cromossômico somático.....	36
<b>2. Técnicas relacionadas ao estudo dos cromossomos.....</b>	<b>37</b>
2.1 Estimulação Mitótica.....	37
2.2 Cultura de células.....	37
2.3 Determinação do número cromossômico somático e do número fundamental (NF) e caracterização dos cariótipos por coloração convencional (Giemsa) .....	37
2.4. Técnicas de diferenciação longitudinal por meio de:.....	38
Bandamento C .....	39
Bandamento NOR.....	43
Bandamento de replicação.....	45
<b>3. CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>
<b>Capítulo 2 - The chromosomes of <i>Gymnothorax funebris</i> and the karyotypical     evolution in <i>Gymnothorax</i> (Anguilliformes: Muraenidae).....</b>	<b>54</b>
<b>Summary .....</b>	<b>56</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>57</b>
<b>Material and Methods.....</b>	<b>58</b>

Sampling.....	58
Mitotic Stimulation and Cell Culture.....	58
Chromosome and fundamental numbers and karyotype description .....	59
[Table 1. Chromosome numbers for <i>Gymnothorax</i> species (Muraenidae, Anguiliformes). 2n: diploid chromosome number, FN: fundamental number.].....	60
<b>Results and Discussion.....</b>	<b>60</b>
[Figure 1. Karyotype of <i>Gymnothorax funebris</i> after Giemsa staining (A) and C-banding (B).] .....	61
[Figure 2. Bray-Curtis similarity dendrogram based on a matrix of karyotypical data. [A] indicates the group with predominantly symmetric karyotypes, and [B] indicates the group with asymmetric karyotypes.] .....	64
<b>References.....</b>	<b>64</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>68</b>

## INTRODUÇÃO

Existem três principais grupos de peixes atuais, cada qual vindo de uma linhagem evolutiva diferente. O grupo mais primitivo inclui os Agnata, peixes sem mandíbulas, das classes Myxini (peixes bruxa) e Petromyzantida (lampreias) originadas há mais de 500 milhões de anos. A classe Condrichthyes, dos peixes cartilagosos, teve origem há mais de 440 milhões de anos e incluem as quimeras, os tubarões e as raias.

Os peixes ósseos verdadeiros, da classe Osteichthyes, surgiram no Siluriano Superior (430 milhões de anos). Os Osteichthyes são divididos em quatro subclasses Dipnoi, Crossopterygii, Brachyopterygii e Actinopterygii. Esta última está composta pelos Chondrostei, Holostei e Teleostei. A infraclasse Teleostei corresponde a 96% de todos os peixes existentes, 23.637 espécies distribuídas em 38 ordens, 426 famílias e 4.064 gêneros (NELSON, 2006) e são conhecidos como “peixes ósseos modernos”. Os peixes marinhos do grupo Teleostei se distribuem em todos os mares do mundo e são representados segundo Patterson e Rosen (1977) e Nelson (1994), em quatro linhagens: Osteoglossomorpha, Elopomorpha, Clupeomorpha e Euteleostei.

Os peixes elopomorfos constituem o grupo basal mais diversificado dentre os Teleostei com 801 espécies agrupadas em 4 ordens, 24 famílias e 156 gêneros (NELSON, 1994) teve origem a cerca de 140 milhões de anos (Forey et al. 1996) e apresenta uma grande variação quanto à morfologia, comportamento e história de vida (BOHLKE, 1989).

Os Elopomorpha formam um dos grupos taxonomicamente mais complexos dentre os peixes (INOUE *et al.*, 2004). Dentre os Elopomorpha estão incluídas as ordens Elopiformes, Albuliformes, Saccopharyngiformes e os Anguilliformes (Figura 1). Os Elopiformes e Albuliformes ocorrem em águas costeiras e continentais, apresentam características primitivas e cauda bifurcada como nos teleósteos típicos, exceto os da subordem Notacanthoidei. Os Saccopharyngiformes ocorrem em águas profundas e apresentam uma morfologia peculiar com uma cabeça em forma de saco e o corpo alongado com uma cobra, sendo considerado pelos ictiologistas, um grupo de peixes de aparência bizarra. Os Anguilliformes (enguias-verdadeiras) tem o corpo alongado e adaptaram-se a um estilo de vida fossorial (INOUE *et al.*, 2004).

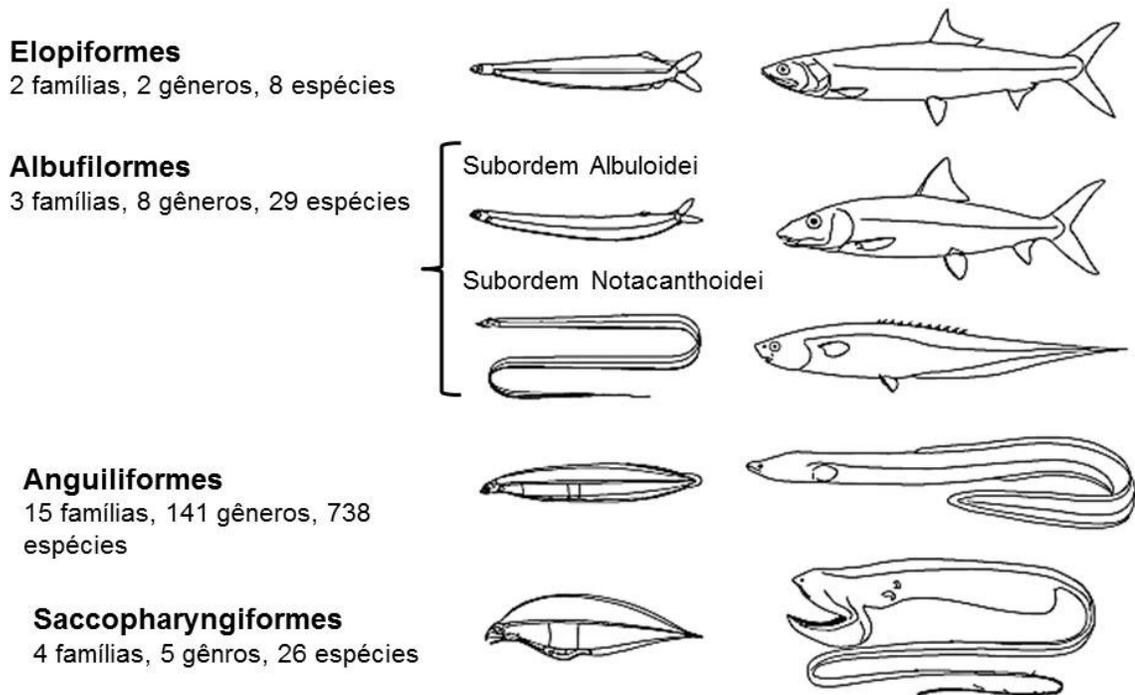


Figura 1 – Classificação das ordens (-iformes) e subordens (-oidei) dos peixes Elopomorfos e estimativas de diversidade (NELSON, 1994; ROBINS, 1989). São representados, primeiro o estágio larval e posteriormente a forma do corpo de cada um dos grupos. (Adaptado de INOUE *et al.*, 2004)

Os Anguilliformes (incluindo Saccopharingiformes) compreendem um táxon monofilético, o mais derivado, com cerca de 800 espécies em 15 famílias, entre a super ordem o qual está localizado na raiz da radiação evolucionária dos teleósteos (OBERMILLER e PFEI, 2003; INOUE *et al.*, 2004; LAWOUE *et al.*, 2008).

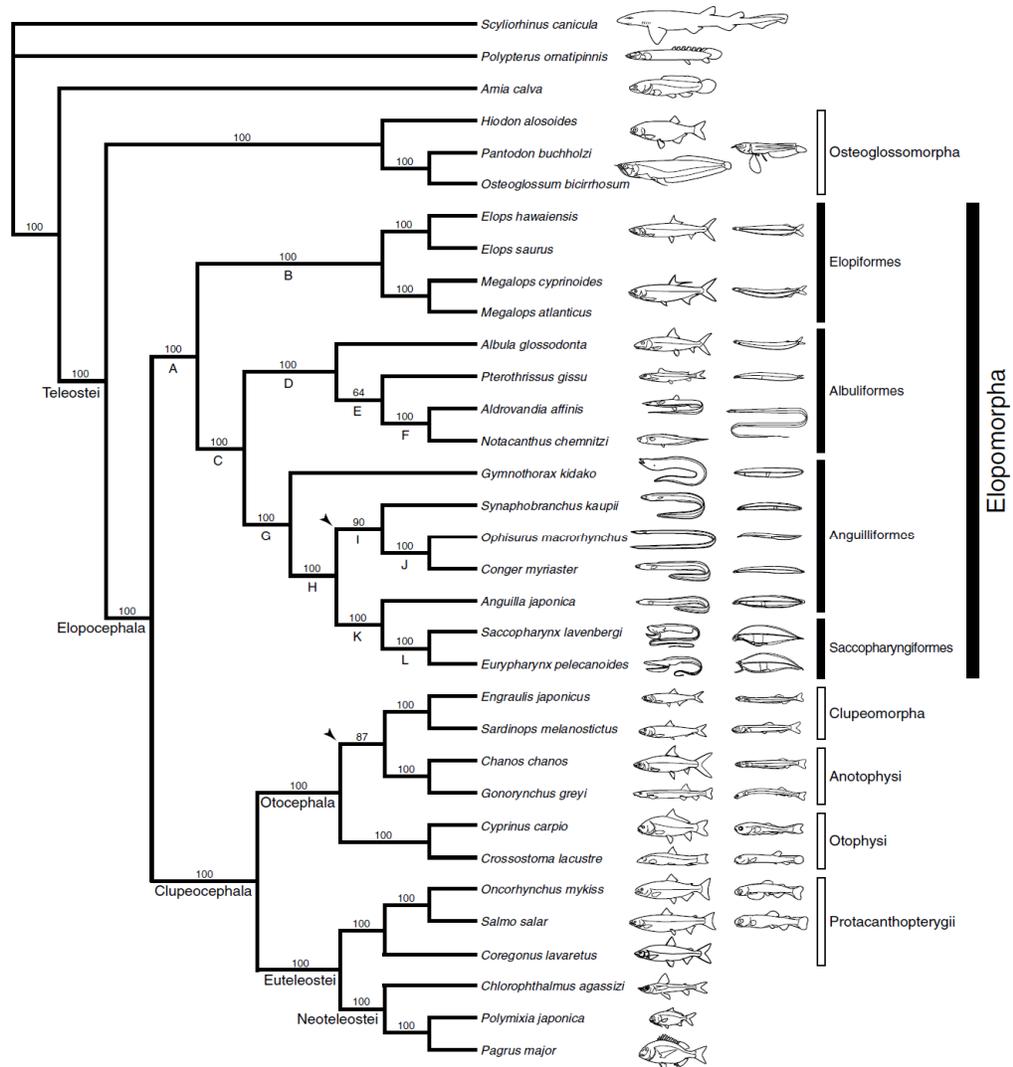


Figura 2 - Relações filogenéticas entre os peixes ósseos, apresentada por Inoué *et al.* (2004) enfatizando as relações de parentesco entre os diferentes grupos de Elopomorpha.

A ordem Anguilliformes inclui todas as moréias, congros e enguias verdadeiras (NELSON, 2006). É o táxon mais recente da super ordem Elopomorpha

e contém aproximadamente 800 espécies em 15 famílias, os quais estão localizados na raiz da radiação dos teleósteos (OBERMILLER e PFEI, 2003; INOUE *et al.*, 2004; LAWOUÉ *et al.*, 2008). Embora predominantemente marinhos, espécies de várias famílias são dulcícolas, sendo que seis destas são conhecidas apenas em água doce (NELSON 2006).

A maioria dos peixes da ordem Anguilliformes tem comportamento noturno e vivem em águas rasas, até 50 m de profundidade, enterrando-se em fundos arenosos ou lodosos, ou abrigando-se em fendas e cavidades de rochas e recifes. Algumas espécies da família Anguillidae são peixes catádromos e realizam migrações de até 5000 km para reprodução em mar aberto como a enguia americana *Anguilla rostrata* e a enguia europeia *Anguilla anguilla* (TESCH, 2003). Em termos de distribuição geográfica, indivíduos do grupo dos Anguilliformes podem ser encontrados ao longo de todos os continentes, principalmente em zonas tropicais (NELSON, 2006).

As moréias, também conhecidas como “caramuru” pelo povo indígena brasileiro, possuem como característica principal o formato do corpo alongado e cilíndrico com aparência de uma cobra. Não possuem escamas, sendo que para sua proteção, como alguns peixes, secretam um muco que inclui toxinas termoestáveis apolares polietéricas da classe “ciguatoxina”, acumulado a partir de dinoflagelados *via* cadeia trófica (LEWIS *et al.*, 1991; CHAN *et al.*, 2011). A pele das moréias apresenta padrões de cores dos mais diversos, os quais servem como camuflagem e algumas espécies podem chegar até 4m de comprimento (SMITH, 2012). O grupo é ainda caracterizado por uma forma larval peculiar aos Anguilliformes, denominada “leptocéfalo” (NELSON, 2006).

Tabela 1. Principais famílias e gêneros da ordem Anguilliformes de acordo com Nelson (2006)

---

### Subordem Anguilloidei

**Família Anguillidae** – moréias de águas doces tropicais (exceção do Leste do Pacífico e Atlântico Sul)

*Anguilla* (15 espécies)

**Família Heterenchelyidae** – moréias de águas marinhas tropicais (Atlântico e Leste do Pacífico)

*Panturichthys* (4 espécies)

*Pythonichthys* (sinônimo de *Heterenchelys*, 4 espécies)

**Família Moringuidae** – moréias espaghetti, águas marinhas, raramente dulcícolas (Trópicos, Indo-Pacífico e Oeste do Atlântico)

*Neoconger* (6 espécies)

*Moringua* (6 espécies)

### Subordem Muraenoidei

**Família Chlopsidae** - falsas moréias, águas marinhas; tropicais e subtropicais (Atlântico, Índia e Pacífico). Dezoito espécies em oito gêneros.

*Boehlkenchelys*, *Catesbya*, *Chilorhinus*, *Chlopsis*, *Kaupichthys*, *Powellichthys*, *Robinsia* e *Xenoconger*.

**Família Myrocongridae** – águas marinhas, costa leste do atlântico, Santa Helena e Pacífico).

*Myroconger* (4 espécies)

**Família Muraenidae** – moréias enguias, águas marinhas, com algumas espécies ocasionalmente dulcícolas (mares tropicais e temperados) – 15 gêneros e 185 espécies.

**Subfamília Uropterygiinae** – 4 gêneros

*Anarchias*, *Chamnuraena*, *Scuticaria*, *Uropterygius*

**Subfamília Muraeninae** – 11 gêneros

*Echidna*, *Enchelycore*, *Echelynassa*, *Gymnomuraena*, *Gymnothorax* (sinônimo de *Lycodontis* e *Rabula*), *Monopenchelys*, *Muraena*, *Rhinomuraena*, *Siderea*, *Strophidon*, *Trhyrsoidea* (*Evenchelys*)

**Subordem Congroidei** – nove famílias, 112 gêneros e cerca de 555 espécies

**Família Synphobranchidae** – moreias degoladoras, águas marinhas (Atlântico, Índico e Pacífico)– 10 gêneros e 32 espécies.

**Subfamília Ilyophinae** – moréias-mostarda – 7 gêneros

*Atractodenchelys, Dysomma, Dysommina, Ilyophis, Linkenchelys, Meadia Thermobiotus*

**Subfamília Synphobranchinae**

*Haptenchelys* (1 espécie)

*Synphobranchus* (8 espécies)

**Subfamília Simenchelyinae** – moréias parasitas

Uma única espécie, *Simenchelys parasiticus*, amplamente distribuídas dos trópicos a regiões temperadas

**Família Ophichthidae** – moréias-cobra ou moréias-verme, águas marinhas com algumas espécies ocasionalmente dulcícolas, distribuindo-se em áreas costeiras dos trópicos e regiões de águas temperadas aquecidas. Apresenta 15 gêneros e cerca de 290 espécies.

**Subfamília Myrophinae** – moréias-verme, 11 gêneros.

*Benthenchelys, Ahlia, Assarcenchelys, Glenoglossa, Mixomyrophis, Myrophis, Neenchelys, Pseudomyrophis, Schismorhynchus, Schuțzidia.*

**Subfamília Ophichthinae** – moréias-cobra, 41 gêneros, dentre os principais, destacam-se:

*Apterichtus, Bascanichthys, Caecula, Callechelys, Cirrimuraena, Dalophis, Echelus, Echiopsis, Ethadophis, Lamnostoma, Letharchus, Myrichthys, Mystriopsis, Ophichthus, Phaenomonas, Pisodonophis e Yirrkala*

**Família Colocongridae** – moréias de cauda curta, águas marinhas (Atlântico, Índico e Oeste do Pacífico). Somente um gênero.

*Cologonger*, com 5 espécies.

**Família Derichthyidae** – moréias do pescoço longo, águas marinhas (Atlântico, Índico e Pacífico)

*Derichthys* – com uma espécie

*Nessorhamphus* – 2 espécies

**Família Muraenesocidae** – marinhas (Atlântico, Índico e Pacífico) – 4 gêneros e cerca de 8 espécies

*Congresox, Cynoponticus, Muraenesox, Sauromuraenesox*

**Família Congridae** – águas marinhas tropicais a temperadas (Atlântico, Índico e Pacífico) – 32 gêneros e cerca de 160 espécies.

**Subfamília Heterocongrinae** – 2 gêneros

*Gongasia e Heteroconger*

**Subfamília Bathymyrinae** – 5 gêneros

*Ariosoma, Bathymyrus, Chiloconger, Parabathymyrus, Paraconger*

**Subfamília Congrinae** – 25 gêneros, dentre eles, os mais importantes são:

*Acromycter, Conger, Gavialiceps, Gnathophis, Hildebrandia, Lumiconger, Macrocephenchelys, Rhechias, Rhyncoconger, Uroconger e Xenomystax*

**Família Nettastomatidae** – moréias-bico-de-pato, marinhas (Atlântico, Índico e Pacífico) – 6 gêneros com cerca de 38 espécies.

*Facciolella, Hoplunnis, Nettastoma, Nettenchelys, Saurenchelys, Venefica*

**Família Serrivomeridae** – moréias-dente-de-serra, águas marinhas tropicais e temperadas (pelágicas). Atlântico, Índico e Pacífico)

*Serrivomer* – nove espécies  
*Setemonidium* – uma espécie

---

A família Muraenidae abrange 197 espécies distribuídas em 15 gêneros e duas subfamílias vivendo principalmente em águas tropicais e subtropicais (NELSON, 2006; SMITH 2012). Esta família tem sido indicada como a mais primitiva da ordem Anguilliformes (INOUE *et al.*, 2001; OBERMILLER e PFEILER, 2003; WANG *et al.*, 2003).

A família Muraenidae é uma das mais diversificadas e abundantes dentre as enguias estando entre os predadores mais importantes dos recifes, desempenhando um papel ecológico muito importante (BOHLKE *et al.* 1989; BOHLKE e RANDALL, 2000; BOHLKE & MCLOSKER, 2001; SMITH, 2012). As moréias da família Muraenidae são caracterizadas pela ausência de nadadeiras peitorais e opérculos reduzidos a poros na lateral do crânio (SMITH, 2012). A presença de mandíbulas faríngeas bem desenvolvidas e com marcada capacidade raptorial tem grande influência no seu comportamento alimentar, e provavelmente contribuíram para o sucesso do grupo como predadores de topo no ambiente recifal (MEHTA e WAINRIGHT, 2007). Dentre todos os gêneros que compõe a família Muraenidae, o gênero *Gymnothorax* Bloch 1795 destaca-se pela diversidade de espécies (Tabela 2), em parte por que o gênero agrupa a maioria das espécies de moréia com classificação indefinida, representando provavelmente um agrupamento polifilético (SMITH, 2012).

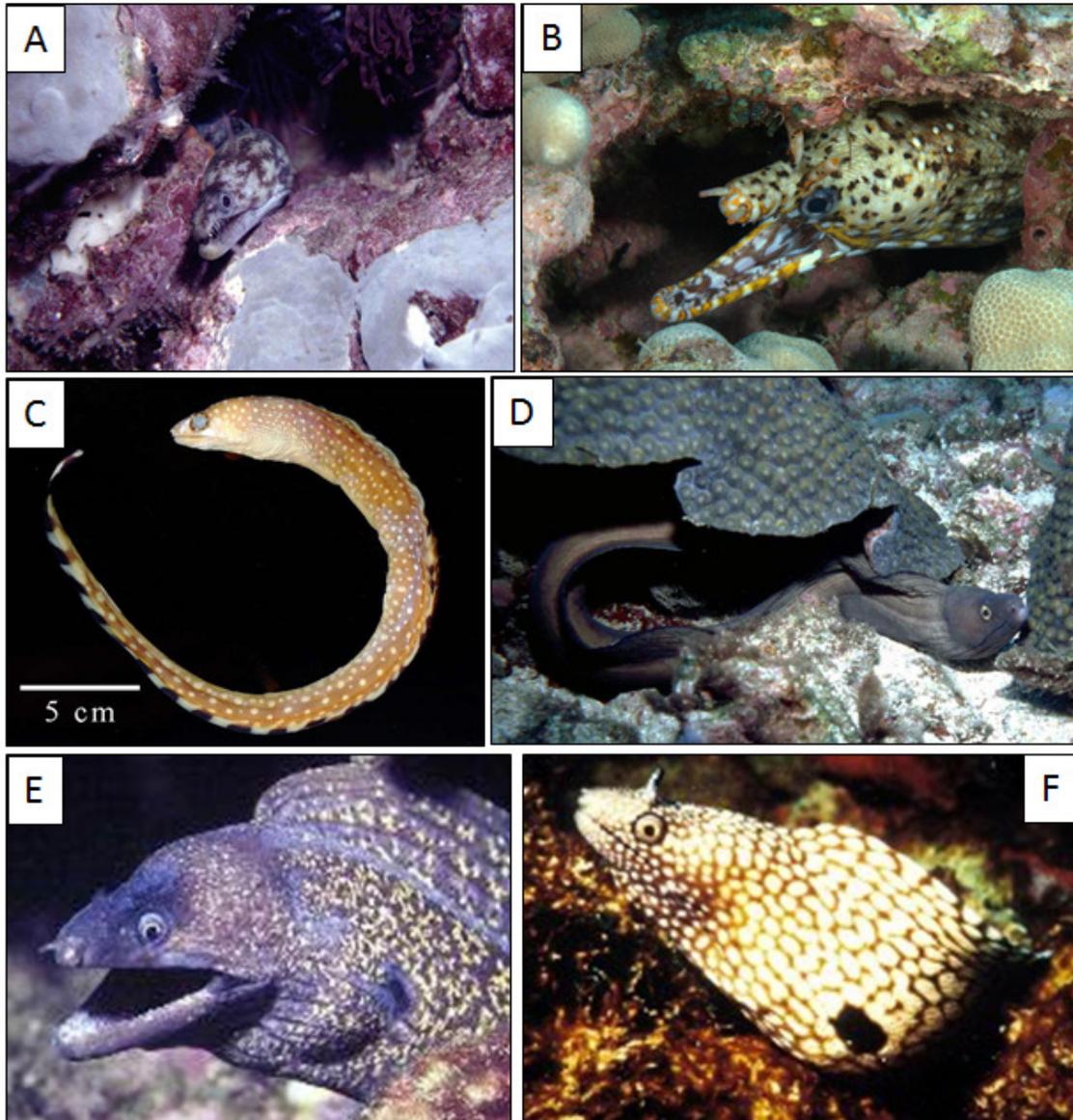


Figura 3 – Representantes de gêneros da família Muraenidae. A – *Echelycore nigricans*, B – *E. pardalis*, C – *Gymnothorax ocellatus*, D – *G. vicinus*, E – *Muraena helena*, F – *M. pavonina*. As imagens foram retiradas no site Fish database ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), acesso em novembro de 2012)

Tabela 2. Lista de espécies do gênero *Gymnothorax*. Fonte: Froese, Rainer, and Daniel Pauly, eds. (2011). Species of *Gymnothorax* (FishBase. Versão de Junho de 2011)

---

*G. afer* Bloch, 1795  
*G. albigarginatus* (Temminck & Schlegel, 1846)  
*G. angusticauda* (M. C. W. Weber & de Beaufort, 1916)  
*G. angusticeps* (Hildebrand & F. O. Barton, 1949)  
*G. annasona* (Whitley, 1937)  
*G. annulatus* D. G. Smith & E. B. Böhlke, 1997  
*G. atollii* (Pietschmann, 1935)  
*G. australicola* Lavenberg, 1992  
*G. austrinus* E. B. Böhlke & McCosker, 2001  
*G. bacalladoi* E. B. Böhlke & Brito, 1987  
*G. baranesi* D. G. Smith, Brokovich & Einbinder, 2008  
*G. bathyphilus* Randall & McCosker, 1975  
*G. berndti* Snyder, 1904  
*G. breedeni* McCosker & Randall, 1977  
*G. buroensis* (Bleeker, 1857)  
*G. castaneus* (D. S. Jordan & C. H. Gilbert, 1883)  
*G. castlei* E. B. Böhlke & Randall, 1999  
*G. cephalospilus* E. B. Böhlke & McCosker, 2001  
*G. chilospilus* Bleeker, 1864  
*G. chlamydatius* Snyder, 1908  
*G. conspersus* Poey, 1867  
*G. cribroris* Whitley, 1932  
*G. davidsmithi* McCosker & Randall, 2008  
*G. dorsalis* Seale, 1917  
*G. dovii* (Günther, 1870)  
*G. elegans* Bliss, 1883  
*G. emmae* Prokofiev, 2010  
*G. enigmaticus* McCosker & Randall, 1982  
*G. equatorialis* (Hildebrand, 1946)  
*G. eurostus* (C. C. Abbott, 1860)  
*G. eurygnathos* E. B. Böhlke, 2001  
*G. favagineus* Bloch & J. G. Schneider, 1801

*G. fimbriatus* (E. T. Bennett, 1832)

---

*G. flavimarginatus* (Rüppell, 1830)  
*G. flavoculus* (E. B. Böhlke & Randall, 1996)  
*G. formosus* Bleeker, 1864  
*G. funebris* Ranzani, 1840  
*G. fuscomaculatus* (L. P. Schultz, 1953)  
*G. gracilicauda* O. P. Jenkins, 1903  
*G. griseus* (Lacépède, 1803)  
*G. hansii* Heemstra, 2004  
*G. hepaticus* (Rüppell, 1830)  
*G. herrei* Beebe & Tee-Van, 1933  
*G. hubbsi* J. E. Böhlke & E. B. Böhlke, 1977  
*G. intesi* (Fourmanoir & Rivaton, 1979)  
*G. isingteena* (J. Richardson, 1845)  
*G. javanicus* (Bleeker, 1859)  
*G. johnsoni* (J. L. B. Smith, 1962)  
*G. kidako* (Temminck & Schlegel, 1846)  
*G. kolpos* J. E. Böhlke & E. B. Böhlke, 1980  
*G. kontodontos* E. B. Böhlke, 2000  
*G. longinquus* (Whitley, 1948)  
*G. maderensis* (J. Y. Johnson, 1862)  
*G. mareei* Poll, 1953  
*G. margaritophorus* Bleeker, 1864  
*G. marshallensis* (L. P. Schultz, 1953)  
*G. mccoskeri* D. G. Smith & E. B. Böhlke, 1997  
*G. megaspilus* E. B. Böhlke & Randall, 1995  
*G. melanosomatus* K. H. Loh, K. T. Shao & Ho. Mi. Chen, 2011  
*G. melatremus* L. P. Schultz, 1953  
*G. meleagris* (G. Shaw, 1795)  
*G. microspila* (Günther, 1870)  
*G. microstictus* E. B. Böhlke, 2000  
*G. miliaris* (Kaup, 1856)  
*G. minor* (Temminck & Schlegel, 1846)  
*G. moluccensis* Bleeker, 1864  
*G. monochrous* (Bleeker, 1856)

*G. monostigma* (Regan, 1909)  
*G. mordax* (Ayres, 1859)  
*G. moringa* (Cuvier, 1829)  
*G. mucifer* Snyder, 1904  
*G. nasuta* de Buen, 1961  
*G. neglectus* S. Tanaka (I), 1911  
*G. nigromarginatus* (Girard, 1858)  
*G. niphostigmus* Ho. Mi. Chen, K. T. Shao & C. T. Chen, 1996  
*G. nubilus* (J. Richardson, 1848)  
*G. nudivomer* (Günther, 1867)  
*G. nuttingi* Snyder, 1904  
*G. obesus* (Whitley, 1932)  
*G. ocellatus* Agassiz, 1831  
*G. panamensis* (Steindachner, 1876)  
*G. parini* Collette, D. G. Smith & E. B. Böhlke, 1991  
*G. phalarus* W. A. Bussing, 1998  
*G. phasmatodes* (J. L. B. Smith, 1962)  
*G. philippinus* D. S. Jordan & Seale, 1907  
*G. pictus* (J. N. Ahl, 1789)  
*G. pikei* Bliss, 1883  
*G. pindae* J. L. B. Smith, 1962  
*G. polygonius* Poey, 1875  
*G. polyspondylus* E. B. Böhlke & Randall, 2000  
*G. polyuranodon* (Bleeker, 1853)  
*G. porphyreus* (Guichenot, 1848)  
*G. prasinus* (J. Richardson, 1848)  
*G. prionodon* J. D. Ogilby, 1895  
*G. prismodon* E. B. Böhlke & Randall, 2000  
*G. prolatus* Sasaki & Amaoka, 1991  
*G. pseudoherreii* E. B. Böhlke, 2000  
*G. pseudothyrsoides* (Bleeker, 1852)  
*G. punctatofasciatus* Bleeker, 1863  
*G. punctatus* Bloch & J. G. Schneider, 1801  
*G. randalli* D. G. Smith & E. B. Böhlke, 1997  
*G. reevesii* (J. Richardson, 1845)

*G. reticularis* Bloch, 1795  
*G. richardsonii* (Bleeker, 1852)  
*G. robinsi* E. B. Böhlke, 1997  
*G. rueppellii* (McClelland, 1844)  
*G. sagenodeta* (J. Richardson, 1848)  
*G. sagmacephalus* E. B. Böhlke, 1997  
*G. saxicola* D. S. Jordan & B. M. Davis, 1891  
*G. serratidens* (Hildebrand & F. O. Barton, 1949)  
*G. shaoi* Ho. Mi. Chen & K. H. Loh, 2007  
*G. sokotrensis* Kotthaus, 1968  
*G. steindachneri* D. S. Jordan & Evermann, 1903  
*G. taiwanensis* Ho. Mi. Chen, K. H. Loh & K. T. Shao, 2008  
*G. thyrsoides* (J. Richardson, 1845)  
*G. tile* (F. Hamilton, 1822)  
*G. undulatus* (Lacépède, 1803)  
*G. unicolor* (Delaroche, 1809)  
*G. vagrans* (Seale, 1917)  
*G. verrilli* (D. S. Jordan & C. H. Gilbert, 1883)  
*G. vicinus* (Castelnau, 1855)  
*G. walvisensis* Prokofiev, 2009  
*G. woodwardi* McCulloch, 1912  
*G. ypsilon* Hatooka & Randall, 1992  
*G. zonipectis* Seale, 1906

---

### **A espécie-alvo: *Gymnothorax funebris* (Ranzani, 1840)**

A moréia *Gymnothorax funebris* é considerada uma das espécies mais amplamente distribuídas deste gênero, ocorrendo em todo o Atlântico ocidental do Brasil aos Estados Unidos e no Pacífico Oriental ao longo da América do Sul (Figura 4). Vivem em áreas rochosas, recifes de corais ou manguezais e podem ser encontradas até 50 m de profundidade, sendo comum até 30 m. Moréias desta espécie são conhecidas por habitar um mesmo recife por muitos anos, sendo animais bentônicos e de comportamento solitário. São predadores noturnos com deficiência visual que utilizam principalmente o olfato para caçar suas presas: peixes, lulas, polvos, caranguejos e enguias.

Moréias da espécie apresentam um comprimento médio de 1,8 m, mas podem chegar a 2,5 metros e pesar até 30 Kg. Alimentam-se a noite de peixes e crustáceos e ao longo da vida, sua coloração muda e passa do preto nos juvenis, ao verde escuro amarelado nos adultos. O verde escuro com a cor marrom de sua pele vem de uma mucosa amarelada que cobre sua pele azul para fornecer proteção contra parasitas e bactérias infecciosas. Possui corpo musculoso com uma nadadeira dorsal que se estende por todo o corpo e termina em uma nadadeira caudal curta (Figura 4).

A camuflagem muitas vezes se estende até a boca, que sempre abre e fecha lentamente para mover a água sobre as brânquias para a respiração. A boca é grande e possui fortes dentes pontiagudos e afiados que liberam toxinas, podem atacar sem ser provocada. Deve ser observada com cautela pelos mergulhadores. A

carne dos indivíduos de maiores dimensões pode ser tóxica e provocar “ciguatera”, pois acumula as toxinas de suas presas.

Devido ao seu grande tamanho, as mordidas podem ser particularmente perigosas, no entanto, a menos que as provoquem, não é uma ameaça para os seres humanos. Porém, o risco de contrair o envenenamento “ciguatera” desta espécie é considerada grande. As vítimas são localizadas primariamente pelo olfato e algumas espécies são conhecidas por usar um procedimento de apertar as presas até quebrá-las (MILLER, 1987; 1989).

De forma geral, como os demais muraenideos, *G. funebris* está associada a recifes de corais e rochedos. Vivem debaixo de rochas, mantendo a cabeça para fora e a boca aberta e seus afiadíssimos dentes ficam expostos, conferindo-lhe um aspecto assustador, espantando os outros animais com exceção de um peixe denominado Limpador o qual tem aproximadamente 10 cm de comprimento e mantém uma relação de simbiose com as moreias, limpando sua pele e removendo pedaços de alimentos presos aos seus afiados dentes. Elas não são agressivas e confundem os dedos dos humanos com os tentáculos de um polvo. Sua mordida causa acidentes graves e algumas espécies possuem veneno que inoculam ao morder. (MILLER, 1987; 1989). As moreias são ovíparas, embora pouco se conheça sobre a desova da moreia-verde, fecundidade e desenvolvimento inicial. Os alevinos possuem a forma de uma folha vegetal transparente, característica dos Anguilliformes, e são igualmente denominados de Leptocefalo. (MILLER, 1987; 1989)

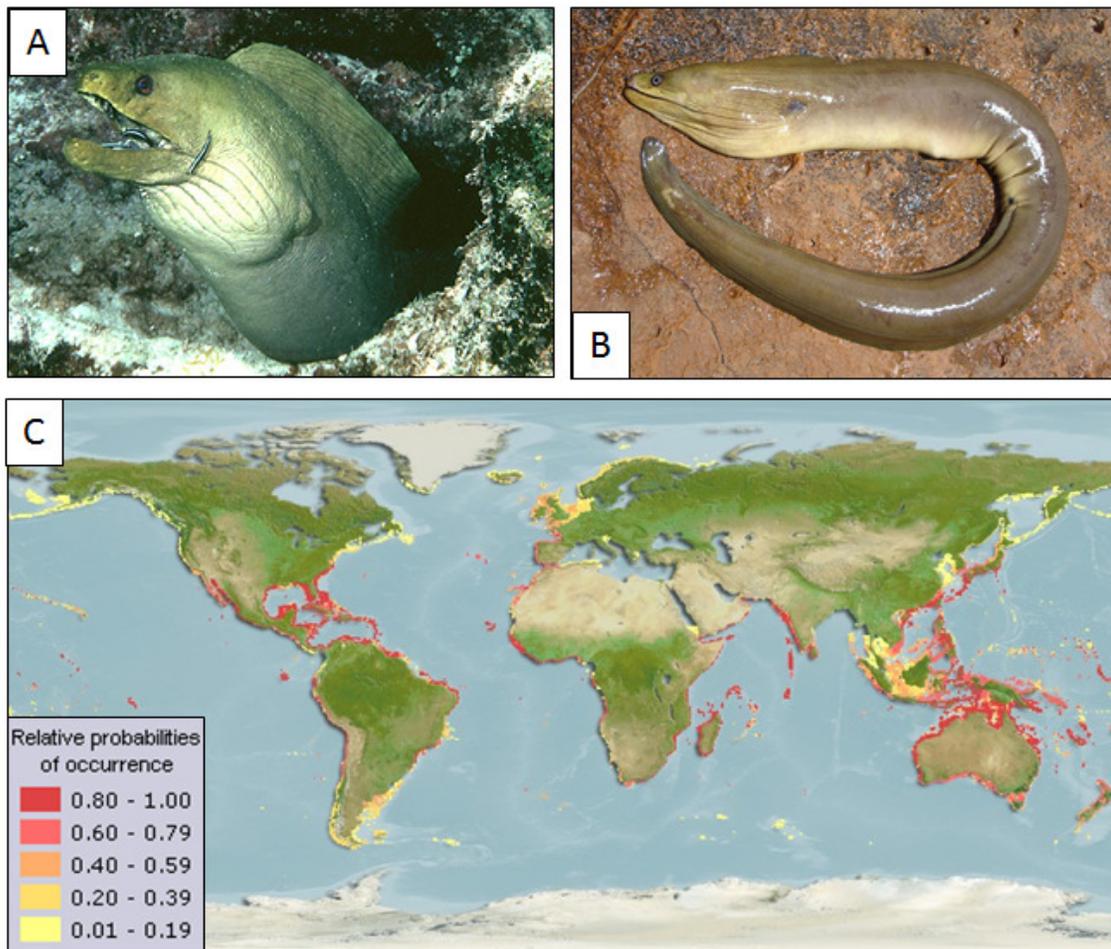


Figura 4 – A e B - Aspecto geral da espécie em estudo, *Gymnothorax funebris*, C – Distribuição geográfica de *G. funebris* (Computer Generated Map for *Gymnothorax funebris* (Green moray). [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org), version of Aug. 2010. Web. Accessed 7 Dec. 2012).

## Importância da citogenética

Os estudos citogenéticos, mais especificamente as análises cariotípicas, bem como suas principais aplicações, tem uma ampla utilização e importância na contribuição dada para o entendimento da evolução e filogenia cromossômica. A partir do conhecimento do cariótipo é possível se realizar uma citotaxonomia segura no caso de espécies crípticas e de um complexo de espécies, bem como:

- ✓ Monitoramento da reprodução de animais de interesse econômico ou silvestres em cativeiro

- ✓ Em relação a animais de importância econômica como bovinos, caprinos e suínos para a produção de alimentos, em virtude dos portadores de alterações cromossômicas, terem a sua fertilidade reduzida pela ocorrência de uma fusão cêntrica entre cromossomos, para se avaliar o impacto do rearranjo na fertilidade de seus portadores.

Atualmente existe a possibilidade de se obter sondas de cromossomos inteiros ou de segmentos específicos e o seu uso em procedimentos de FISH (hidridização *in situ* fluorescente) é, pois, uma grande perspectiva para a citogenética comparativa, pois se tivermos qualquer espécie mesmo pertencendo a grupos filogenéticos distintos e caracterizados por cariótipos muito distintos, podemos ter seus cromossomos comparados de uma forma minuciosa, pois pelas sondas é possível demonstrar rearranjos ocorridos ao nível intracromossômico, muitas vezes evidenciados pelos Bandamentos clássicos.

Os dados cariotípicos das espécies de vertebrados, principalmente os relacionados com técnicas de maior resolução, permitem estabelecer filogenias

cromossômicas cada vez mais consistentes. Isto é importante para se confirmar as relações de parentesco, principalmente de genes mitocondriais e nucleares. Tal prática é muito comum nos dias atuais e tem provocado extensas alterações na taxonomia e sistemática de determinado grupo de vertebrados.

É importante destacar a aplicação das análises cariotípicas para a citotaxonomia. No caso dos vertebrados as espécies não são identificadas por características morfológicas externas, existindo, pois dezenas de exemplos em que os resultados das análises citogenéticas foram decisivos.

As informações citogenéticas podem ser úteis na identificação de possíveis variedades de uma determinada espécie, bem como contribuir para o entendimento de parentesco ente as espécies, bem como no processo de diversificação que possa ocorrer.

Menos de 5% das espécies existentes de Muraenidae foram estudadas citogeneticamente. Entre os Anguilliformes, os Muraenidae mostram altos números cromossômicos e conteúdo de DNA (RONCHETTI, SALVADORI e DEIANA, 1995). Entre os onze gêneros descritos na família Muraenidae somente representantes de três gêneros foram estudados citogeneticamente até agora com um número diplóide variando de  $2n = 36$ , a  $2n = 42$ , sendo o número diplóide de  $2n = 42$  o mais freqüente (KLINKHARAT *et al.*, 1995). O gênero *Gymnothorax* é o mais estudado nesta família com oito espécies citogeneticamente analisadas (VASCONCELOS e MOLINA, 2009).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Böhlke, E. B., McCosker, J. E., Böhlke, J. E., 1989. Family Muraenidae. In: Böhlke, E.B. (Ed.), *Fishes of the Western North Atlantic*. Sears Foundation for Marine Research, New Haven.
- 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* 150, 203-278.
- Böhlke, E. B., Smith, D. G., 2002. Type Catalogue of the Indo-Pacific Muraenidae. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 152, 89-172.
- 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: 272-285.
- Inoue, J. G., Miya M., Tsukamoto, K., Nishida, M. 2004. Mitogenomic evidence for the monophyly of the elopomorph fishes (Teleostei) and the evolutionary origin of the leptocephalous larva. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 274-286.
- Klinkhart M, Tesche M, Greven H. 1995. Database of fish chromosomes. Westarp Wissenschaften, Magdeburg, pp 28-179.
- Mehta, R.S., Wainwright, P.C. 2007. Raptorial jaws in the throat help moray eels swallow large prey. *Nature* 449: 79–82.
- Molina, W. F. 2002. An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science*, 5: 149-152.
- Nelson, J. S. 2006. Order Anguilliformes. In: Nelson JS, editor. *Fishes of the World*. New York: John Wiley and Sons. p 114-124.

- Obermiller, L. E, Pfeiler E. 2003. Phylogenetic relationships of elopomorph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26:202-14.
- Ronchetti, E. S. Salvadori & A.M. Deiana, 1995. Genome size and AT content in Anguilliformes. *Eur. J. Histochem.* 39: 259-264.
- Salvadori, S, A.M. Deiana, E. Coluccia, A. Milia, R. Cannas & A. Cau, 1997. Heterochromatin distribution and structure in *Gymnothorax unicolor* Del. (Anguilliformes, Muraenidae). *Ital. J. Zool.* 64(2): 125-130.
- Salvadori, S, Cau A, Coluccia E, Milia A, Deiana AM. 1994. Karyotype, C-and G-banding and nucleolar organizer regions of *Conger conger* L. (Osteichthyes, Anguilliformes). *Bollettino di Zoologia* 61:59-63.
- Salvadori, S, Coluccia E, Cannas R, Cau A, Deiana AM. 2003. Replication banding in Mediterranean moray eels: Chromosomal characterization and comparison. *Genetica* 119:253-58.
- Salvadori, S, Coluccia E, Cannas R, Cau A, Deiana AM. 2009. A ZZ-ZW sex chromosome system in the finless eel *Dalophis imberbis* (Anguilliformes, Ophichtidae). *Genetica* 135:283-88.
- Salvadori, S, Coluccia, E., Cannas, R., Milia, A. & Deiana, A.M. 2006. Studio del cariotipo di *Gymnothorax tile* Osteichthyes, Anguilliformes. *Biol. Mar. Medit.* 13 (1): 1109-1111.
- Salvadori, S, Deiana AM, Coluccia E, Floridia G, Rossi E, Zuffardi O. 1995. Colocalization of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Research* 3: 54-58.

- Salvadori, S, Deiana, A.M., Coluccia, E. Floridia, G., Rossi, E., Zuffardi, O. 1995. Colonization of (TTAGGG) n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome. Res.* 3: 54-58.
- Smith, D. S. 2012. A checklist of the moray eels of the world (Teleostei: Anguilliformes: Muraenidae). *Zootaxa* 3474: 1-64.
- Tesch, F.W. **The Eel**. 3a Edição. Oxford: Blackwell, 2001.
- Vasconcelos A. J. M. and Molina WF (2009). Cytogenetical studies in five Atlantic Anguilliformes fishes. *Genetics and Molecular Biology* 32(1): 83-90.
- Wang, C. H., Kuo, C. H., Mok, H. K. & Lee, S. C. 2003. Molecular phylogeny of elopomorph fishes inferred from mitochondrial 12S ribosomal RNA sequences. *Zoologica Scripta*. 32: 231-241.

## Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo (1) fazer uma revisão dos aspectos citogenéticos da família Muraenidae e (2) realizar um estudo citogenético da espécie *Gymnothorax funebris*.

Na revisão abordando os aspectos citogenéticos da família Muraenidae, são apresentados os principais trabalhos realizados com membros da família no que diz respeito à determinação de números cromossômicos (somático e fundamental) e cariótipos, bem como as principais técnicas que são utilizadas no estudo citogenético em peixes, com foco na família Muraenidae.

O estudo citogenético de *G. funebris* inclui a determinação do número cromossômico (somático e fundamental) da espécie, bem como a descrição do seu cariótipo por meio de coloração convencional e Bandamento C, e uma análise comparativa com as demais espécies do gênero *Gymnothorax* em um contexto citotaxonômico.

## Capítulo 1

**Revisão sobre os estudos cariológicos em  
Anguiliformes - números cromossômico e  
fundamental, cariótipos e principais técnicas,  
ênfatizando a família Muraenidae**

## 1. Introdução

Os peixes da ordem Anguilliformes encontram destaque na literatura devido à elevada especificidade de suas características cariotípicas quando comparado com outros teleósteos e tem revelado uma única posição no contexto da evolução cromossômica nos peixes (AMORES *et al.*, 1995). A identificação cromossômica é, pois, a principal meta em citogenética de peixes.

Atualmente, dados cromossômicos são disponíveis para seis famílias de peixes da ordem Anguilliformes (*sensu* NELSON, 2006): Anguillidae (4 espécies – spp.), Congridae (5 spp.), Ophichthidae (8 spp.), Synphobranchidae (1 spp.), Muraenesocidae (1 spp.) e Muraenidae (12 spp.) (Tabela 3). A maioria dos dados disponíveis são apenas de registros de números cromossômicos e número fundamental (NF).

Para a família Anguillidae, foi determinado o número cromossômico  $2n = 38$  para quatro espécies do gênero *Anguilla*, com variação no número fundamental (NF) de 58, 60 e 62 (NISSHIKAWA *et al.*, 1971; SOLA *et al.*, 1980, PASSAKAS, 1981) (Tabela 3). Inexistem dados de morfologia cromossômica para os táxons desta família.

Em Congridae, são conhecidos números cromossômicos para quatro gêneros (*Alloconger*, *Anago*, *Astroconger* e *Conger*, onde ocorrem dois números cromossômicos distintos,  $2n = 34$  em *Alloconger* e os demais gêneros com  $2n = 38$ , com NF variando entre 52, 56 e 58 (TAKAI e OJIMA, 1985; TAKAI *et al.*, 1987; PARK e KANG, 1987; OJIMA e VEDA, 1982). Dados cariotípicos são inexistentes neste grupo.

Cinco gêneros da família Ophichthidae tem dados cromossômicos disponíveis: *Ecchellus*, *Myraenichthys*, *Myrichthys*, *Ophysurs* e *Pisodonophis* (Tabela 3). Esta família é o grupo taxonômico que apresenta maior variação quando ao número cromossômico, onde são registrados  $2n = 38$  (SALVADORI *et al.*, 1994; VASCONCELOS e MOLINA, 2009 AMORES *et al.*, 1995; NOGUSA, 1960; MUROFUSHI e YOSHIDA, 1984; NISHIKAWA e SAKAMOTO, 1977; NATARAJAN e SUBRAMANIAN, 1974; KHUDA-BUKHSH e BARAT, 1987) e conseqüentemente vários números fundamentais, no entanto nenhum cariótipo é conhecido (Tabela 3).

Para as famílias Synaphobranchidae e Muraenesocidae, só existe relato de estudos cariotípicos de apenas uma espécie para cada, com  $2n = 26$  (NF=50) para *Synaphobranchus caupi* (Synaphobranchidae) (OJIMA *et al.*, 1985), sendo o menor número cromossômico dentre os Anguiliformes, e  $2n = 38$  (NF = 58) para *Muraenesox cinereus* (Muraenesocidae) (OJIMA *et al.*, 1985).

Das seis famílias circunscritas na ordem Anguiliformes (Nelson 2006) Muraenidae é a família que dispõe de dados cromossômicos (número somático, número fundamental) e de cariótipos determinados dentre os Anguiliformes. É um grupo caracterizado por um número cromossômico altamente uniforme ( $2n = 42$ ), à exceção de *Gymnothorax kidago* com o registro de uma população com  $2n=36$  (Taka e Ojima, 1986). Apesar da constância no número cromossômico somático, o número de braços varia grandemente, com NF = 42, 52, 54, 56, 60, 68, 76 e 84 (Tabela 3). A maioria dos cariótipos determinados para os Anguiliformes foram de espécies de Muraenidae, com destaque para o gênero *Gymnothorax* com oito espécies já estudadas, seguido de *Muraena* com duas espécies e *Echelycore* e *Sideria* com apenas uma espécie.

Esta família é a única que concentra dados sobre cariótipos nos Anguilliformes, com espécies de *Gymnothorax*, duas de *Muraena* e *Echlycore* e apenas uma de *Sideria* (Tabela 3). Dentre estes, o cariótipo mais homogêneo é o de *Sideria picta*, com 42 cromossomos acrocêntricos.

Dentre as espécies de *Gymnothorax*, a estrutura varia significativamente quanto ao número de braços, sendo os cariótipos com predominância de cromossomos metacêntricos (Tabela 3).

O número cromossômico de  $2n = 38$  pode ser considerado o número cromossômico básico dos Anguilliformes pela equivalência aparentemente notável dos cariótipos de duas espécies filogeneticamente distintas como *Astroconger myriaster* e *Anguilla japonica* (PARK e KANG, 1976). Se a fórmula cromossômica ancestral dos teleósteos modernos é considerada como  $2n = 48$  com um braço (OHNO, 1974) então o cariótipo básico dos Anguilliformes tem mais probabilidade envolvendo várias fusões cêntricas dos acrocêntricos primitivos com um avanço de cromossomos grandes com dois braços.

Com a redução do número cromossômico e aumento do número fundamental (FN) tem sido considerado em muitos grupos de peixes como tendência também a um cariótipo simétrico (GOLD, 1979). A partir deste fundamento a família Ophichthidae tem os valores de FN mais elevados, pode ser considerada a mais evoluída cariologicamente dentre os Anguilliformes (THODE *et al.*, 1985).

Tabela 3. Famílias e espécies da ordem Anguilliformes com dados cariotípicos disponíveis na literatura.

<b>Famílias / Espécies</b>	<b>2n</b>	<b>NF</b>	<b>Cariótipo</b>	<b>Referências</b>
<b>ANGUILLIDAE</b>				
<i>Anguilla anguilla</i>	38	62	—	SOLA <i>et al.</i> , 1980
<i>Anguilla australis</i>	38	58	—	SOLA <i>et al.</i> , 1980
<i>Anguilla japonica</i>	38	60	—	NISHIKAWA <i>et al.</i> , 1971
<i>Anguilla rostrata</i>	38	58	—	PASSAKAS, 1981
<b>CONGRIDAE</b>				
<i>Ariosoma anago</i>	38	56	—	TAKAI <i>et al.</i> , 1987
( <i>Anago anago</i> )				
<i>Ariosoma anagooides</i>	34	52	—	TAKAI e OJIMA, 1985
( <i>Alloconger anagooides</i> )				
<i>Conger japonicus</i>	38	58	—	TAKAI e OJIMA, 1985
<i>Conger myriaster</i>	38	58	—	PARK e KANG, 1979
( <i>Astroconger myriaster</i> )				
<i>Conger myriaster</i>	38	56	—	OJIMA e VEDA, 1982
<b>OPHICHTHIDAE</b>				
<i>Echelus myrus</i>	38	58	—	SALVADORI <i>et al.</i> , 1994; AMORES <i>et al.</i> , 1995

<i>Echelus uropterus</i>	50	-	—	NOGUSA, 1960
<i>Myrichthys ocellatus</i>	38	70	—	VASCONCELOS e MOLINA, 2009
<i>Ophichthus altipennis</i> ( <i>Pisodonophis zophitius</i> )	38	68	—	NISHIKAWA e SAKAMOTO, 1977
<i>Ophisurus macrorhynchos</i>	38	76	—	NISHIKAWA e SAKAMOTO, 1977; VASIL'EV, 1980
<i>Ophisurus serpens</i>	38	74	—	THODE <i>et al.</i> , 1985
<i>Pisodonophis boro</i>	40	40	—	NATARAJAN e SUBRAHMANYAM, 1974
<i>Pisodonophis boro</i>	38	64	—	KHUDA-BUKHSH E BARAT, 1987
<i>Scolecenchelys gymnota</i> ( <i>Muraenichthys gymnotus</i> )	48	52	—	MUROFUSHI e YOSIDA, 1984
<b>SYNAPHOBRANCHIDAE</b>				
<i>Synaphobrancus kaupii</i>	26	50	—	OJIMA, 1985
<b>MURAENESOCIDAE</b>				
<i>Muraenesox cinereus</i>	38	54	—	OJIMA, 1985
<b>MURAENIDAE</b>				
<i>Enchelycore nigricans</i>	42	68	6m+8sm+12st+16a	VASCONCELOS E MOLINA, 2009
<i>Enchelycore pardalis</i>	42	52	8m+2sm+32a	TAKAI e OJIMA, 1985

<i>Gymnothorax eurostus</i>	42	54	12m-sm+30a	MANNA, 1989; TAKAI E OJIMA, 1986
<i>Gymnothorax kidako</i>	36, 42	60	16m+18sm+12a	TAKA e OJIMA, 1986 VASIL'EV, 1980 NOGUSA, 1960
<i>Gymnothorax miliaris</i>	42	84	14m+18sm+10st	VASCONCELOS e MOLINA, 2009
<i>Gymnothorax ocellatus</i>	42	76	16m+18sm+8a	PORTO-FORESTI <i>et al.</i> , 2005
<i>Gymnothorax pictus</i>	42	42	42a	RISHI, 1973; OJIMA, 1985 TAKAI E OJIMA, 1985
<i>Gymnothorax reevesii</i>	42	76	—	SHOUBAI <i>et al.</i> , 1991
<i>Gymnothorax unicolor</i>	42	54	12m-sm+30a	DEIANA <i>et al.</i> , 1990
<i>Gymnothorax vicinus</i>	42	56	8m+6sm+28a	VASCONCELOS E MOLINA, 2009
<i>Muraena helena</i>	42	60	18m-sm+24st-a	CAU <i>et al.</i> , 1988
<i>Muraena pavonina</i>	42	52	6m+4sm+32a	VASCONCELOS e MOLINA, 2009

---

O tamanho do genoma (valor-C) varia grandemente (em até 11 vezes) entre os peixes teleósteos, de 0,4 pg a 4,4 pg de DNA. Dentre os Anguiliformes, os menores genomas são observados nas famílias Anguillidae (1,01-1,66 pg) e Congridae (1,21-1,80 pg), de posição basal dentre os Anguiliformes (INOUE *et al.* 2004). A família Muraenidae apresenta os maiores tamanhos de genoma, variando de 1,91pg em *Gymnothorax pictus* ( $2n = 42$ ,  $NF = 42$ , HARDIE e HERBERT, 2003; HARDIE e HERBERT, 2004) até 2,54 pg em *Muraena helena* ( $2n = 42$ ,  $NF = 60$ , RONCHETTI *et al.*, 1995). É possível observar que ocorre um aumento do tamanho do genoma à medida que aumenta o número fundamental, reflexo do aumento do número de braços cromossômicos nos cariótipos.

A seguir são sumarizados os dados de tamanho do genoma em espécies pertencentes à família Muraenidae. Os dados foram obtidos em consulta à base de dados Animal Genome Size Database (acesso em dezembro de 2012).

Tabela 4 - Espécies da família Muraenidae que dispõem de dados sobre o valor-C (tamanho do genoma). 2n: número cromossômico somático.

<b>FAMILIA / Espécies</b>	<b>Valor-C (pg)</b>	<b>2n</b>	<b>Referências</b>
<b>ANGUILLIDAE</b>			
<i>Anguilla anguilla</i>	1.11	-	VENDRELY, VENDRELY (1950).
	1.22	-	PERUZZI <i>et al.</i> (2005)
	1.40	-	VIALLI (1957A).
	1.60	38	HINEGARDNER, ROSEN (1972).
	1.67	-	RONCHETTI <i>et al.</i> (1995).
<i>Anguilla rostrata</i>	1.01	-	HARDIE, (2003, 2004).
	1.40	38	HINEGARDNER (1968); HINEGARDNER, ROSEN (1972).
	1.66	-	RONCHETTI <i>et al.</i> (1995).
<b>CHLOPSIDAE</b>			
<i>Ophichthus cephalozona</i>	1.96	-	HARDIE, HEBERT (2003, 2004)
<b>CONGRIDAE</b>			
<i>Ariosoma anago</i>	1.80	38	OJIMA, YAMAMOTO (1990)
<i>Conger conger</i>	1.66	38	RONCHETTI <i>et al.</i> (1995).
<i>Conger japonicus</i>	1.21	38	OJIMA, YAMAMOTO (1990)
<i>Conger myriaster</i>	1.22	38	OJIMA, YAMAMOTO (1990)
<b>MURAENESOCIDAE</b>			
<i>Muraenesox cinereus</i>	1.13	-	HARDIE, HEBERT (2003, 2004)
<b>MURAENIDAE</b>			
<i>Enchelycore pardalis</i>	2.30	42	OJIMA, Y. AND K. YAMAMOTO (1990).
<i>Gymnothorax moringa</i>	2.40	-	HINEGARDNER, ROSEN (1972).
<i>Gymnothorax nigromarginatus</i>	2.50	-	HINEGARDNER (1968), HINEGARDNER, ROSEN (1972).
<i>Gymnothorax pictus</i>	1.91	-	HARDIE, HEBERT (2003, 2004)
<i>Gymnothorax unicolor</i>	2.20	42	RONCHETTI <i>et al.</i> (1995)
<i>Muraena helena</i>	2.54	42	RONCHETTI <i>et al.</i> (1995)

## **2. Técnicas relacionadas ao estudo dos cromossomos**

Várias técnicas têm sido aplicadas em diversos trabalhos realizados visando o estudo cromossômico de diversos grupos de peixes. Abaixo, algumas destas técnicas são descritas:

**2.1 Estimulação Mitótica** – Para promover a estimulação mitótica, geralmente são aplicados por via intraperitoneal complexos de antígenos mistos (NIKKHO-VAC ® e MUNOLAN ®) na proporção de 1ml para cada 100g de peso corporal do animal.

**2.2 Cultura de células** – Realizada de forma indireta, aplica-se a técnica de cultura de tecidos sólidos a curto tempo descrita por Fenocchio *et al.* (1991)

**2.3 Determinação do número cromossômico somático e do número fundamental (NF) e caracterização dos cariótipos por coloração convencional (Giemsa)**

Nesta técnica, as suspensões celulares são gotejadas sobre uma lâmina com um filme de água aquecida a 60°C. As lâminas são postas para secar e são coradas com Giemsa (5%) por até 25 minutos. As metáfases com melhores condições de espalhamento e contração cromossômica são fotomicrografadas para a confecção dos cariótipos. Após esta etapa o número cromossômico é determinado por contagem direta e o Número Fundamental é estabelecido com base na quantidade de braços cromossômicos. Para determinar os tipos cromossômicos (metacêntrico, submetacêntrico,

acrocêntrico e telocêntrico, segue-se a nomenclatura proposta por Levan (1964).

#### **2.4. Técnicas de diferenciação longitudinal por meio de:**

2.4.1. Bandamento C – permite a localização de blocos heterocromáticos;

2.4.2. Bandamento com fluorocromos (CMA e DAPI) – diferenciar os blocos heterocromáticos ricos em AG e CG;

2.4.3. Bandamento NOR – identificar as regiões organizadoras do nucléolo durante o último ciclo celular;

2.4.4. Bandamento de replicação – permite localizar as áreas de replicação precoce em regiões teloméricas e intercalares.

**Caracterização das regiões heterocromáticas** - A importância da ocorrência de um determinado padrão de heterocromatina constitutiva no cariótipo é ligada às suas características estruturais. A heterocromatina é constituída por DNA fortemente condensado e associada a proteínas estruturais e dividida em heterocromatina facultativa e constitutiva. A heterocromatina constitutiva é caracterizada por DNA satélite altamente repetitivo e de replicação tardia (HSU *et al.*, 1975). E aparece geralmente associada às RONS, os centrômeros e aos telômeros ou então intercaladas em outras regiões cromossômicas. Existem indicações do papel estrutural da heterocromatina constitutiva, possivelmente, na proteção de áreas vitais do genoma e no pareamento dos homólogos durante a meiose provendo meios para a diversidade evolucionária e especiação (VERMA, 1988).

## **Bandamento C**

As bandas C são regiões cromossômicas ricas em DNA altamente compactado, as quais oferecem mais resistência ao forte tratamento alcalino. Os blocos revelados pelo Bandamento C de heterocromatina constitutiva (fração cromossômica rica em DNA satélite e de replicação tardia) mostram que esta fração de cromatina é mais resistente à extração de DNA e permanece como blocos ao final do processo (APPELS *et al.*, 1998).

As mudanças observadas no padrão de Bandamento C podem refletir mudanças nas estratégias evolutivas das espécies, mantendo a taxa de recombinações em situação que favorece a manutenção de um determinado genótipo ou aumentando a recombinação em condições de grande instabilidade ambiental (GUERRA, 1985).

A heterocromatina mede diversas funções da estrutura celular incluindo a função centromérica, silenciamento gênico e a organização nuclear. A estrutura condensada das heterocromatins pseudocentroméricas está associada com a regular disposição de nucleossomos e que em parte pode estar associada com a sequência do DNA repetitivo.

Desde o seu descobrimento por Heitz (1928) a heterocromatina tem sido objeto de discussão como a compensação de dose, coesão de cromátides e manutenção de telômeros, os quais são frações específicas em adição a outros efeitos como: eliminação de DNA (diminuição de cromatina), replicação diferencial e variação por efeito de posição. Além disso, este componente genômico apresenta padrões diferenciais de distribuição característicos em cariótipos, embora possa ocorrer em qualquer posição do cromossomo, além de contribuir para o tamanho do genoma, dada a sua vasta capacidade de

amplificação. A grande variação da porção heterocromática dos genomas dos eucariotos tem sido o fator responsável pelas diferenças no tamanho do genoma (valor-C) entre as espécies (CAVALIER-SMITH, 1985; BRENNER *et al.*, 1993).

Conforme o modelo de Rabl (SCHWEIZER *et al.*, 1987), DNAs repetitivos dentro de uma banda C podem ser transferidos para outros sítios equilocais como consequência de uma específica disposição espacial de telômeros, centrômeros e braços cromossômicos no núcleo interfásico.

Espécies filogeneticamente distintas apresentam poucas sequências de DNA repetitivo em comum, e, conseqüentemente, é necessário ponderar a estringência e a razão DNA bloqueio x sonda.

A heterocromatina é atualmente reconhecida como uma parte importante do genoma dos eucariotos, cujas funções incluem segregação cromossômica, organização nucleolar e regulação da expressão gênica e também pode afetar o processo de recombinação gênica (GREWAL e JIA, 2007; SKIPPER, 2007 e BÜHLER, 2009). Entretanto, evidências mostram que esta região pode ter funções adicionais incluindo a regulação da mitose, progressão do ciclo celular e proliferação das células, assim como pode estar associada com respostas a muitas formas de estresses exógenos, como troca de temperatura, choques térmicos e hipóxia (BURT e TRIVERS, 2006; VARRIALE *et al.*, 2008).

Através do Bandamento C há uma remoção diferencial de DNA na região eucromática após tratamento com ácido, base e solução salina, enquanto que a região mais condensada permanece relativamente intacta e detectável (SUMNER, 1972). Este fato é provavelmente resultado da associação de proteínas com o DNA desta região dificultando o desgaste da

mesma (JACK *et al.*, 1985). Em geral, esta região cromossômica é definida como um segmento o qual se apresenta condensado, com pouca ou nenhuma atividade transcricional, composto de DNA altamente repetitivo que se replica tardiamente na fase S da interfase e manifesta heteropicnose positiva ou negativa se submetida a determinados tratamentos.

Mudanças relacionadas com a quantidade e distribuição de heterocromatina nos cromossomos tem sido relatadas como mecanismo de evolução cariotípica em alguns grupos de peixes (ARTONI *et al.*, 1999; MARGARIDO e GALETTI Jr. 2000). Devido à sua composição a heterocromatina poderia sofrer mais facilmente as alterações, as quais determinariam e favoreceriam rearranjos cromossômicos (WICHMAN *et al.*, 1991) além da presença de blocos poderem alterar a expressão gênica de sequências vizinhas através do efeito de posição (PARDUE e HENNING, 1990).

A técnica da banda C em peixes tem sido o método mais utilizado para estudo das regiões heterocromáticas, constituindo-se numa importante ferramenta na caracterização de populações e/ou indivíduos, detecção de polimorfismos estruturais, diferenciação de cromossomos Bs e cromossomos sexuais (NIRCHIO e OLIVEIRA, 2006).

As informações obtidas sobre distribuição e localização de frações heterocromáticas na qual supõem-se estar concentrada boa parte do DNA satélite, mostrou que as sequências satélites identificadas até o presente momento em peixes, encontram-se localizadas principalmente na região centromérica dos cromossomos, mostrada para outros organismos, devem

empenhar um papel fundamental na estrutura e função do seu centrômero (GALETTI e MARTINS, 2004).

Na ordem dos Anguilliformes, a reprodução do padrão de bandas estruturais (G,R e Q) tem sido demonstrada em algumas espécies, sugerindo diferenças na organização da cromatina dentro da ordem. Em *Anguilla anguilla* pertencentes à família Anguillidae, a compartimentalização composicional do genoma foi demonstrada por BERNARDI e BERNARDI (1990) e o padrão de Bandamento diferenciado ao longo dos braços cromossômicos por meio de fluorocromos base específicos A-T e G-C obtido (MEDEANO *et al.*, 1998; MAYS-KALAT e RAB, 1990).

O padrão de bandas G foi obtido em *A. anguilla*, *A. rostrata* (WIBERG, 1983; SALA, CAMERINI e CATAUDELLA, 1984; VINAS *et al.*, 1994) e na família Congridae em *Conger conger* (SALVADORI *et al.*, 1994).

Na família Muraenidae, os blocos de heterocromatina constitutiva foram observadas nas regiões centroméricas e pericentromérica de alguns cromossomos. Citogeneticamente, somente aproximadamente 7% das espécies da família Muraenidae tem sido estudadas e mais do que somente a morfologia cariotípica e distribuição heterocromática são conhecidas. O número cromossômico conservado, tamanho do genoma e o conteúdo de AT com valores altíssimos entre os Anguilliformes. Os cromossomos apresentam-se numericamente semelhantes e o número diplóide  $2n = 42$  foi relatado para todas as espécies e acompanhado de uma grande variação relacionado com o número fundamental (NF), de 42 a 84. No grupo dos Anguilliformes, acredita-se que as inversões pericêntricas estejam relacionadas com um papel importante na evolução cariotípica. A presença de blocos heterocromáticos centroméricos

estão em quase todas as poucas espécies estudadas, além de bandas grandes em posição pericentromérica e/ou intersticial em algumas espécies.

### **Bandamento NOR**

A coloração das NORs ou RONS (Regiões Organizadoras dos Nucleolos) é feita por intermédio da prata amoniacal, que impregna as proteínas não histônicas associadas a essas regiões. A técnica de impregnação por nitrato de prata é utilizada para caracterização do número e posições de RONS ativas. As regiões organizadoras do nucléolo são sítios onde se localizam os genes para RNA ribossomal (rRNA) os quais estão classificados de acordo com as suas constantes de sedimentação: 5.8S, 18S e 28S (derivados de um mesmo precursor de maior peso molecular denominado RNA 45S) e o 5S que geralmente não se localiza no cromossomo portador do 45S (SUMNER, 1990; WILSON, 1982).

Os genes para RNA ribossômico são compostos por múltiplas cópias em “tandem” intercaladas por espaçadores não transcritos chamados IGS. A região cromossômica ocupada por estes genes pode ser utilizada como marcador útil na comparação entre populações ou na detecção de polimorfismo intra-populacionais, devido sua característica conservadora.

Acredita-se que a técnica AgRON permite apenas a detecção de sítios ativos na interfase precedente (SCHIMID *et al.*, 1987).

O polimorfismo de tamanho de RONS pode ser resultado tanto de duplicações cromossômicas regionais produzidas por “slippage” da DNA polimerase, quanto por “crossing-over” desigual (WARBURTON e HENDERSON, 1979; JANWAR *et al.*, 1981; LUECHINI *et al.*, 1993). Em

adição, a tendência para associação durante a organização nucleolar poderia facilitar translocações desiguais entre as regiões organizadoras de nucléolos (GOODPASTURE e BLOOM, 1975; RUIZ, 1982; SCHIMID *et al.*, 1987). Todos esses processos podem ser facilitados pela redundância gênica das regiões de DNA (VINAS *et al.*, 1996).

Os genes ribossomais são considerados repetitivos por uma série de unidades de transcrição em “tandem” separadas por segmentos espaçadores. Os cromossomos organizadores de nucléolos aparecem nas células em metáfase, pelo fato de eles terem sido envolvidos anteriormente em uma atividade comum de transcrição do RNAr. Em todos os eucariotos ocorre pelo menos um par de RON, daí existir um único organizador nucleolar por lote haplóide.

As regiões responsáveis pela transcrição do RNA 5S não são identificadas pela prata, nem estão nos organizadores nucleolares nem aparecem sob a forma de constrição secundária. Tal região responsável pela transcrição do RNAr 5S é reconhecida pela técnica de hibridização “*in situ*” (FISH).

A impregnação do nitrato de prata pelo uso da técnica Ag-NOR ocorre nas proteínas acídicas que se associam aos RNAr e que são fabricadas pelas sequências de DNAr. A causa das variações nos padrões de Ag-NOR se deve ao fato da atividade gênica diferencial.

Na ordem Anguilliformes, a espécie *Gymnothorax ocellatus* apresentou dois cromossomos com a NOR localizada no par 15 na posição terminal do braço longo, e em outras espécies da mesma ordem analisadas elas mostram ser semelhantes.

Em *Conger conger* (Congridae) a NOR se localiza nos braços pequenos dos pares de cromossomos acrocêntricos, em *Echelus myrus* em um dos pares acrocêntricos grandes, sendo o par de cromossomos com NOR semelhante em tamanho e padrão. A posição da NOR apresenta variações com relação a estrutura cromossômica. Em *Muraema helena* a NOR está localizada no braço curto do par número 7 de cromossomo acrocêntrico e em *Gymnothorax unicolor* perto do centrômero do par 9 correspondendo a um acrocêntrico, indicando fortemente diferenças na composição da NOR, associadas ao DNA heterocromático das duas espécies. Tais diferenças podem ser relatadas pelos rearranjos estruturais (isto é as inversões) envolvendo as NORs.

Dados atuais de NORs em peixes sugerem que cariótipos com um par de NOR simples são mais comuns do que múltiplas, ou seja, distintas em vários cromossomos.

Todas as NORs coradas com prata resultam do ligamento da prata e proteínas não histônicas (SCHWARZACHA, 1978) e representam regiões geneticamente ativas e nem todas as NORs não transcritas impedindo sua localização nas metáfases.

### **Bandamento de replicação**

Os cromossomos de *Conger conger* e *Echelus myrus* (Anguilliformes: Teleósteos) foram analisados convencionalmente pelo Bandamento C e Ag-NOR e pela técnica de Bandamento de replicação. Ambas as espécies tem um número diplóide  $2n = 38$ . O uso deste tipo de Bandamento possibilita a identificação de pares de cromossomos individuais para descobrir diferentes classes de cromatinas e sugerir mecanismos evolutivos nestas duas espécies.

Os resultados confirmaram a superioridade do padrão de replicação, mostrando diferenciações longitudinais em cromossomos de peixes e que não é possível geralmente por bandas estruturais (AMORES *et al.*, 1995). Exemplares das espécies do estudo citado foram capturadas na costa do mar mediterrâneo.

O Bandamento de replicação foi realizado *in vitro* por acréscimo de BrdU (bromodeoxyrudina) em preparações envelhecidas por 2 dias e seguindo a técnica de Geles *et al.*, (1988). Com o bandamento de replicação pela incorporação de BrdU, as bandas apresentaram coloração fraca correspondente à metade tardia da fase S e tais bandas aparecem em áreas centroméricas, pericentroméricas e em algumas áreas intercalares de todos os cromossomos.

As bandas escuras coradas (em regiões não substituídas por BrdU) correspondiam às áreas de replicação precoce e que foram visíveis em áreas teloméricas e intercalares. Em geral, os cromossomos homólogos exibiram semelhante padrão de replicação, contudo, variam o tamanho e a posição em ambos os homólogos das bandas. Tais diferenças tem sido interpretadas como assíncronicas entre as unidades homólogas de replicação (replicons) (SCHEMPP, 1980), como diferenças na condensação dos cromossomos homólogos ou de fatores conectados com a metodologia da técnica (DROUIN *et al.*, 1990). O padrão de replicação para ambas as espécies com o mesmo protocolo do ciclo celular é igual, apesar das duas espécies pertencerem a famílias diferentes e que não existe diferença entre as espécies da Itália e Espanha.

### 3. CONCLUSÃO

Tais experimentos confirmam que  $2n = 38$  é também o número modal para as espécies mais representativas das famílias deste grupo: Anguillidae, Congridae, Ophichtridae e Echelidae, indicando que pode ser considerado com um número cromossômico primitivo da ordem dos Anguilliformes.

Visto que o cariótipo primitivo dos teleósteos parece ser  $2n = 48$ , com todos os cromossomos acrocêntricos, a redução para  $2n = 38$  nos Anguilliformes pode ter envolvido cinco fusões centroméricas apoiadas pelos cinco pares de cromossomos grandes com dois braços presentes em todos os peixes Anguilliformes com  $2n = 38$ , incluindo *Conger conger* e *Echelus myrus*. Apesar da alta conservação do número cromossômico o número fundamental varia de 42 a 76 (SALVADORI *et al.*, 1994). Esta grande variação também está presente em *Conger conger* (FN = 50) e *Echelus myrus* (FN = 58) e mudanças cromossômicas sugerem tal como inversões pericêntricas e/ou paracêntrica durante sua evolução inversões pericêntricas podem justificar a posição centromérica diferente dos quatro grandes cromossomos com dois braços em *Conger conger* e *Echelus myrus*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amores, A. Bejar J, Alvarez MC. 1995. BrdU replication bands in the anguilliform fish *Echelus myrus*. *Chromosome Research* 3: 423-426.
- Amores, A., J. Bejar & M.C. Alvarez, 1995b. Replication, C and Ag-NOR chromosome banding in two Anguilliform fish species. *Mar. Biol.* 123: 845-849.

- Cau, A., S. Salvadori, A.M. Deiana, J.L. Bella & R. Mezzanotte, 1988. The characterization of *Muraena helena* mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions and in situ digestion with restriction endonucleases. *Cytogenet. Cell Genet.* 47: 223-226.
- Deiana AM, Salvadori S, Cau A. 1990. The characterization of mitotic chromosomes of *Gymnotorax unicolor* (Del.) by C-banding and NOR staining (Osteichthyes, Anguilliformes). *Genetica* 81:17-20.
- Drouin, R., Lemieux, N., Richer, C.L. 1990. Analysis of DNA replication during S-phase by means of dynamic chromosome banding at high resolution. *Chromosoma.* 99: 273-280.
- Foresti, F, Almeida-Toledo, L., 1996. Molecular and immunocytogenetics of Brazilian fishes. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* 48(5-6): 377-382.
- Foresti, F., Almeida Toledo, L.F. & Toledo, F. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell Genet.* 31: 137-144.
- Hardie, D.C. and P.D.N. Hebert (2003). The nucleotypic effects of cellular DNA content in cartilaginous and ray-finned fishes. *Genome* 46: 683-706.
- Hardie, D.C. and P.D.N. Hebert (2004). Genome-size evolution in fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61: 1636-1646.
- Hinegardner, R. (1968). Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. *American Naturalist* 102: 517-523.
- Hinegardner, R. and D.E. Rosen (1972). Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *American Naturalist* 106: 621-644.

- Hsu, T.C. & Arrighi, F.E. Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. *Chromosoma*. 34: 243-253. 1971.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52: 201-220.
- Molina, W. F. (2002). An alternative method for mitotic stimulation in fish cytogenetics. *Chromosome Science*, 5: 149-152.
- Murofushi, M., Vosidt T. H.. 1984. Cytogenetical studies on fishes. VIII. XX-Y Sex chromosome mechanism newly found in the snake eel, *Muraenichthys gymnotus* (Anguilliformes, Pisces). *Proc. Jpn. Acad. Sci.* 60: Ser. B. 21-23.
- Nelson, J.S. 2006. Order Anguilliformes. In: Nelson JS, editor. *Fishes of the World*. New York: John Wiley and Sons. p 114-124.
- Nishikawa, S. & Sakamoto, K. 1977. Comparative studies on the chromosomes of three anguilliform fishes. *J. Shimonoseki Coll. Fish.* 25: 193-196.
- Nishikawa, S., Amaoka K, Kawasawa, T. 1971. On the chromosomes of two species of eels. *Chrom. Inform. Serv.* 12: 27-28.
- Nogusa, S. 1960. A comparative study of the chromosomes in fishes with particular considerations on taxonomy and evolution. *Memoirs of the Hyogo University of Agriculture* 3:1-62.
- Ohno, S., Christian L., Romero M., Dofuku R, Ivey C. 1973. On the question of American eels, *Anguilla rostrata* versus European eels, *Anguilla anguilla*. *Experientia* 29: 891.
- Ojima Y., Ueda H. 1982. A karyotypical study of the conger eel. *Proc. Jpn. Acad.* 58, Ser. B: 56-59.

- Ojima, Y. and K. Yamamoto (1990). Cellular DNA contents of fishes determined by flow cytometry. *La Kromosomo II* 57: 1871-1888.
- Ojima, Y. Fish cytogenetics, in Sharma, A.K., Sharma, A. (eds): Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups. Vol. I, pp. 110-145. CRC Press, 1983.
- Passakas, T. 1978. C-bandind pattern in chromosome of the European eel *Anguilla anguilla*. *Folia Biol. (Krakow)*, 26: 301-304.
- Passakas, T. 1981. Comparative studies on the chromosomes of European eel (*Anguilla anguilla* L.) and the American eel (*Anguilla rostrata* Le Sueur). *Folia Biol. (Krakow)*, 29: 41-57.
- Pendás AM, Morán P, Garcia Vázquez E. 1993. Replication banding patterns in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Genome* 36: 440- 444.
- Peruzzi, S., Chatain, B. & Menu, B. (2005). Flow cytometric determination of genome size in European seabass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), thinlip mullet (*Liza ramada*), and European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquatic Living Resources* 18: 77-81
- Porto-Foresti, F., Oliveira, C. & Foresti, F. 2005. First chromosome characterization in the neotropical eel, *Gymnothorax ocellatus* (Pisces, Muraenidae). *Cytologia*. 70 (3): 283-286.
- Rishi, K.K. 1973. A preliminary report on the karyotypes of eighteen marine fishes. *Research Bulletin of the Panjab University* 24:161-62.
- Ronchetti, E., S. Salvadori, and A.M. Deiana (1995). Genome size and AT content in Anguilliformes. *European Journal of Histochemistry* 39: 259-264.

- Salvadori, S., A.M. Deiana, E. Coluccia, A. Milia, R. Cannas & A. Cau, 1997. Heterochromatin distribution and structure in *Gymnothorax unicolor* Del. (Anguilliformes, Muraenidae). *Ital. J. Zool.* 64(2): 125-130.
- Salvadori, S., Cau A, Coluccia E, Milia A, Deiana AM. 1994. Karyotype, C-and G-banding and nucleolar organizer regions of *Conger conger* L. (Osteichthyes, Anguilliformes). *Bollettino di Zoologia* 61:59-63.
- Salvadori, S., Coluccia E, Cannas R, Cau A, Deiana AM. 2003. Replication banding in Mediterranean moray eels: Chromosomal characterization and comparison. *Genetica* 119:253-58.
- Salvadori, S., Coluccia E, Cannas R, Cau A, Deiana AM. 2009. A ZZ-ZW sex chromosome system in the finless eel *Dalophis imberbis* (Anguilliformes, Ophichtidae). *Genetica* 135:283-88.
- Salvadori, S., Coluccia, E., Cannas, R., Milia, A. & Deiana, A.M. 2006. Studio del cariotipo di *Gymnothorax tile* Osteichthyes, Anguilliformes. *Biol. Mar. Medit.* 13 (1): 1109-1111.
- Salvadori, S., Deiana AM, Coluccia E, Florida G, Rossi E, Zuffardi O. 1995. Colocalization of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Research* 3: 54-58.
- Salvadori, S., Deiana, A.M., Coluccia, E. Florida, G., Rossi, E., Zuffardi, O. 1995. Colonization of (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome. Res.* 3: 54-58.
- Schempp, W. 1980. Asynchrony in late replication between homologous autosomes in primary cultures of Chinese hamster fibroblasts. *Chromosoma.* 79: 199-206.

- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*. 58: 307-320.
- Shoubai, R., Tianguo Z, Wenhui Z, Jiedong C. 1991. The karyotype of *Gymnothorax reevesi*. *Tropic Oceanology* 10: 98-101.
- Sola, L., B. Camerini & S. Cataudella, 1984. Cytogenetics of Atlantic eels: C- and G-banding, nucleolus organizer regions and DNA-content. *Cytogenet. Cell Genet.* 38: 206-210.
- Sola, L., Gentili, G. & Cataudella, S. 1980. Eel chromosomes: cytotaxonomical interrelationships and sex chromosomes. *Copeia*. 4: 911-913.
- Takai, A., Kikuno T, Ojima, Y. 1987. Karyotype C-bands and NORs in *Anago anago* (Congridae, Pisces). *Chromosome. Inf. Serv.* 42: 30-32.
- Takai, A., Ojima Y. 1985. Karyotypic studies of five species of Anguilliformes (Pisces), pp. 253-256 in *Proceedings of the Japan Academy*, Vol. 61, Ser. B, No. 6.
- Takai, A., Ojima, Y. 1986. Some features on nucleolus organizer regions in fish chromosomes. In: Uyeno, T., Arai, R., Taniuchi, T., Matsuura, K., editors. *Indo Pacific Fish Biology*. Tokyo: Ichthyological Society of Japan. P. 899-909.
- Thode, G. & Alvarez, M.C. 1983. Comparative analysis of nucleolus organizer regions in six species of *Gobius*. *Abstracts of the 8th International Chromosome Conference*. Lubeck. 6: 1.

- Thode, G., Alvarez, M.C., Giles, V., Garcia, E. 1985. Chromosome complement C-banding and Ag-NOR location in *Ophichthus serpens* (Ophichthidae, Anguilliformes). *Cytobios.* 43: 73-77.
- Vendrely, R. & Vendrely, C. (1950). Sur la teneur absolue en acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire chez quelques espèces d'oiseaux et de poissons. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 230: 788-790.
- Vialli, M. (1957a). Volume et contenu en ADN par noyau. *Experimental Cell Research Suppl.* 4: 284-293.
- Wang, C.H., Kuo, C.H., Mok, H.K. & Lee, S.C. 2003. Molecular phylogeny of elopomorph fishes inferred from mitochondrial 12S ribosomal RNA sequences. *Zoologica Scripta.* 32: 231-241.
- Wiberg, U.H. 1983. Sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Cytogenet. Cell Genet.* 36: 589-598.

## Capítulo 2

### **The chromosomes of *Gymnothorax funebris* and the karyotypical evolution in *Gymnothorax* (Anguiliformes: Muraenidae)**

(Artigo aceito para a publicação no periódico Genetics and  
Molecular Research)

**The chromosomes of *Gymnothorax funebris* (Pisces, Muraenidae) and the karyotypical evolution in *Gymnothorax* (Anguiliformes: Muraenidae)**

Maria Aparecida Oliveira ALVES<sup>1</sup>, José Edvar MONTEIRO-JUNIOR<sup>1</sup>, Carlos Augusto Moreira de OLIVEIRA, Raisia Maria SILVEIRA, Itayguara Ribeiro da COSTA<sup>1,\*</sup> & Rodrigo MAGGIONI<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Biologia, Av. Mister Hull, s/n, Bloco 906, Fortaleza, CE, 60455-760, Brazil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Av. Abolição 3207, Fortaleza, CE, 60165-081, Brazil

\* Corresponding authors:

Current address: Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Biologia, Av. Mister Hull, s/n, Bloco 906, Fortaleza, CE, 60455-760, itayguara@ufc.br

Current address: Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Av. Abolição 3207, Fortaleza, CE, 60165-081, Brazil, maggioni@ufc.br

Running title: *Gymnothorax funebris* chromosomes

## Summary

Cytogenetic studies in *Gymnothorax funebris* revealed a diploid chromosome number  $2n = 42$  (3 pairs metacentric, 2 submetacentrics and 16 acrocentrics, FN = 52). No intraespecific variation was observed. The results obtained are inedit and similar to those previously described for species belonging to Muraenidae family. The conventional karyotype is also inedit and divergent from other species in the genus *Gymnothorax*, where a higher proportion of metacentric chromosomes predominate. The data were presented and discussed in a cytotaxonomical approach within the genus. These results strongly support the current view that chromosomal alterations such as centric fusion and Robertsonian's translocations have an important role in the evolution of this group.

**Key words:** chromosome number, cytotaxonomy, evolution, Anguiliformes.

## Introduction

The Order Anguilliformes is taxonomically complex, including 15 families, 141 genera and 791 species (Nelson, 2006). Chromosome studies among anguilliform fish are limited to a few taxa, with chromosome numbers ranging from  $2n = 26$  to  $2n = 54$  (Vasconcelos and Molina 2009). The order attracts much interest because its karyotypic traits are highly specific among teleosts, and reveal a unique position in the context of fish karyotype evolution (Amores et al., 1995).

The basic chromosome number among Anguilliformes is considered to be  $2n = 38$ , based on the remarkable equivalence between the karyotypes of two phylogenetically distant species, *Astroconger myriaster* e *Anguilla japonica* (Park e Kang, 1976). The ancestral chromosome formula for the modern teleosts is considered to be  $2n = 48$  with one arm (Brum and Galetti 1997), therefore the basic karyotype for Anguilliformes is likely to have suffered various centric fusions between primitive acrocentric chromosomes, resulting in an increased number of large two-armed chromosomes. Chromosome number reductions and fundamental number (FN) increases are considered a trend towards a symmetric karyotype in many fish groups.

Chromosome data are available for 13 Muraenidae species, a small fraction of the family's 197 species (Vasconcelos and Molina, 2009; Smith, 2012). Detailed chromosome morphology data are available for four genera, *Gymnothorax* (eight species), *Muraena* (two species), *Echelycore* (one species) and *Sideria* (one species). The chromosome number reported for all 13 species is  $2n = 42$ , with the exception of *Gymnothorax kidako*, which presents  $2n = 36$  (Takai and Ojima, 1985). However, FN seems to be widely variable, ranging from 42, in *Sideria picta*, where

the whole complement is acrocentric, to 84 in *Gymnothorax miliaris* (Vasconcelos and Molina, 2009).

The genus *Gymnothorax* is likely to be a polyphyletic assemblage and many of its species have been moved to different genera over the time (Smith, 2012). The aim of the present work was to describe the karyotypic parameters of the cosmopolitan species *Gimnothorax funebris* from the Brazillian northeastern coast. In addition to that, karyotype differentiation in the genus *Gimnothorax* is discussed.

## **Material and Methods**

### **Sampling**

Twelve green morays *G. funebris* were captured at Sabiaguaba beach (3°47'00"S, 38°25'37"W), Ceara, Brazil. The fish were collected during the day, at low tide, through free diving. After collection the animals were immediately transported to the laboratory in 20 L aerated tanks, where they were kept in individually until chromosome analysis.

### **Mitotic Stimulation and Cell Culture**

A mixed antigens complex (NIKKHO-VAC ®, 1ml per 100g weight) was used for mitotic stimulation through intraperitoneal injection. Twenty four hours after the mitotic stimulation, a 0.025% colchicine solution (1ml per 100g body weight) was intraperitoneally injected, after which the animals were returned to the tanks for one

hour. The animals were then anesthetized for removal of spleen, liver and blood. The tissues were ground and cultured indirectly, following the solid tissue culture technique adapted from Fenocchio et al. (1991). Details were as follows: (1) a RPMI 1640 medium (Life Technologies) containing penicillin (4 µg/ml), streptomycin (124 µg/ml) and bovine fetal serum (20%) was filtered through a 0.22 µm Millipore membrane; (2) ground tissue was incubated at 29 °C for six to eight hours, followed by centrifugation at 800 rpm; (3) cell pellet was re-suspended in 8 ml hypotonic solution (KCl 0.075 M) and incubated at 37 °C for 40 minutes; (4) cell suspension was pre-fixed with ten drops of a mixture of methanol:acetic acid (3:1), and then centrifuged at 800 rpm, for 10 minutes, at room temperature; (5) the cell pellet was carefully re-suspended in 5 ml methanol:acetic (3:1) acid fixative mixture. The best results were obtained from spleen.

### **Chromosome and fundamental numbers and karyotype description**

Cell suspensions were dropped on a microscope glass slide covered with a 60°C water film, set to dry at room temperature and then stained with pH 6.8 phosphate buffered Giemsa (5%) for 20 to 25 minutes. The metaphases in best conditions of spreading and chromosome contraction were photomicrographed. Diploid chromosome number (2n) and fundamental number were determined through direct count of chromosomes and their arms, respectively. Chromosome types (metacentric, submetacentric, acrocentric and telocentric) were identified following Levan (1964). The constitutive heterochromatin was studied through the C-banding protocol, following Sumner (1972).

The chromosome data for *G. funebris* was compared to available data from other *Gymnothorax* species (Table 1). A karyotypic parameter matrix was built including the somatic chromosome number (2n), the fundamental number and chromosomal formula. This matrix was analyzed through PC-ORD 6.0 (McCune and Mefford, 2011), to produce an UPGMA cluster based on Bray-Curtis similarity index.

[Table 1. Chromosome numbers for *Gymnothorax* species (Muraenidae, Anguilliformes). 2n: diploid chromosome number, FN: fundamental number.]

Species	2n	FN	Karyotype formula	Reference
<i>G. eurostus</i> (C. C. Abbott, 1860)	42	54	12SM/SM + 30A	Manna 1989
<i>G. funebris</i> Ranzani, 1840	42	52	6M + 4SM + 32A	<i>Present work</i>
<i>G. kidako</i> (Temminck & Schlegel, 1846)	36	60	16M + 8SM + 12A	Takai & Ojima 1985
<i>G. miliaris</i> (Kaup, 1856)	42	84	14M + 18SM + 10 ST	Vasconcelos & Molina 2009
<i>G. ocellatus</i> Agassiz, 1831	42	76	16M + 18SM + 8A	Porto-Foresti <i>et al.</i> 2005
<i>G. tile</i> (F. Hamilton, 1822)	42	76	16M + 18SM + 8A	Colluccia <i>et al.</i> 2010
<i>G. unicolor</i> (Delaroche, 1809)	42	54	12M/SM + 30A	Deiana <i>et al.</i> 1990
<i>G. pictus</i> (J. N. Ahl, 1789)	42	42	42A	Rishi 1973
<i>G. vicinus</i> (Castelnau, 1855)	42	56	8M + 6SM + 28A	Vasconcelos & Molina 2009

## Results and Discussion

The chromosome number found in the present work for *G. funebris* was 2n = 42 (Figure 1a). This number agrees with those previously reported for the genus *Gymnothorax*, with the exception of *G. kidako*, that presents 2n = 36 (Takai and Ojima, 1985; Table 1). The chromosome number in *Gymnothorax* is a reduction from

the synapomorphic  $2n = 48$  shown by modern teleosts (Brum and Galetti, 1997; Accioly and Molina, 2008). This reduction is likely a result from chromosomal rearrangements such as centric or in tandem fusion, followed by pericentric inversions (Vasconcelos and Molina, 2009).

[Figure 1. Karyotype of *Gymnothorax funebris* after Giemsa staining (A) and C-banding (B).]

Figura 1A

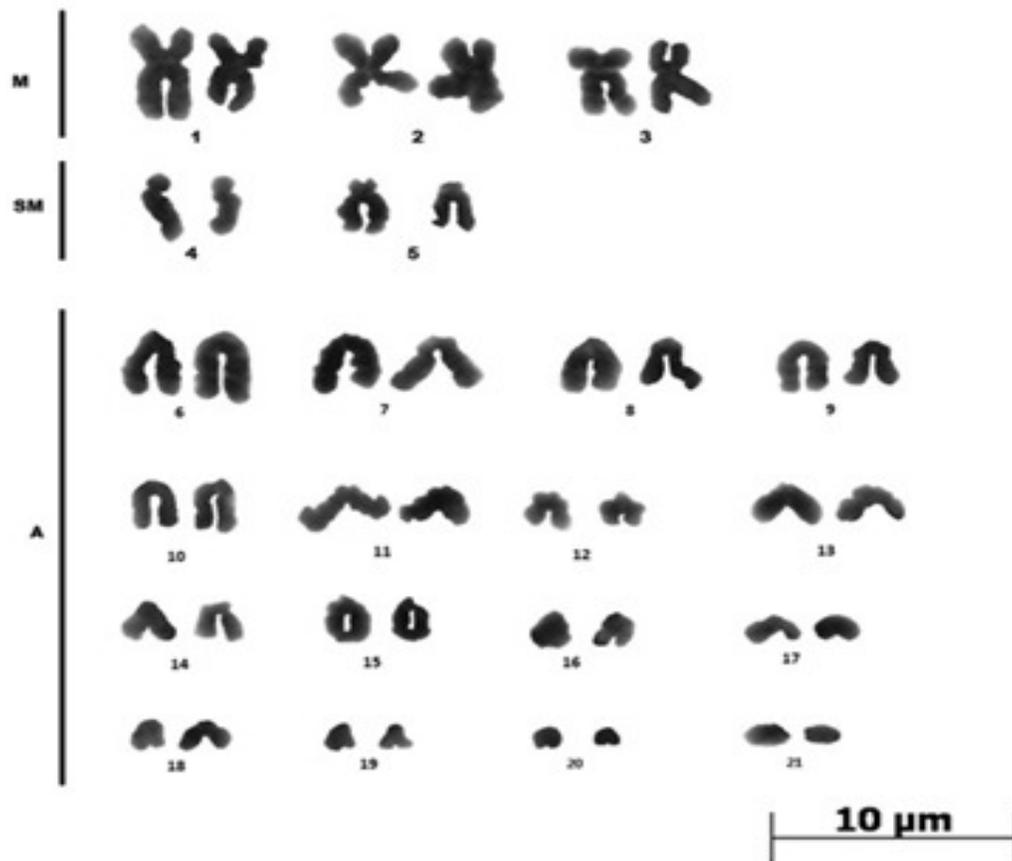
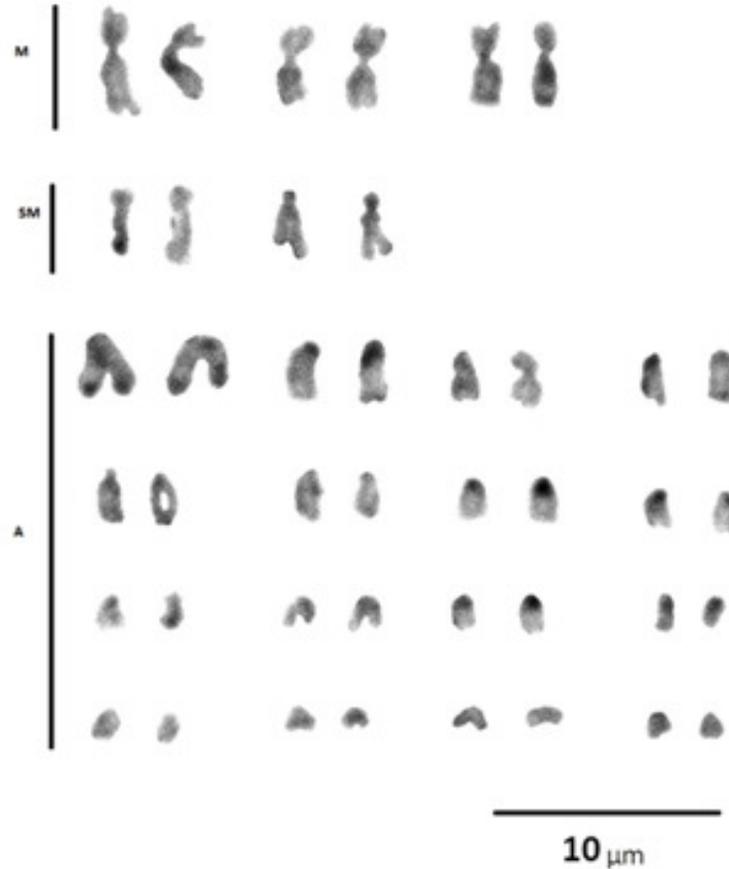


Figura 1B



The *G. funebris* karyotype included 3 pairs of metacentric, 2 pairs of submetacentric and 16 pairs of acrocentric chromosomes. The resulting FN = 52 is among the lowest recorded for the genus (Table 1). The most frequent fundamental number among the genus is 76, shown by *G. ocellatus* (Porto-Foresti et al., 2005) and *G. tile* (Collucia et al., 2010). However, reported values for *Gymnothorax* range from 42 in *G. pictus*, which presents an entirely acrocentric complement (Rishi, 1973), to 84 in *G. miliaris*, where no acrocentric chromosomes were found (Vasconcelos and Molina, 2009). Considering the previously reported chromosome

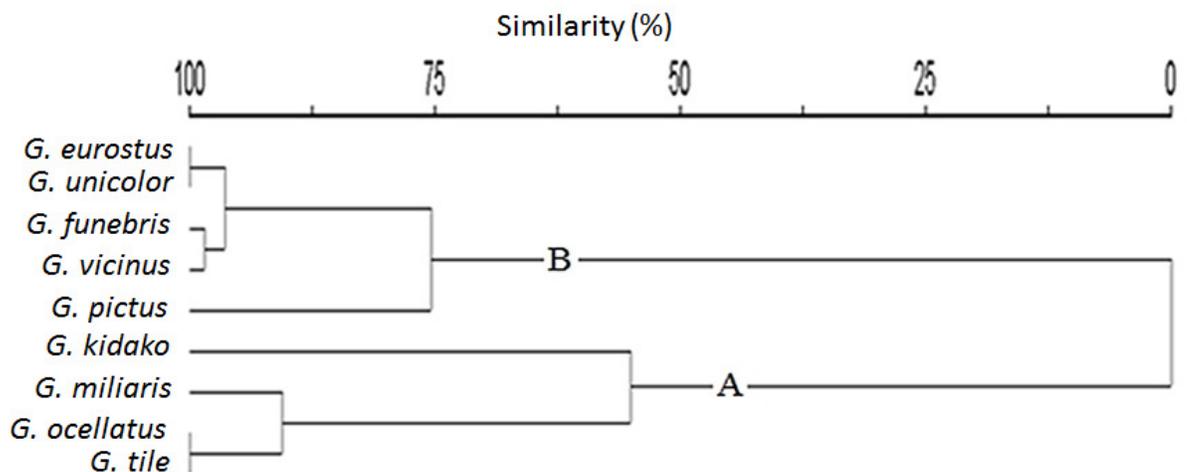
type distributions, *G. funebris* presents a prominently asymmetric karyotype, in contrast to the primarily symmetric karyotype observed for other species within the genus (Table 1). Among the Muraenidae a strong karyotype asymmetry seems to indicate a basal condition (Vasconcelos and Molina, 2009).

The constitutive heterochromatin distribution pattern, revealed by C-banding (Figure 1b), showed large paracentric blocks of heterochromatin in all metacentric and submetacentric chromosomes (1<sup>st</sup> to 5<sup>th</sup> pairs). Among the acrocentric chromosomes (6<sup>th</sup> to 21<sup>st</sup> pairs), the 6<sup>th</sup> pair has shown heterochromatic blocks at the end of both short and long arms, while the remaining pairs presented smaller telomeric bands at the end of the short arms. The observed patterns of longitudinal differentiation are similar to those presented by Muraenidae in general, among which pericentric inversions and chromosomic fusions are likely to play a significant evolutionary role (Vasconcelos and Molina, 2009).

The similarity analysis of nine *Gymnothorax* species based on karyotypic parameters (Figure 2) revealed two distinct groups with similarities above 50 percent. Group A, including *G. kidako*, *G. miliaris*, *G. ocellatus* and *G. tile*, presented higher fundamental numbers, due to a higher proportion of metacentric and submetacentric chromosomes, therefore representing a trend towards symmetry. In group B, which includes *G. eurostus*, *G. unicolor*, *G. funebris* and *G. pictus*, the karyotypes are primarily asymmetric, due to the presence of higher number of acrocentric chromosomes. Within group A, *G. kidako* is the most distant species for its unique chromosome number, while in group B *G. pictus* is set apart because it represents an entirely asymmetric karyotype (Table 1). The fact that the clustering resulting from similarities in karyotype parameters (Figure 2) is in strong disagreement with a recent Muraenidae molecular phylogeny (Reece et al., 2010) seems to support the

pronounced importance of chromosomal rearrangements in speciation within the group.

[Figure 2. Bray-Curtis similarity dendrogram based on a matrix of karyotypical data. [A] indicates the group with predominantly symmetric karyotypes, and [B] indicates the group with asymmetric karyotypes.]



### Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support of Centro de Ciências and Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), from Universidade Federal do Ceará during this work and the Ivan Jefferson by statistical support.

### References

Accioly IV and Molina WF (2008). Cytogenetic studies in Brazilian marine Sciaenidae and Sparidae fishes (Perciformes). *Genetics and Molecular Research* 7(2): 358-370.

- Amores A, Bejar J and Alvarez MC (1995). BrdU replication bands in the anguilliform fish *Echelus myrus*. *Chromosome Research* 3: 423-426.
- Amores A, Bejar J and Alvarez MC (1995). Replication, C and Ag-NOR chromosome banding in two Anguilliform fish species. *Mar. Biol.* 123: 845-849.
- Brum MJI and Galetti Jr PM (1997) Teleostei ground plan karyotype. *J. Comp. Biol.* 2: 91-102.
- Collucia E, Deiana AM, Libertini A and Salvadori S (2010). Cytogenetic characterization of the moray eel *Gymnothorax tile* and chromosomal banding comparison in Muraenidae (Anguilliformes). *Marine Biology Research* 6: 106-111.
- Deiana AM, Salvadori S and Cau A (1990). The characterization of mitotic chromosomes of *Gymnotorax unicolor* (Del.) by C-banding and NOR staining (Osteichthyes, Anguilliformes). *Genetica* 81:17-20.
- Fenocchio AS, Venere PC, Cesar ACG, Dias AL and Bertollo LAC (1991). Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia* 44: 161-166.
- Levan A, Fredga K and Sandberg AA (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.* 52: 201-220.
- Manna GK (1989) Fish cytogenetics related to taxonomy, evolution and monitoring aquatic genotoxic agents. In: Das P and Jingran AG (eds) *Fish Genetics in India. Proceedings of the Symposium on Conservation and Management of Fish Genetic Resources of India*, India, pp 21-46.

- McCune B and Mefford MJ. 2011. PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 6. MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A. Available at [\[http://home.centurytel.net/~mjm/pcordwin.htm\]](http://home.centurytel.net/~mjm/pcordwin.htm) Accessed 28<sup>th</sup> November 2012.
- Nelson JS. 2006. Order Anguilliformes. In: Nelson JS, editor. Fishes of the World. New York: John Wiley and Sons. p 114-124.
- Park EH and Kang YS (1979). Karyological confirmation of conspicuous ZW sex chromosomes in two species of Pacific anguilloid fishes (Anguilliformes, Teleostomi). *Cytogenet. Cell. Genet.* 23: 33-38.
- Porto-Foresti F, Oliveira C and Foresti F (2005). First chromosome characterization in the neotropical eel, *Gymnothorax ocellatus* (Pisces, Muraenidae). *Cytologia* 70: 283-286.
- Reece JS, Bowen BW, Smith DG, Larson A (2010). Molecular phylogenetics of moray eels (Muraenidae) demonstrates multiple origins of a shell-crushing jaw (*Gymnomuraena*, *Echidna*) and multiple colonizations of the Atlantic Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 829–835.
- Rishi KK (1973). A preliminary report on the karyotypes of eighteen marine fishes. *Research Bulletin of the Panjab University* 24:161-62.
- Smith DG (2012). A checklist of the moray eels of the world (Teleostei: Anguilliformes: Muraenidae). *Zootaxa* 3474: 1-64.
- Subrahmanyah K and Ramamoorthi K (1971). A karyotype study in the estuarine worm eel *Moringua linearis* Gray. *Sci. Cult.* 37: 201-202.

Sumner ATA (1972). Simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.* 75: 304-306.

Takai A and Ojima Y (1985). Karyotypic studies of five species of Anguilliformes (Pisces). *Proc. Jap. Acad. Ser. B* 61: 253-256.

Vasconcelos AJM and Molina WF (2009). Cytogenetical studies in five Atlantic Anguilliformes fishes. *Genetics and Molecular Biology* 32(1): 83-90.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Este estudo apresentou uma análise da ordem Anguilliformes, tendo o seu enfoque na caracterização e comparação das espécies do gênero *Gymnothorax* analisadas citogeneticamente.
- ✓ O registro da espécie *Gymnothorax funebris* irá acrescentar mais informações ao gênero junto as demais espécies já analisadas. *G. funebris* apresentou  $2n=42$ , corroborando os dados já relatados para o gênero, onde a ocorrência deste número cromossômico é conservada.
- ✓ Dentro do gênero existe uma variação do NF, sendo mais constante o NF=76. Os extremos vão de 42 (em *G. pictus*) até 84 (*G. miliaris*). Neste estudo foi obtido NF=52.
- ✓ O cariótipo de *Gymnothorax funebris* foi representado por 3 pares de cromossomos metacêntricos, 2 submetacêntricos e 16 acrocêntricos. O cariótipo revelou três grupos de cromossomos: o grupo dos metacêntricos inclui os cromossomos 1, 2 e 3; o grupo de submetacêntricos inclui os cromossomos 4 e 5; e o terceiro grupo com 16 acrocêntricos.
- ✓ Considerando o tipo de distribuição cromossômica *Gymnothorax funebris*, apresentou um cariótipo assimétrico pela proporção de acrocêntricos comparado com as *G. eurostus*, *G. unicolor* e *G. vicinus* que apresentaram cariótipos assimétricos com maior proporção de acrocêntricos em relação aos meta e submetacêntricos. Para outras espécies predominaram cariótipos mais simétricos com *G. kidako*, *G. miliaris* e *G. ocellatus* e a proporção de acrocêntricos varia de 8 a 12 nas referidas espécies.

- ✓ O padrão de distribuição da heterocromática no cariótipo (bandamento C) em *Gymnothorax funebris*, mostrou grandes blocos heterocromáticos paracêntricos nos cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e no primeiro par acrocêntrico mostrou blocos heterocromáticos nas extremidades dos braços longos e curtos, e no restante dos acrocêntricos a presença de bandas teloméricas de menor tamanho na extremidade dos braços curtos. Este padrão de diferenciação longitudinal é semelhante para as demais espécies do gênero.
- ✓ Ainda são necessários estudos cariotípicos adicionais como as técnicas de bandamento NOR, FISH (Hibridização *in situ* fluorescente) e determinação do tamanho do genoma (valor-C) para o refinamento.
- ✓ Os dados aqui obtidos corroboram que as inversões pericêntricas e fusões cromossômicas tenham desempenhado um papel relevante na evolução da família Muraenidae como relatado por outros autores.
- ✓ Os Anguilliformes mostram bandas estruturais cromossomais, sugerindo diferentes níveis da organização da cromatina. Embora a distribuição dos padrões de heterocromatina seja relatada em poucos Anguilliformes a presença de grandes blocos heterocromáticos em posição pericentromérica ou/e em todo o comprimento dos braços curtos de vários cromossomos é observada. Em *G. funebris* os resultados obtidos pelo bandamento C estão de acordo com as informações fornecidas desta família.