CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO DNA RIBOSSOMAL 5S E SEU ENVOLVIMENTO NA DIVERSIDADE CARIOTÍPICA DE *Rineloricaria lima* (Actinopterygii: Siluriformes)

Daiane Santana Marcondes (PIBIC/CNPq/UEPG), Viviane Nogaroto (Orientadora), e-mail: vivianenogaroto@hotmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Área: 2.02.00.00-5 Genética; Subárea: 2.02.04.00-0 Genética Animal

Palavras-chave: rDNA 5S, rearranjos cromossômicos, genética animal.

Resumo

Rineloricaria lima pertence à subfamília Loricarinae, a qual se caracteriza por apresentar extensa variação no número diploide (2n), conferindo ampla diversidade cariotípica ao grupo. DNAs repetitivos constituem pontos quentes para quebras e rearranjos cromossômicos, tais como as famílias multigênicas dos DNAs ribossomais (rDNAs). Estudos relatam múltiplos sítios de rDNA 5S em espécies do gênero *Rineloricaria*, evidenciando uma possível correlação entre a dispersão dos sítios de rDNA 5S pelo genoma e a presença de elementos transponíveis (TEs), além de seu envolvimento em quebras cromossômicas. Assim, este trabalho objetivou caracterizar a sequência nucleotídica do rDNA 5S em *R. lima*, visando à contribuição na elucidação da variação cariotípica neste grupo. O DNA genômico dos exemplares foi extraído e usado como molde para a amplificação do rDNA 5S, utilizando-se oligonucleotídeos específicos. O fragmento amplificado foi isolado, clonado em *Escherichia coli* e sequenciado. A sequência de rDNA 5S obtida mostrou identidade com sequências parciais de rDNA 5S de outras espécies de peixes, porém não foi verificada a presença de TEs neste fragmento.

Introdução

Rineloricaria Bleeker, 1862 é o gênero mais especioso da família Loricariidae, a qual é mais numerosa da ordem Siluriformes (ESCHMEYER; FONG, 2016). Dados citogenéticos revelam extensiva variação cromossômica no grupo, decorrente da ampla variação de números diploides (2n = 34 – 96 cromossomos) e inúmeros tipos de rearranjos cromossômicos geradores da diversidade cariotípica, como fissões e fusões cêntricas, aliados a mecanismos de inversão e combinações gaméticas (ARTONI; BERTOLLO, 2001; GIULIANO-CAETANO, 1998; PRIMO et al., 2017; ROSA et al., 2012).

Os DNAs repetitivos são reconhecidos por constituírem pontos quentes para quebras e rearranjos. Os genes ribossomais compreendem duas distintas famílias gênicas, compostas por repetições organizadas em tandem. O rDNA menor (rDNA 5S) é composto pela família gênica que codifica as moléculas de rRNA 5S. Em função da organização destas repetições e da aparente conservação molecular dos sítios ribossomais entre grupos de organismos relacionados, tais sequências representam ferramentas resolutivas em estudos citotaxonômicos e evolutivos.

Symonová et al. (2013) propuseram que em alguns casos os rDNAs são carregados durante o mecanismo de espalhamento dos TEs para aumentar em cópias e como consequência, afetar as taxas de recombinação e propiciar a diferenciação cariotípica entre genomas próximos. Ao analisar várias espécies de *Rineloricaria* da Bacia do Paraná, Primo et al. (2017) relataram a presença de múltiplos sítios de rDNA 5S no gênero, fato que poderia ser atribuído à presença de TEs. Em *R. latirostris*, Glugoski (2017) encontrou o TE *hAT*, entremeado à sequência do rDNA 5S, o que poderia contribuir com a dispersão do rDNA 5S nesta população, levando a eventos de rearranjos cromossômicos. Visto que os peixes da família Loricariidae são conhecidos por apresentar ampla diversidade cariotípica, o estudo molecular do rDNA 5S em *R. lima* poderia contribuir para o entendimento da diversificação cromossômica presente no grupo.

Materiais e Métodos

A extração do DNA genômico (método CTAB, segundo MURRAY; THOMPSON, 1980) foi realizada a partir de porções de fígado de *R. lima*, e foi utilizado como molde em reações de cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*). As reações eram as seguintes: 40 ng DNA molde; 1x tampão de reação; 3,75 mM $MgCl_2$; 0,12 mM dNTPs; 2,5 U *Taq* DNA *Polymerase* (Invitrogen); e H_2O q.s.p. 50 µL. Foram utilizados 50 µM dos oligonucleotídeos sintetizados para as regiões flanqueadoras do rDNA 5S: 5s-F (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5s-R (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (PENDÁS et al., 1994). O termociclador (Eppendorf) foi programado da seguinte maneira: (1x) 94 ºC 5 min; seguidos por 35 ciclos: 94 ºC 1 min, 52 ºC 45 seg, 72 ºC 1 min 30 seg; finalizando (1x) 72 ºC 5 min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e a banda de aproximadamente 600 pb foi isolada (kit "*illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*" - GE Healthcare) e ligada ao plasmídeo pGEM®-t (Promega). Os produtos das ligações foram então transformados por choque térmico em células de *Eschericchia coli* DH5-α $CaCl_2$ competentes. As colônias recombinantes foram selecionadas e sujeitas à mini preparação plasmidial, e então enviadas ao serviço de sequenciamento nucleotídico. As sequências obtidas foram submetidas ao BLAStn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) para análise (ALTSCHUL et al., 1990).

Resultados e Discussão

A eletroforese em gel de agarose evidenciou bandas únicas provenientes da extração de DNA genômico, demonstrando que o DNA extraído se encontrou íntegro (Figura 1A), possibilitando sua utilização nas etapas posteriores. A amplificação do rDNA 5S evidenciou a presença de bandas mais fortes com aproximadamente 600 pb, além de bandas mais fracas com tamanhos distintos (variando de aproximadamente 200 – 1000 pb) (Figura 1B). O rDNA 5S consiste de uma unidade de transcrição de aproximadamente 120 pb, que é separada da seguinte por uma unidade de espaçador não transcrita (NTS) de tamanho variado. Embora a sequência do gene 5S para rRNA seja altamente conservada, mesmo entre espécies diferentes, os NTS são variáveis, tanto em tamanho quanto em sequência, resultado de rearranjos cromossômicos, resultando na amplificação de bandas de diferentes tamanhos (REBORDINOS et al., 2013), como o observado.

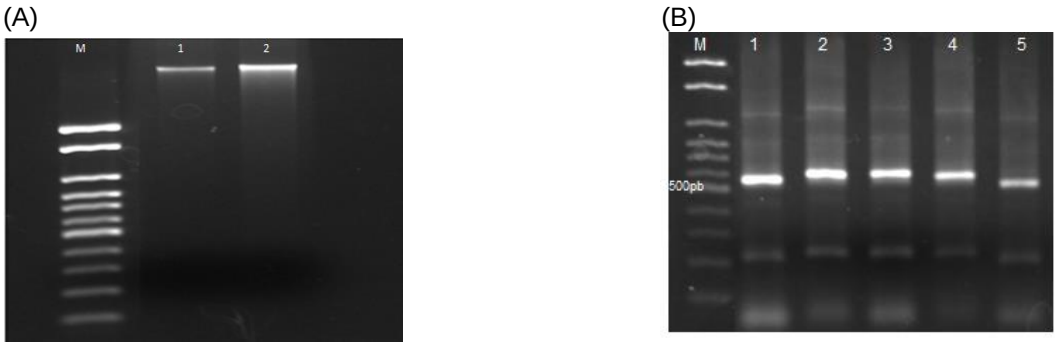


Figura 1 - Géis de agarose 1% evidenciando o padrão de bandas referentes à extração de DNA genômico (A) e produtos de amplificação do rDNA 5S (B). (A) M: marcador de peso molecular; 1e 2: amostras de DNA extraídas de exemplares de *R. lima*. (B) M: marcador de peso molecular; 1, 2, 3, 4 e 5: produtos de amplificação variando de aproximadamente 200 – 1000 pb.

Glugoski (2017) denominou de rDNA 5S verdadeiro um fragmento de ~200 pb e de rDNA 5S degenerado, um fragmento de ~700 pb, correspondente ao portador do TE *hAT* e que estaria envolvido em rearranjos cromossômicos em *R. latirostris*, visto que está presente no ponto de fusão robertsoniano do par cromossômico 3. O rDNA 5S de *R. lima* foi isolado e caracterizado e, os dados do sequenciamento evidenciaram uma sequência nucleotídica de 291 pb (Figura 2), o qual apresentou 91% de identidade com sequências de rDNA 5S de outros peixes, tais como *Carassius auratus* (número acesso KM359666.1) e *Cyprinus carpio* (número acesso KM359675.1). Diferentemente de Glugoski (2017), não foi possível identificar nenhum TE presente na sequência isolada de rDNA 5S a partir de *R. lima*. Podemos inferir, à princípio, que não há a participação de TEs nos sítios de rDNA 5S e eventos de fusões/fissões cromossômicas, comuns neste gênero, na população de *R. lima* estudada. Contudo, mais clones serão sequenciados e analisados para que possamos descartar a participação de TEs em sequências de rDNA 5S e seu papel em rearranjos cromossômicos. Além disso, futuramente este clone isolado será usado como sonda em ensaios de hibridação *in situ* objetivando-se sua localização em cromossomos de *R. lima*.

```
AGTAAATCCCTTAAAATAAAAAAAAGCAAGAATAAATAAATAAATAATTGAAAAAAAAATGG
GGAATCTAAAATTTTAATGACTGCTTTTTAATCTATAAGTAGGCAGTAAACCTCACGCCGAA
ACTCTTCTGCCTGAACCGTTTGGATAGCTACTAATCTTATTCCATCTAAATTGCTAAGCCAG
GCTGGTATGGCCGTAAGCAAAGTTTGCTGGGCAGGTGGGCCTCCTTATACTGCCTCCTGAGC
ACCTTTAAAAATGGTACATTTCAGTTCATTAATTTATTTAGTC
```

Figura 2 - Sequência de 291 pb obtida a partir de amplificação por PCR do rDNA 5S de *R. lima*.

Conclusões

A sequência de rDNA 5S obtida apresentou similaridade com outras sequências de rDNAs 5S de peixes já depositadas em banco de dados, porém não foi evidenciada a presença de TEs no clone analisado.

Agradecimentos

À minha orientadora prof. Dra. Viviane Nogaroto, ao prof. Dr Marcelo Ricardo Vicari, à minha co-orientadora Msc. Larissa Glugoski, ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária.

Referências

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-410, 1990.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L.A.C. Trends in the Karyotype Evolution of Loricariidae Fish (Siluriformes). **Hereditas**, v.134, p.201–210, 2001.

BUENO, V.; VENERE, P. C.; KONERAT, J. T.; ZAWADZKI, C. H.; VICARI, M. R.; MARGARIDO, V. P. Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary tendencies in the genus. **The Scientific World Journal**, 2014. doi. 10.1155/2014/943825

ESCHMEYER, W.N; FONG, J.D. *Species of Fishes by family/subfamily*. http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/Species>By Family.asp>, 2016.

GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico Robertosiano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae)**. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1998.

GLUGOSKI, L. Análise de marcadores cromossômicos em *Rineloricaria* (Siluriformes: Loridariidae) com ênfase na diversidade caritípica. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) – Universidade de Ponta Grossa, Paraná.

MURRAY, G.M.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.

PENDÁS, A. M.; MÓRAN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.67, p. 31-36, 1994.

PRIMO, C.C.; GLUGOSKI, L.; ALMEIDA, M.C.; ZAWADZKI, C.H.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M.R.; NOGAROTO, V. Mechanisms of chromosomal diversification in species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). **Zebrafish**, v. 14, p. 161-168, 2017.

REBORDINOS, L.; CROSS I.; MERLO, A. High Evolutionary Dynamism in 5S rDNA of Fish: State of the Art. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, p. 1-11, 2013.

ROSA, K.O; ZIEMNICZAK, K; BARROS, A.V; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M.C; CESTARI, M.M; ARTONI, R.F; VICARI, M.R. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, n.3, p. 739-749, 2012.

SYMONOVÁ, R.; MAJTÁNOVÁ, S.; SEMBER, A.; STAAKS, G. B. O.; BOHLEN, J.; FREYHOF, J.; TÁBOVÁ, M.; RÁB, P. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BCM Evolutionary Biology**, v. 13, n.42, p. 1-11, 2013.