CARACTERIZAÇÃO E MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DE DNA REPETITIVO EM AVES

Karine Ferreira Colesel (PROVIC), Dr. Mateus Henrique Santos (Orientador), e-mail: mhsantos@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ DEBIOGEM.

Genética - Genética Animal

Palavras-chave: Aves, rDNA, Citogenética.

Resumo

Com a integração de técnicas moleculares à citogenética clássica, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a citogenética de aves tem apresentado grandes avanços, permitindo a prática de mapeamento físico de sequências de DNA e identificação e caracterização de cromossomos. As sequências repetitivas têm sido amplamente utilizadas como objeto de diferenciação de espécies. Estas podem estar associadas a processos de rearranjos cromossômicos, diferenciação sexual, sendo ainda responsáveis por proporções significativas da organização estrutural e funcional do genoma. Assim, o presente trabalho, apresenta a amplificação dos genes 18S rDNA e 5S rDNA em *Gallus gallus* utilizando *primers* que foram previamente desenvolvidos para os peixes *Leporinus elongatus* (18S rDNA) e *Prochilodus argenteus* (5S rDNA), demonstrando que estas sequências/sondas são altamente conservadas mesmo em grupos biológicos tão distintos e podem ser mapeadas em cromossomos de aves. Estes marcadores podem ser empregados para estudos evolutivos e genômicos comparativos dada esta transferabilidade interespecífica.

Introdução

A classe das Aves engloba aproximadamente 10 mil espécies, sendo reconhecida como o segundo grupo de vertebrados com maior diversidade de espécies (Gill and Donsker 2018). Apesar de apresentarem um grande número de espécies, há defasagem em estudos citogenéticos nesse grupo quando comparado a outros vertebrados, como mamíferos e peixes. Atribui-se esta dificuldade a ocorrência de muitos microcromossomos que dificultam a caracterização cariotípica e a dificuldade de amostragem de espécimes à campo (De Oliveira e Jorge, 2000).

O cariótipo de galo doméstico é considerado um “mapa padrão” para várias aves desde os progressos da citogenética molecular com a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e pintura cromossômica que auxiliou no avanço dos estudos cromossômicos comparativos entre as espécies de Aves. O cariótipo de *Gallus gallus* (2n = 78) é composto de 38 autossomos e um par de cromossomos sexuais (ICGSC, 2004). As fêmeas representam o sexo heterogamético (ZW) e os machos o sexo homogamético (ZZ). Contudo, entre espécies de famílias distintas, o cromossomo W pode variar em tamanho e morfologia. Já o cromossomo Z é conservado em tamanho, mas devido a rearranjos intracromossomais, que são comuns para este cromossomo, a morfologia é bastante variável (OLIVEIRA, 2015).

ISSN 1676-0093

O DNA repetitivo constitui-se de sequências com alta similaridade estrutural, ocorrendo em múltiplas cópias no genoma, que podem estar dispostas em tandem, ou dispersas por todo o genoma (MARTINS, 2010). Estas sequências são frequentemente associadas as variações genéticas entre espécies e até mesmo em indivíduos de uma mesma população. Os DNA repetitivos podem contribuir na organização estrutural e funcional do genoma em geral, como na replicação do DNA, na recombinação e na expressão gênica (KIDWELL, 2002; LIU et al., 2001; BIET; SUN; DUTREIX, 1999).

As famílias gênicas responsáveis pelos genes de RNA ribossômico (rRNA) estão entre as mais estudadas. Estas são constituídas por duas famílias gênicas, denominadas 45S DNA ribossômico (45S rDNA) e 5S rDNA (OLIVEIRA, 2017). Deste modo, formam a estrutura básica das subunidades menor e maior dos ribossomos.

Assim, foi objetivo do presente trabalho investigar a conservação de sequências dos DNA ribossômicos maior e menor entre peixes e aves, de modo que possam ser utilizados como marcadores para a localização cromossômica *in situ* em estudos de evolução cariotípica.

Material e Métodos

Para a extração do DNA, utilizou-se tecido muscular de *Gallus gallus* (fêmea) adotando-se o método de Sambrook e Russel (2001). O DNA genômico foi utilizado para amplificar os genes 5S rDNA (F-5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC3' e R-5'CAGGCT GGT ATG GCC GTA AGC3') (Martins e Galetti 1999) e 18S rDNA (F-5'GTAGTCATATGCTTGTCTC3' e R-5'TCCGCAGGTTCACCTACGGA3') (Hatanaka e Galetti Jr., 2004) descritos previamente em peixes. Os resultados das amplificações foram checados em Gel de agarose 1% utilizando um DNA marcador de referência de 100pb.

A clonagem dos fragmentos foi realizada utilizando o vetor plasmidial PGEM seguindo o protocolo do fabricante (Promega Corporation). Após o DNA plasmidial foi extraído pelo método Engebrecht, 2001. Ao final as amostras foram enviadas para sequenciamento e os resultados obtidos foram confirmados através do Blastn realizado no Banco de dados do NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) para identidade do gene alvo.

Resultados e Discussão

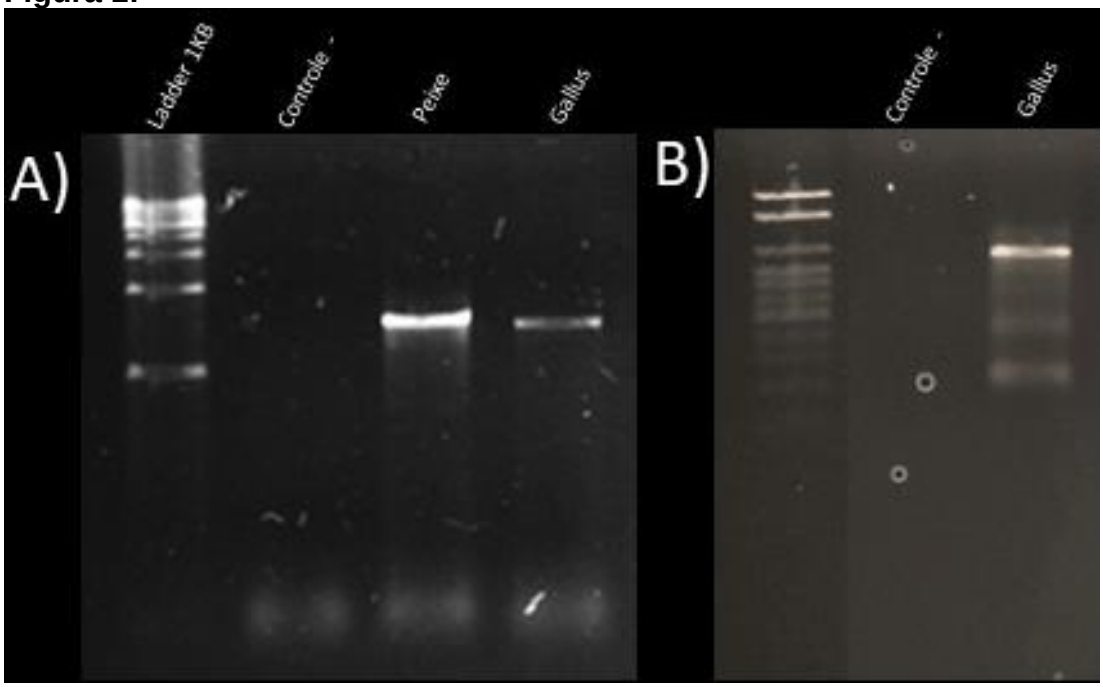
Os testes de PCR com os *primes* de 18S rDNA (F-5'GTAGTCATATGCTTGTCTC3' e R-5'TCCGCAGGTTCACCTACGGA3') e 5S rDNA (F-5'TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC3' e R-5'CAGGCT GGT ATG GCC GTA AGC3') de peixes (Tabela 1) amplificaram as sequências dos genes 18S rDNA e 5S rDNA, utilizando o genoma de *Gallus gallus* como molde. A análise foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 1). É possível observar os 1400 pares de bases (pb) esperados para os genes 18S rDNA e 320 pb para o 5S rDNA.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos:

Locus	*Primer*	Tamanho esperado	TM ºC	Referência
18S rDNA	F- 5' CCGCTTTGGTGACTCTTGAT 3' R- 5' CCGAGGACCTCACTAAACCA 3'	1400 pb	59ºC	Hatanaka e Galetti Júnior (2004)

5S rDNA	F 5' TACGCCCGATCTCGTCCGATC 3' R 5' CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC 3'	320 pb	57ºC a 61 ºC	Martins e Galetti (1999)

Figura 1:



Resultado das amplificações utilizando os *primers* ortológos para os genes 18S rDNA (**A**) e 5S rDNA (**B**) em *Gallus gallus* e *Astyanax scabripinns.*

Posteriormente, os fragmentos amplificados de 18S rDNA foram utilizados para realização de clonagem e sequênciamento nucleotídico. Os resultados dos sequenciamentos foram checados por Blastn no Banco de dados do NCBI para identidade do gene alvo e servirão como sondas para FISH.

Conclusão

O sucesso obtido nas amplificações via PCR dos genes 18S rDNA e 5S rDNA em *Gallus gallus* utilizando *primers* que foram previamente desenvolvidos para a espécie de peixe *Leporinus elongatus* (18S rDNA) e *Prochilodus argenteus* (5S rDNA), demonstram que estas sequências são altamente conservadas entre estas classes de vertebrados. Com isso, o uso destes genes como marcadores citogenéticos podem ser aplicados na técnica de hibridização *in situ* para estudos genômicos comparativos de evolução cariotípica.

Agradecimentos

Agradeço aos professores, colegas e toda a equipe do Laboratório de Genética e Evolução - LabGEv pela orientação e contribuição no desenvolvimento do trabalho. Ao programa de Pós - Graduação em Biologia Evolutiva e à Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG por fornecerem toda estrutura e suporte para realização deste trabalho.

Referências

- BIET, E.; SUN, J.-S.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 2, p. 596-600, 1999.
- DE OLIVEIRA, M. D. V. e W. Jorge (2000) Análise cromossômica em Aves. **Melopsittacus** 3:72-80
- ENGEBRECHT, JoAnne; BRENT, Roger; KADERBHAI, Mustak A. (2001) Minipreps of plasmid DNA. **Current protocols in molecular biology**. doi:10.1002/0471142727.mb0106s15.
- Gill F, Donsker D (eds). **IOC World bird list**. v 8.1. http://www.worldbirdnames. org. 2018. https://doi.org/10.14344/ioc.ml.8.1.
- HATANAKA, Terumi; GALETTI, Pedro Manoel. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish Prochilodus argenteus Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 122, n. 3, p. 239-244, 2004.
- ICGSC - INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM**.** Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v. 432, p. 416-479, 2004.
- KIDWELL, Margaret G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, n. 1, p. 49-63, 2002.
- LIU, Zhanjiang et al. Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 2, p. 317-324, 2001.
- MARTINS, C. et al. Cytogenetic Mapping and Contribution to the Knowledge of Animal Genomes Chromosomes as a Tool for Understanding. In: URBANO, K. V. **Advances in Genetics Research**. [s.l.] Nova Science Publishers, 2010. v. 4p. 1–81.
- MARTINS, Cesar; GALETTI, Pedro M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, n. 5, p. 363-367, 1999.
- OLIVEIRA, Thays Duarte de. **Estudo citogenético de duas subespécies do gênero colaptes, família picidae (aves, piciformes).** 2015.
- OLIVEIRA, Thays Duarte de. **Organização genômica de sequências repetitivas em Pica-paus (aves piciformes).** 2017.
- SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W.; RUSSELL, David W. **Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001.