

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



STENIO EDER VITTORAZZI

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DNA
REPETITIVO DE *Physalaemus cuvieri* e LOCALIZAÇÃO
CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DO GRUPO “cuvieri” DE
Physalaemus (AMPHIBIA, ANURA, LEIUPERIDAE)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Stenio Eder Victorazzi
e aprovada pela Comissão Julgadora.

SM Recco Pimentel

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

Co-Orientadora: Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

V835i

Vittorazzi, Stenio Eder

Isolamento e caracterização de DNA repetitivo de *Physalaemus cuvieri* e localização cromossômica em espécies do grupo "cuvieri" de *Physalaemus* (Amphibia, Anura, Leiuperidae) / Stenio Eder Vittorazzi. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anura. 2. *Physalaemus*. 3. DNA repetitivo. 4. Hibridização *in situ* fluorescente. I. Recco-Pimentel, Shirlei Maria, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Isolation and characterization of repetitive DNA of *Physalaemus cuvieri* and chromosome location in species of the group *cuvieri* of *Physalaemus* (Amphibia, Anura, Leiuperidae).

Palavras-chave em inglês: Anura; *Physalaemus*; Repetitive DNA; Fluorescence *in situ* hybridization.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel, Ana Paula Zampieri da Silva de Pietri, César Martins.


Data da defesa: 19/03/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

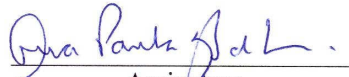
Campinas, 19 de Março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

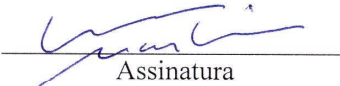
Profa. Dra Shirlei Maria Recco Pimentel (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri


Assinatura

Prof. Dr. Cesar Martins


Assinatura

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior

Assinatura

Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

Assinatura

*Dedico aos meus pais, Jonas e Lourdes, meus
maiores exemplos na vida.*

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, por fornecer as condições necessárias para essa etapa de minha formação.

A todos os professores do Departamento de Biologia Celular e Estrutural que contribuíram na minha formação científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Programa de Excelência Acadêmica – CAPES/PROEX, pela concessão da bolsa de mestrado que foi de enorme valia para minha permanência em Campinas e para o desenvolvimento desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pela participação financeira em parte desse trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Shirlei Maria Recco-Pimentel, por toda sua orientação, dedicação, confiança, respeito, compreensão e principalmente, por batalhar e desejar meu crescimento profissional, assim como pela oportunidade que a mim foi dada em poder trabalhar nessa área da biologia, sem dúvida essas suas características me fazem ver o quanto você é importante na minha vida.

À minha co-orientadora Prof^a. Luciana Bolsoni Lourenço, por toda sua dedicação, ensinamentos, pelo profissionalismo, por compartilhar seu conhecimento e acreditar que “sim, você pode”, me mostrou o quanto eu posso crescer e aprender em um pequeno espaço de tempo.

Aos membros da banca examinadora, Drs. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri, Ana Cristina Prado Veiga-Menoncello, César Martins e Odair Aguiar, pelas críticas e sugestões que contribuíram para melhor qualidade desse trabalho.

Aos colaboradores desse trabalho, Drs. Gilda Vasconcelos de Andrade, Denise de Cerqueira Rossa-Feres, Sérgio Siqueira e Maria Lúcia Del-Grande.

À secretária da Pós Graduação Liliam Panágio, por todos os e-mails lembrando prazos, formulários e documentos.

À Juliana Nascimento, pela sua paciência e companheirismo em adaptarmos as novas técnicas aplicadas nessa pesquisa.

Aos colegas de laboratório, Alessandra, Ana Cristina, Cíntia, Débora, Daniel, Maria e Mateus, pelos momentos de descontração.

Às amigas Gisele O. Introíni e Juliana P. Godoy, pelo companheirismo e cumplicidade, e pelos conselhos que foram muito importantes nos meus momentos de angústia.

Aos meus queridos amigos, Eliane, Fabiane, Glauber, Paulo, Poleana e Rosânia, pela amizade que perdura há anos e que nem pela distância ficamos ausentes um ao outro.

Ao Marco Garcia, por toda a amizade e paciência, guardo seus conselhos que muito me ajudaram a permanecer com a mente sóbria para chegar até o fim desse trabalho.

Aos meus tios Adair e Dolores, pessoas que jamais deixarei de ser grato por todos os momentos da minha vida, pela participação que tiveram nos meus primeiros passos que me guiaram até mais essa etapa do meu aprendizado.

Ao meu irmão Stony, por sempre me apoiar e torcer pelo meu crescimento, e agora por nos dar mais um motivo para sorrir: “bebê a bordo”.

Aos amores da minha vida, meu pai, Jonas, e minha mãe, Lourdes, vocês são meus exemplos de vida, obrigado por entenderem minha ausência, por me incentivarem sempre, devoto minha eterna gratidão por tudo que me ensinaram.

A todos meus sinceros agradecimentos!!!

ÍNDICE

I. Resumo	08
II. Abstract	09
III. Introdução	10
1. DNA satélite	12
1.1. Estudos com DNA satélite na classe Amphibia	15
2. Os DNAs ribossomais em eucariotos	17
3. Relação entre DNA satélite e DNA ribossomal	20
4. Da classe Amphibia e da citogenética do grupo de <i>Physalaemus cuvieri</i>	21
5. Objetivos	23
6. Referências Bibliográficas	23
IV. Artigo I	32
Abstract	33
Introduction	34
Materials and Methods	35
Results	39
Discussion	41
Reference	44
Table	49
Legends and Figures	50
V. Artigo II	53
Resumo	54
Introdução	55
Material e Métodos	57
Resultados	60
Discussão	61
Referências	67
Tabela	72
Legendas e Figuras	72
VI. Conclusões	76

I. RESUMO

O gênero *Physalaemus* é atualmente constituído de 42 espécies, distribuídas em sete grupos. No grupo de *Physalaemus cuvieri*, além dessa, estão alocadas outras oito espécies. Estudos citogenéticos disponíveis até momento para algumas espécies do gênero nos mostram um número diplóide de $2n = 22$, sendo a morfologia cromossômica similar entre elas. O objetivo desse trabalho foi desenvolver novos marcadores citogenéticos para o estudo do grupo de *Physalaemus cuvieri*. Foram estudadas três populações de *P. cuvieri* e duas outras espécies do grupo, *P. albonotatus* e *P. centralis*. Foram isoladas três sequências de DNA repetitivo, as quais foram denominadas PcP190EcoRI, PcP883EcoRI e PcP174PstI. A primeira sequência apresentou similaridade com os DNAr 5S disponíveis no *GenBank* e assim, adicionalmente, foi feito experimento para isolar o DNAr 5S de *P. cuvieri*. Foram obtidos dois fragmentos com cerca 201 e 690pb, localizados por *double-FISH* em cromossomos distintos. A sequência PcP190EcoRI mostrou similaridade de aproximadamente 70% com a região de transcrição de ambos os tipos de DNAr 5S, sugerindo a origem dessa sequência a partir do DNAr 5S. A hibridação *in situ* com sondas das três sequências de DNA repetitivo isoladas, nas três populações de *P. cuvieri*, em *P. albonotatus* e em *P. centralis*, mostrou que todas as regiões cromossômicas marcadas são coincidentes com regiões de banda C detectadas em estudo prévio. No entanto, as populações de *P. cuvieri* e as espécies estudadas diferem entre si pelo número e localização de marcações com sondas das três sequências. Essas sequências representam bons marcadores cromossômicos, já que permitiram demonstrar tanto variações interpopulacionais em *P. cuvieri* como também diferenças interespecíficas, corroborando a sugestão prévia de que as diferentes populações de *P. cuvieri* podem se tratar de um complexo de espécies crípticas.

II. ABSTRACT

The genus *Physalaemus* is currently composed of 42 species, divided into seven groups. Within the *Physalaemus cuvieri* group are eight other species. Cytogenetic studies for some of the species within the genus show a diploid number of $2n = 22$ and similar chromosome morphology. The aim of this research was to develop new cytogenetic markers to study the group of *Physalaemus cuvieri*. We studied three populations of *P. cuvieri* in addition to two other species: *P. albonotatus* and *P. centralis*. We isolated three repetitive DNA sequences, which were named PcP190EcoRI, PcP883EcoRI and PcP174PstI. The former sequence showed similarities with the 5S rDNA available in GenBank and, therefore, an experiment was done to isolate the 5S rDNA of *P. cuvieri*. We obtained two fragments of about 201 bp and 690 bp, which were localized by double-FISH to distinct chromosomes. The PcP190EcoRI sequence showed approximately 70% similarity with the transcription regions of both types of 5S rDNA, suggesting the PcP190EcoRI sequence originated from the 5S rDNA. The three repetitive DNA sequences were detected by *in situ* hybridization to chromosomes from *P. albonotatus*, *P. centralis* and the three populations of *P. cuvieri*. These chromosome regions are coincident with C-bands detected in a previous study. Populations of *P. cuvieri* and others two species, however, differ by the number and location of the three sequences. These sequences seem to be good chromosomes markers since they were used to show interpopulational variation in *P. cuvieri*, as well interspecific differences. This supports the previous suggestion that different populations of *P. cuvieri* may be a complex of cryptic species.

III. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de técnicas moleculares tem revolucionado o conhecimento acerca da complexa estrutura do material genético, originando rapidamente muitos novos conceitos relativos à sequências repetitivas nos genomas eucariotos (Singer, 1982; Watson *et al.*, 2009), que são formados por uma grande quantidade de DNA que vai além do necessário para codificar proteínas (Slamovits e Rossi, 2002). A substancial quantidade de DNA nesses genomas é garantida pela presença de DNA repetitivo, que inclui as sequências altamente repetitivas e as moderadamente repetitivas (Charlesworth *et al.*, 1994). Em todos os DNA repetitivos há peculiaridades que os distinguem, tanto no número de repetições, composição de bases, como também em seus processos dinâmicos que os conduzem à amplificação, homogeneização e fixação no genoma. No entanto, o que há de comum entre eles é o fato de serem os principais constituintes da heterocromatina (Henning, 1999), termo que foi introduzido pela primeira vez por Emil Heitz, em 1928, para definir parte da cromatina que se mantém condensada durante todo o ciclo celular.

A heterocromatina foi dividida posteriormente em dois grupos, facultativa e constitutiva, sendo a facultativa correspondente à eucromatina silenciada, que em alguns tecidos ou estados fisiológicos celulares pode ser transcrita, enquanto a heterocromatina constitutiva ocorre, principalmente, em blocos proximais aos centrômeros e telômeros em ambos os homólogos, e permanece no estado condensado durante todo ciclo celular (ver revisão de Dimitri *et al.*, 2004). A região centromérica é a estrutura cromossômica que desempenha diversas funções, entre as quais uma muito importante é sediar o complexo cinetocórico que associado à cromatina, pela interação com uma variante da histona H3, serve como aparato para os microtúbulos no processo de separação das cromátides irmãs na divisão celular (Bloom, 2007). E como principal constituinte, os centrômeros possuem

sequências de DNA satélite (Clark e Wall, 1996; Izume *et al.*, 2006). Os telômeros estão localizados nas extremidades cromossômicas e garantem estabilidade para que não haja perda de DNA no final da replicação, devido à presença de repetições da sequência TTAGGG, onde atua a enzima telomerase na reposição de DNA. O telômero participa também na organização nuclear do material genético (Dahse *et al.*, 1997; Bass, 2003).

Muito do que se conhece atualmente a respeito da heterocromatina é devido a estudos de cromossomos politênicos de *Drosophila*, pois esses possuem grandes bandas pericentroméricas heterocromáticas e uma baixa taxa de expressão gênica, e, na porção eucromática, proteínas envolvidas no processo de silenciamento gênico, denominadas *poli-combo*, características essas que são comuns em muitos eucariotos (Craig, 2004).

A origem da heterocromatina nos eucariotos ainda é muito discutida, embora se admita estar diretamente relacionada com mecanismos funcionais da DNA polimerase. É o que pode ser visto em estudos *in vitro* com essa enzima, em que foram sintetizados homopolímeros (AT)_n e (CG)_n na presença de substratos e na ausência de um molde inicial, por um processo conhecido como *slippage*, que ocorre naturalmente nos eucariotos. O resultado desse evento origina sequências de bases que se repetem, formando um protossatélite (microsatélite, como é conhecido) e posteriormente essa sequência passa por mecanismos moleculares de mutação, recombinação e rearranjos cromossômicos para sua fixação no genoma (ver revisão de Bashkirov, 2002). A heterocromatina está constantemente num processo de manutenção, que envolve a ocorrência de vários fatores, entre eles a metilação do DNA e de histonas, a replicação tardia do DNA, a atuação de repressores de transcrição, a participação de RNA de interferência (RNAi) e de variantes de histonas (para revisão ver Craig, 2004)

Segundo Eichler e Sankoff (2003), o conhecimento a respeito da natureza e do padrão das sequências repetitivas é a chave para o entendimento da dinâmica dos rearranjos cromossômicos existentes no genoma dos eucariotos. No entanto, a função dessas sequências no genoma ainda permanece bastante obscura, embora se acredite que estejam envolvidas na condensação cromossômica (ver revisão de Shapiro e Sternberg, 2005), no comportamento cromossomal na mitose e meiose (ver revisão de Ugarcovic e Plohl, 2002) e nos processos de evolução cariotípica (Bulazel *et al.*, 2007), entre outras. No entanto, segundo Plohl *et al.* (2008), as funções supracitadas são mais especulativas do que fatos comprovados.

Incluem-se como DNA repetitivo no genoma de eucariotos os DNA satélites, minissatélites e microssatélites, os elementos genéticos móveis, que estão dispersos pelo genoma (Kuhn *et al.*, 1999), e algumas famílias multigênicas como os DNAs ribossomais, os genes das globinas e das histonas. Entre essas sequências repetitivas, as que têm tido maior destaque entre os vertebrados são os DNA satélites, pois se têm direcionado muitos estudos para o entendimento de sua estrutura e organização no genoma (Martins *et al.*, 2006), assim como os DNAs ribossomais, pois são ferramentas muito úteis em estudos de evolução cromossômica.

1. DNA satélite

Segundo Slamovits e Rossi (2002), sequências de DNA satélite estão presentes no genoma de todos eucariotos em um grande número de cópias, e são divididas em três classes distintas, caracterizadas pelo comprimento e pelo número das repetições presentes nessas sequências. Repetições de 1 a 5 pares de bases caracterizam os microssatélites e de até 100 pares de bases, os minissatélites. Em ambas as classes, as repetições ocorrem entre 10 e 100

vezes. Já os satélites possuem sequências que se repetem milhares de vezes no genoma e que variam de centenas a milhares de nucleotídeos.

Embora presentes em praticamente todos os organismos eucariotos, as sequências de DNA satélite não são conservadas, sendo muitas vezes específicas para algumas espécies, sugerindo assim que os DNA satélites originaram-se a partir de diferentes sequências de DNA (Slamovits e Rossi, 2002). No entanto, a mesma sequência também pode estar presente em espécies estreitamente relacionadas (Singer, 1982). Há ainda sequências satélites que são altamente conservadas entre os eucariotos, como é o caso da “dodeca satellite” encontrada desde invertebrados até vertebrados superiores (Abad *et al.*, 1992) e das sequências satélites que sediam as CENP-B nos mamíferos (Phillips e Reed, 1996).

A quantidade de DNA satélite pode variar entre espécies, chegando até 60% em alguns organismos (Rouleux-Bonnin *et al.*, 1996). Em um mesmo organismo podem co-existir diferentes tipos de DNA satélites, mas isso não lhes dá um padrão semelhante em termos evolutivos, pois podem estar em estágios evolucionários diferentes em sua história (Slamovits e Rossi, 2002), como também ter se originado de formas distintas. Um mesmo tipo de DNA satélite pode ser encontrado tanto em cromossomos homólogos como em cromossomos não homólogos (Canapa *et al.*, 2002; Abel *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2006). A explicação para tal fato é que essas sequências repetitivas passam por um processo de recombinação entre cromossomos não-homólogos, o que acarreta a homogeneização de tais sequências no genoma, processo conhecido como evolução em concerto (Dover, 1986).

Diferentes hipóteses tentam explicar a origem das sequências satélites. As principais são *crossing-over* desigual, *slippage* da DNA polimerase, replicação em círculo e substituições de bases (para revisão ver Charlesworth *et al.*, 1994). Uma vez originados, os DNA satélites estão constantemente num processo evolutivo dinâmico que ocorre em nível

molecular e que acarreta mudanças de dois parâmetros, o número de cópias e a sequência nucleotídica. Essas mudanças podem afetar sequências individuais ou conjuntos de sequências e podem levar à origem de perfis de DNA satélite espécie-específicos. Em alguns casos, essas mudanças podem ser correlacionadas com a evolução cromossômica e possivelmente influenciar na evolução das espécies (Ugarovic e Plohl, 2002).

Embora as sequências satélites possuam uma origem contínua, amplificação, eliminação e substituição em suas famílias, os eventos mais comuns associados a elas são as substituições de bases, já deleções e inserções são mais raras (Ugarovic e Plohl, 2002). Essas substituições de bases causam variação intraespecífica na mesma família de DNA satélite. A taxa de variação nucleotídica entre os diferentes monômeros de um determinado DNA satélite varia de um organismo para outro, mas geralmente fica em torno de 15%, embora em casos raros, como o alpha-satélite (presente em Primatas), pode ser de cerca de 30% (ver revisão de Plohl *et al.*, 2008). A taxa de divergência nas famílias de DNA satélite provavelmente é afetada por dois fatores, o ritmo evolucionário e a frequência de eventos de homogeneização (Kato, 2003).

Dentro de alguns satélites existem microrrepetições, as quais corroboram a hipótese de que sequências de DNA satélite possam se originar a partir de uma sequência menor que passou por eventos de duplicações, acúmulo de mutações e posteriormente eventos de homogeneização (Azevedo *et al.*, 2005).

Segundo Acosta *et al.* (2007), a alta variação interespecífica existente nas sequências de DNA satélite, decorrente da baixa pressão seletiva sobre essas regiões genômicas, torna restrita a informação quando se trata de dados filogenéticos. No entanto, deve-se avaliar a presença de sinal filogenético quando essas sequências permanecem mais conservadas, como é o caso encontrado em *Pimelia* (Coleoptera), em que essa análise com

DNAs satélites resultou nos mesmos grupos de organismos inferidos com base em dados de genes mitocondriais (Pons *et al.*, 2002), assim como em *Dolichopoda* (Rhaphidophoridae) (Martinsen *et al.*, 2009), em que os autores concluíram que a taxa evolutiva do satélite pDo500 é ligeiramente lenta, e que a inferência filogenética baseada nessas sequências foi congruente com a mesma análise utilizando genes mitocondriais.

Os DNAs satélites têm sido isolados e caracterizados em diversos grupos animais e vegetais. Sequências relativamente homogêneas dentro de uma espécie, mas com diferenças interespecíficas marcantes, têm sido usadas como interessantes marcadores citogenéticos. Em peixes do gênero *Acipenser*, por exemplo, a presença de diferentes sequências de DNA satélite nos cariótipos de *A. sturio* e *A. oxyrinchus* permitiu diferenciar essas espécies de outras do mesmo gênero, o que está de acordo com informações filogenéticas inferidas com base em genes mitocondriais (Fontana *et al.*, 2008). Outra relevante aplicação da análise de DNAs satélites em estudos citogenéticos refere-se à contribuição desses na caracterização de cromossomos sexuais, como no caso do estudo de aves Palaeognathae (Tsuda *et al.*, 2007) e de peixes do gênero *Leporinus* (Parise-Maltempo *et al.*, 2007).

1.1. Estudos com DNA satélite na classe Amphibia

Estudos de DNA satélite em anfíbios são muito escassos na literatura e seu uso como marcador citogenético é mais raro ainda. Dentre esses, destaca-se o de Barsacchi e Gall (1972), que localizaram sequências repetitivas em cromossomos de *Triturus viridescens* (Urodela), por meio de hibridação *in situ*, nas regiões centroméricas heterocromáticas, tanto em cromossomos somáticos como plumosos. Em recente trabalho, Murakami *et al.* (2007) isolaram sequências de DNA satélite de outro gênero de Urodela, *Cynops*, e puderam reconhecer que algumas sequências estão bem conservadas em regiões pericentroméricas

entre diferentes espécies, enquanto algumas seqüências centroméricas são espécie-específicas.

Dentre os anuros, já foram isoladas seqüências de DNA satélite de *Lithobates catesbeiana* (espécie antes denominada *Rana catesbeiana*) (Wu *et al.*, 1986), de *Discoglossus pictus* (Odierna *et al.*, 1999) e de *Pseudepidalea viridis* (espécie antes denominada *Bufo viridis*) (Odierna *et al.*, 2004). Em *L. catesbeiana* foi isolada uma seqüência denominada DNAsat(TaqI), com aproximadamente 360 pares de bases, distribuída em todos os cromossomos, e que se mostrou presente também no cariótipo de outras quatro espécies de *Rana*, mas ausente no cariótipo de *Xenopus*, *Bombina* e *Acris* (Wu *et al.*, 1986).

O DNA satélite denominado pBv, isolado de *Pseudepidalea viridis*, mostrou-se presente no genoma de diferentes espécies desse gênero e também em *Werneria* e *Wolterstorffina*, consideradas filogeneticamente distantes de *Pseudepidalea*, embora a única informação a respeito da localização cromossômica dessa seqüência esteja restrita a *P. viridis*. Os autores concluíram que esse alto grau de conservação pode ser uma peculiaridade desse grupo de sapos, já que essas espécies apresentam também outras características citogenéticas idênticas entre si, como número e morfologia dos cromossomos, padrão de localização de NORs, de bandas heterocromáticas reveladas pelo bandamento C, padrão de bandas de replicação tardia, e localização de regiões positivas ao DAPI e à CMA₃ (Odierna *et al.*, 2004).

Um estudo populacional com *Rana graeca italica* e *Rana graeca graeca*, utilizando dois satélites denominados S1a e S1b, corroborou a classificação de ambas como táxons distintos, pois se sabe que esses satélites são conservados em um mesmo táxon, mas em

populações referentes às diferentes subespécies eles estão distribuídos e organizados de maneiras distintas (Picariello *et al.*, 2002).

O satélite S1a, supracitado, também foi usado para investigação do modelo de evolução dessas sequências em populações de *Rana temporaria*. Nesse estudo foi verificada uma extensa variação entre as unidades repetitivas e com os resultados foi possível inferir a ocorrência de eventos de amplificação em *rolling circle* (replicação em círculo) e descartar a influência de eventos de *crossing-over* desigual e conversão gênica (Feliciello *et al.*, 2005).

2. Os DNAs ribossomais em eucariotos

Além das sequências repetitivas não codificantes, também existem aquelas que se repetem e são transcritas gerando grande quantidade de RNA. Uma família gênica repetitiva é o DNA ribossomal (DNAr) que está presente no genoma de procariotos e eucariotos e sua função crucial no metabolismo de todos esses organismos está intimamente relacionada à sua conservação evolutiva ao longo de milhares de anos. Nos DNAr estão presentes regiões gênicas codificadoras de moléculas de RNA ribossomal (RNAr) que fazem parte das sub-unidades dos ribossomos, organelas essas que participam da síntese de proteínas em todos seres vivos (Mello, 2007; Alberts *et al.*, 2008).

O DNAr em eucariotos é formado por unidades repetitivas *in tandem*, em que regiões codificadoras estão adjacentes a regiões espaçadoras (não codificadoras). Duas classes de DNA ribossomal podem ser reconhecidas nos eucariotos, uma de DNAr 45S (ou 40S) que compõe as regiões organizadoras de nucléolo (NORs) e outra de DNAr 5S. Na maioria dos eucariotos superiores, a unidade de transcrição do DNAr 45S ou 40S é formada pelos genes 18S, 5,8S e 28S, havendo dois segmentos intercalares transcritos (ITS), um entre o 18S e 5,8S, e outro entre o 5,8S e 28S, e ainda uma sequência externa transcrita

(ETS) que antecede o 18S. Sequências não transcritas separam as unidades repetitivas 45S (ou 40S) e são denominadas espaçadores intergênicos (IGS - *intergenic spacer*). O RNAr 18S após processado faz parte da sub-unidade menor do ribossomo. Já os RNAr 28S e 5,8S farão parte da sub-unidade maior do ribossomo, juntamente com o RNAr 5S, que é transcrito do DNAr 5S (Mello, 2007; Alberts *et al.*, 2008).

Em eucariotos superiores, os genes ribossomais 5S podem ocupar regiões adjacentes às NORs ou não, mas também se organizam de maneira repetitiva *in tandem* e as regiões codificadoras são separadas por espaçadores não transcritos (NTS) (revisões de Long e Dawid, 1980; Kupriyanova, 2000). No entanto, isso não é uma regra geral para eucariotos superiores, pois há relatos da ligação do DNAr 5S na mesma unidade repetitiva dos demais DNAr, como é visto em alguns nematóides e artrópodes. Pode também estar ligado a outras famílias multigênicas, como nos *trans-spliced* de nematóides e nos genes de histonas de crustáceos (Drouin e Sá, 1995). De qualquer maneira, o distanciamento entre os DNAr 45S (ou 40S) do DNAr 5S está relacionado ao fato de que o promotor de transcrição do primeiro é reconhecido pela RNA polimerase I, enquanto o promotor de transcrição do gene 5S, pela RNA polimerase III, implicando assim uma independência transcricional (Drouin e Sá, 1995).

Nos eucariotos, a região gênica codificadora do RNAr 5S possui 120 pares de bases altamente conservadas até mesmo em táxons distantes evolutivamente, já o comprimento das regiões espaçadoras intergênicas não transcritas (NTS) variam consideravelmente entre espécies (Long e Dawid, 1980).

Nos vertebrados, tem sido descrita a existência de DNAr 5S com NTS sob formas variadas, frequentemente duas, de tal forma que o tipo I é menor e possui cerca de 80 pb, sendo esse, aparentemente, o número mínimo de bases para sua organização e atividade

(Martins e Galetti, 2001). Em várias espécies de peixes, essas formas variadas de DNAr 5S foram localizadas em diferentes locos cromossômicos, sintênicos ou não ao DNAr 45S (Martins e Galetti, 2001).

Em anfíbios, há pouca informação disponível na literatura acerca da localização cromossômica dos genes ribossomais 5S. Sítios cromossômicos de DNAr 5S já foram localizados em várias espécies de urodelos do gênero *Triturus* e também em espécies de Salamandra, Salamandrina e Salamandrella (De Lucchini *et al.*, 1993). Schmid *et al.* (1987) e Vitelli *et al.* (1982) localizaram por hibridação *in situ* e detecção radioativa, respectivamente, até 6 locos cromossômicos portadores de DNAr 5S em anuros das Famílias Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae, Pelobatidae e Ranidae. Em algumas espécies há sintenia ao DNAr 45S, já em outras esses locos estão em cromossomos distintos, e também foram detectados sítios de DNAr 5S em diferentes regiões cromossômicas, podendo estar em posições intercalares ou proximal aos telômeros e/ou centrômeros. A localização desses sítios foi importante para propor a origem dos cromossomos maiores por fusão cêntrica entre cromossomos acrocêntricos nas espécies analisadas (Schmid *et al.*, 1987) e, segundo Vitelli *et al.* (1982), nessas espécies, o DNAr 5S possui maior dispersão entre cromossomos não homólogos do que o DNAr 45S.

As regiões cromossômicas portadoras de genes ribossomais 45S (NORs) e 5S têm sido amplamente usadas como marcadores citogenéticos em estudos de diferentes grupos de animais e de plantas, auxiliando na citotaxonomia e permitindo análises evolutivas e comparações filogenéticas, entre outras (Busin *et al.*, 2001; Lourenço *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2007; Lourenço *et al.*, 2008; Cioffi *et al.*, 2009). No entanto, as sequências de DNAr 5S tem sido poucas estudadas em anuros e raramente são utilizadas como marcadores cromossômicos.

3. Relação entre DNA satélite e DNA ribossomal

Pouco é mencionado na literatura sobre a origem de DNAs satélites a partir de famílias multigênicas. No entanto, alguns trabalhos têm dado esse direcionamento, mostrando similaridades de fragmentos de DNAr com sequências repetitivas não transcricionais. Em plantas, esse fato tem sido reportado com mais frequência, como visto em *Vigna radiata* (Unfried *et al.*, 1991), *Phaseolus vulgaris* (Flaquet *et al.*, 1997), *Vicia sativa* (Macas *et al.*, 2003) e *Solanum lycopersicum* (Jo *et al.*, 2009), os quais apresentaram sequências de DNA satélite com grande similaridade com parte dos espaçadores intergênicos (IGS) do DNAr 45S de suas respectivas NORs.

Nos animais também existem relatos de sequências repetitivas independentes dos cístrons de DNAr (encontradas fora dos locos de DNAr) com grande semelhança ao DNA ribossomal. Martins *et al.* (2006), por exemplo, observaram no peixe *Hoplias malabaricus* uma forma variante do DNAr 5S, denominada de 5SHindIII-DNA, caracterizado como um DNA satélite e localizado *in tandem* nas regiões centroméricas de vários cromossomos, sugerindo uma possível função genômica, mas não como uma sequência codificadora.

No anfíbio *Triturus vulgaris*, De Lucchini *et al.* (1997) detectaram uma porção do segmento espaçador intergênico do DNAr 45S em sítios cromossômicos diferentes das NORs e sugeriram que este DNAr extra-ribossomal é sub-produto de mecanismo de recombinação.

Nessas diferentes análises de segmentos homólogos a DNAr encontrados em locos independentes daqueles ocupados pelos genes ribossomais, é possível perceber que essa família multigênica possui habilidade de recombinação em diferentes regiões do genoma, no entanto ainda há muito a se estudar em relação aos mecanismos moleculares comuns a esses eventos de dispersão de sequências ocorridos na evolução do genoma eucariótico.

4. Da classe Amphibia e da citogenética do grupo de *Physalaemus cuvieri*

A classe Amphibia possui atualmente 6.433 espécies descritas, sendo a ordem Anura a maior, contando com 88% dessas espécies, enquanto Caudata possui 9% e Gymnophiona, apenas 3% dessas espécies. Entre as 47 famílias de Anura existentes, encontra-se a família Leiuperidae, composta por sete gêneros, dentre eles o gênero *Physalaemus*, constituído de 42 espécies distribuídas por quase toda extensão do continente sul-americano: norte e centro da Argentina, leste da Bolívia, Paraguai, Uruguai, Brasil, Guianas, planícies do sul da Venezuela, sudeste da Colômbia e oeste do Equador (Frost, 2009).

Nascimento *et al.* (2005), com base em estudos de morfologia externa e osteologia, propuseram sete grupos para o gênero *Physalaemus*: *cuvieri*, com nove espécies; *signifer*, atualmente com onze espécies; *albifrons*, quatro espécies; *deimaticus*, três espécies; *gracilis*, cinco espécies; *henselii*, três espécies; e *olfersii*, quatro espécies. No grupo de *Physalaemus cuvieri*, além dessa, estão alocadas *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cicada*, *P. cuqui*, *P. ephippifer*, *P. erikae*, *P. fischeri* e *P. kroyeri*.

As espécies do grupo de *P. cuvieri* apresentam ampla distribuição geográfica, fazendo com que esse grupo esteja representado do Norte ao Sul da América do Sul a leste dos Andes, ocorrendo da Venezuela à Argentina, em formações abertas do Cerrado, Caatinga, Chacos e em regiões de domínios planos (Nascimento *et al.*, 2005; Frost, 2009).

Os cariótipos de *P. cuvieri* (Beçak *et al.*, 1970; Silva *et al.*, 1999; Quinderé *et al.*, 2009), *P. centralis* (Denaro, 1972; Quinderé, 2007), *P. albonotatus*, *P. ephippifer* e *P. cuqui* (Quinderé, 2007) já foram descritos com base em colorações convencionais com Giemsa, bandamento C e impregnação por prata para detecção de NORs (AgNOR). Informações relativas ao número e à morfologia dos cromossomos do complemento diplóide de *P. cicada* e *P. kroyeri* (De Lucca *et al.*, 1974) também estão disponíveis na literatura. Apenas duas

espécies do grupo de *P. cuvieri*, *P. erikae* e *P. fischeri*, não apresentam nenhuma informação acerca de seu cariótipo.

Comparações entre os cariótipos disponíveis para espécies do grupo de *Physalaemus cuvieri* permitiram identificar grande semelhança em relação à morfologia dos sete primeiros pares cromossômicos. Apenas em *P. albonotatus* parece haver uma diferença na ordenação dos pares 3-5 em relação às demais espécies do grupo. Importantes homeologias são consideradas em relação à distribuição da heterocromatina no genoma de algumas espécies desse grupo, como a banda no par 5, que foi encontrada em todas as espécies do grupo de *P. cuvieri*. Já os pares cromossômicos 8-11 apresentam-se mais variáveis, o que dificulta o reconhecimento de homeologias entre os menores cromossomos desses cariótipos. E justamente nesses menores pares estão localizadas as NORs principais desses cariótipos (Silva *et al.*, 1999; Quinderé, 2007; Quinderé *et al.*, 2009). Dessa forma, os dados disponíveis até momento não permitem o reconhecimento dos possíveis rearranjos responsáveis pelas diferenças interespecíficas em relação aos cromossomos portadores de NORs nas espécies do grupo de *P. cuvieri*.

Mesmo dentre as diferentes populações de *P. cuvieri*, a correta identificação das homeologias dos pares cromossômicos 8-11 mostrou-se difícil em alguns casos, já que grande variação foi notada principalmente em relação aos cromossomos portadores de NOR. Os cariótipos encontrados em espécimes de três populações do nordeste brasileiro, por exemplo, permitiu reuni-los em um grupo, enquanto os cariótipos de outras populações do Brasil e também da Argentina não apresentaram correspondência entre os diferentes pares cromossômicos (Silva *et al.*, 1999; Quinderé *et al.*, 2009). Já o cariótipo encontrado em espécimes de *P. cuvieri* provenientes de Porto Nacional (TO) diferiu de todos os demais

descritos para essa espécie, visto que apresentou NORs nos cromossomos 1, 3, 4, 5 e 10 e várias regiões pericentroméricas reveladas pelo bandamento C (Quinderé *et al.*, 2009).

Embora tenha havido progresso no estudo citogenético das populações de *P. cuvieri* e das demais espécies do grupo realizado até o momento, esses não foram suficientes para esclarecer os mecanismos envolvidos na evolução cromossômica desses anuros. Isso ocorre devido aos poucos caracteres citogenéticos apresentados por esses cariótipos com as técnicas empregadas e também devido à grande variação envolvendo as NORs, o que dificultou o reconhecimento adequado de homeologias cromossômicas.

5. Objetivos

No presente trabalho pretendeu-se isolar e caracterizar sequências de DNA repetitivo de *Physalaemus cuvieri*, visando o desenvolvimento de novos marcadores citogenéticos para o estudo de populações dessa espécie e para comparação com outras duas espécies do grupo “cuvieri” de *Physalaemus*, *P. albonotatus* e *P. centralis*. Adicionalmente, foi isolado o DNA ribossomal 5S para uma melhor compreensão da dinâmica evolutiva dessa família multigênica relacionada à origem de DNA satélites.

6. Referências bibliográficas

ABAD, J.P., CARMENA, M., BAARS, S., SAUNDERST, R.D.C., GLOVERT, D.M., LUDENAS, P., SENTIS, C., TYLER-SMITH, C. & VILLASANTE. A. Dodeca satellite: a conserved G+C-rich satellite from the centromeric heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4663-4667, 1992.

- ABEL, L.D.S., MANTOVANI, M. & MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genet. Mol. Biol.*, 29: 448-452, 2006.
- ACOSTA, M.J., MARCHAL, J.A. & MARTINEZ, S. Characterization of the satellite DNA Msat-160 from the species *Chionomys nivalis* (Rodentia, Arvicolinae). *Genetica*, 130: 43-51, 2007.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., WALTER, P., LEWIS J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 5 ed, 2008.
- AZEVEDO, M.F.C., OLIVEIRA, C., MARTINS, C., WASKO, A.P. & FORESTI, F. Isolation and characterization of a satellite DNA family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). *Genetica*, 125: 205-210, 2005.
- BARSACCHI, G & GALL, J. Chromosomal localization of repetitive DNA in the newt *Triturus*. *J. Cell Biol.*, 54: 580-591, 1972.
- BASHKIROV, V.N. The origin of heterochromatin in eukaryotes. *Rus. J. Gen.*, 38: 656-658, 2002.
- BASS, H.W. The conservation and divergence of telomeric structures, effects, and functions. *Cel. Mol. Life Sci.*, 11: 2281-2284, 2003.
- BEÇAK, M.L., DENARO, L. & BEÇAK, W. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics*, 9: 225-238, 1970.
- BLOOM, K. Centromere dynamics. *Curr. Op. Genet. Dev.*, 17: 151-156, 2007.

- BULAZEL, K.V., FERRERI, G.C., ELDRIDGE, M.D.B. & O'NEILL, R.J. Species-specific shifts in centromere sequence composition are coincident with breakpoint reuse in karyotypically divergent lineages. *Genet. Biol.*, 8. (8): 170, 2007.
- BUSIN, C.S., VINCIPROVA, G. & RECCO-PIMENTEL, S.M. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica*, 110: 131-141, 2001.
- CANAPA, A., CERIONI, N.P., BARUCCA, M., OLMO, E. & CAPUTO, V. A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chrom. Res.*, 10: 297-304, 2002.
- CHARLESWORTH, B., SNIEGOWSKI P. & STEPHAN W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220, 1994.
- CIOFFI, M.B., MARTINS, C. & BERTOLLO, L.A.C. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genet.* (on line), 10: 1-29, 2009.
- CLARK, M.S. & WALL, W.J. *Chromosomes: the complex code*. Chapman & Hall. London. 1 ed., 345p. 1996.
- CRAIG, J. Heterochromatin – many flavours, common themes. *BioEssays*, 27: 17-28, 2004.
- DAHSE, R., FIEDLER, W. & ERNST, G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin. Chem.*, 45: 708-714, 1997.
- DE LUCCA, E.J., JIM, J. & FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. *Caryologia*, 27: 183-191, 1974.
- DENARO, L. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. *J. Herpetol.*, 6: 71-74, 1972.

- DIMITRI, P., NICOLETTA, C., ROSSI, F. & VERNI, F. The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays*, 27 (1): 29-41, 2004.
- DOVER, G.A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet.*, 2: 159-165, 1986.
- DROUIN, G. & SÁ, M.N. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeats units of others multigenes families. *Mol. Biol. Evol.*, 12(3): 481-493, 1995.
- EICHLER, E.E. & SANKOFF, D. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science*, 301: 793-797, 2003.
- FELICIELLO, I., PICARIELLO, O. & CHINALI, G. The first characterisation of the overall variability of repetitive units in a species reveals unexpected features of satellite DNA. *Gene*, 349: 153-164, 2005.
- FERREIRA, I.A., BERTOLLO, L.A.C. & MARTINS, C. Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHindIII repetitive sequences in Erythrinidae fish (Characiformes) with emphasis on *Hoplias malabaricus* species complex. *Cytogen. Gen. Res.*, 118: 78-83, 2007.
- FLAQUET, J., CREUSOT, F. & DRONE, M. Molecular analysis of *Phaseolus vulgaris* rDNA units and characterization of a satellite DNA homologous to IGS repeats. *Plant Physiol. Biochem.*, 35: 611-622, 1997.
- FONTANA, F., LANFREDI, M., KIRSCHBAUM, F., GARRIDO-RAMOS, M.A., ROBLES, F., FORLANI, A. & CONGIU, L. Comparison of karyotypes of *Acipenser oxyrinchus* and *A. sturio* by chromosome banding and fluorescent *in situ* hybridization. *Genetica*, 132: 281-286, 2008.

- FROST, DARREL R. 2009. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 5.3 (12 February, 2009). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History, New York, USA>.
- HENNING, W. Heterochromatin. *Chromosoma*, 108: 1-9, 1999.
- IZUME, K., ITO, M., UETSUKI, T., FUJINO, A. & KATO, M. Mode of evolution of the satellite DNA from the bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Nuc. Ac. Symp. Ser.*, 50: 285-286, 2006.
- JO, S., KOO, D., KIM, J.F., HUR, C., LEE, S., YANG, T., KWON, S. & CHOI, D. Evolution of ribosomal DNA-derived satellite repeat in tomato genome. *BMC Plant Biol.* (on line), 9: 1-14, 2009.
- KATO, M. Evaluation of intra- and interspecific divergence of satellite DNA sequences by nucleotide frequency calculation and pairwise sequence comparison. *Biol. Proc.*, online, 5: 63-68, 2003.
- KUHN, G.C.S., BOLLGONN, S., SPERLICH, D. & BACHMANN, L. Characterization of a species-specific satellite DNA of *Drosophila buzzatii*. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 37: 109-112, 1999.
- KUPRIYANOVA, N.S. Conservation and variation of ribosomal DNA in eukaryotes. *Mol. Biol.*, 5: 637-647, 2000.
- LONG, E.O. & DAWID, I.B. Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 727-64, 1980.
- LOURENÇO, L.B., BACCI-JR, M.B., MARTINS, V.G., RECCO-PIMENTEL, S.M. & HADDAD, C.F.B. Molecular phylogeny and karyotypic differentiation in

Paratelmatobius and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica*, 132: 255-266, 2008.

LOURENÇO, L.B., GARCIA, P.C. & RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetics of a new species of the *Paratelmatobius cardosoi* group (Anura, Leptodactylidae) with the description of an apparent case of pericentric inversion. *Amphibia-Reptilia*, 24: 47-55, 2003.

DE LUCCHINI, S.D., ANDRONICO, F. & NARDI, I. Molecular structure of the rDNA intergenic spacer (IGS) in *Triturus*: implications for the hypervariability of rDNA loci. *Chromosoma*, 106: 315-326, 1997.

MACAS, J., NAVRATILOVA, A. & MESZAROS, T. Sequences subfamilies of satellites repeats related to rDNA intergenic spacer are differentially amplified on *Vicia sativa* chromosomes. *Chromosoma*, 112: 152-158, 2003.

MARTINS, C., FERREIRA, I.A., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. & GALETTI, P.M.G. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*, 127: 133-141, 2006.

MARTINS, C. & GALETTI-JR, P.M. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*, 111: 439-446, 2001.

MARTINSEN, L., VENANZETTI, F., JOHNSEN, A., SBORDONI, V. & BACHMANN, L. Molecular evolution of the pDo500 satellite DNA family in Dolichopoda cave crickets (Rhaphidophoridae). *BMC Evol. Biol.*, 9: 301, 2009.

MELLO, M.L.S. Nucléolo. In: CARVALHO, H.F. & RECCO-PIMENTEL, S.M. *A Célula*. Manole, 2 ed., cap 8, p. 144-154, 2007.

- MURAKAMI, T., MAKI, N., NISHIDA-UMEHARA, C., MATSUDA, Y. & AGATA, K. Establishment of high-resolution FISH mapping system and its application for molecular cytogenetic characterization of chromosomes in newt, *Cynops pyrrhogaster* (Urodela, Amphibia). *Chrom. Res.*, 15: 471-478, 2007.
- NASCIMENTO, B.N., CARAMASHI, U. & CRUZ, C.A.G. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-De-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq. Museu Nac. do Rio de Janeiro*, 63: 297-320, 2005.
- ODIERNA, G., APREA, G., CAPRIGLIONE, T., CASTELLANO, S. & BALLETTTO, E. Evidence for chromosome *Pst I* satellite DNA family evolutionary stasis in the *Bufo viridis* group (Amphibia, Anura). *Chrom. Res.*, 12: 671-681, 2004.
- ODIERNA, G., APREA, G. & CAPRIGLIONE, T. Chromosomal and molecular analysis of some repeated families in *Discoglossus* Otth, 1837 (Anura, Discoglossidae): taxonomic and phylogenetic implications. *Ital. J. Zool.*, 66: 275-283, 1999.
- PARISE-MALTEMPI, P.P., MARTINS, C., OLIVEIRA, C. & FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogen. Gen. Res.*, 116: 218-223, 2007.
- PHILLIPS, R.B. & REED, K.M. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140: 197-216, 1996.
- PICARIELLO, O., FELICIELLO, I., BELLINELLO, R. & CHINALI, G. S1 satellite as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. *Genome*, 45: 63-70, 2002.

- PLOHL, M., LUCHETTI, A., MESTROVIC, N. & MANTOVANI, B. Satellites DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene*, 409: 72-82, 2008.
- PONS, J., PITITPIERRE, E. & JUAN, C. Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Mol. Biol. Evol.*, 19(8):1329–1340, 2002.
- QUINDERÉ, Y.R.S.D. Citogenética de populações e espécies de *Physalaemus* do grupo “cuvieri” (Anura, Leiperidae). Tese (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- QUINDERÉ, Y.R.S.D., LOURENÇO, L.B., ANDRADE, G.V., TOMATIS, C., BALDO, D. & RECCO-PIMENTEL, S.M. Additional cytogenetics analyses of the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on NOR variability. *Biol. Res.*, 42: 79-92, 2009.
- ROULEUX-BONNIN, F., RENAULT, S., BIGOT, Y & PERIQUET, G. Transcription of four satellite DNA subfamilies in *Diprion pini* (Hymenoptera, Symphyta, Diprionidae). *Eur. J. Biochem*, 238: 752-759, 1996.
- SCHMID, M., VITELLI, L. & BATISTONI, R. Chromosome banding in amphibia. XI: Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoclossidae and Pelobatidae. *Chromosoma*, 95: 271-284, 1987.
- SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F.B. & KASAHARA, S. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. *Hereditas*, 131: 135-141, 1999.
- SINGER, M.F. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.*, 76: 67-112, 1982.

- SHAPIRO, J.A. & STESNBERG, R. Why repetitive DNA is essential to genome function? Biol. Rev., 80: 227-250, 2005.
- SLAMOVITS, H.C. & ROSSI, M.S. Satellite DNA: agent of chromosomal evolution in mammals. Mastozool. Neotrop., 9: 297-308, 2002.
- TSUDA, Y., NISHIDA-UMEHARA, C., ISHIJIMA, J., YAMADA, K. & MATSUDA, Y. Comparison of the Z and W sex chromosomal architectures in elegant crested tinamou (*Eudromia elegans*) and ostrich (*Struthio camelus*) and the process of sex chromosome differentiation in palaeognathous birds. Chromosoma, 116: 159–173, 2007.
- UGARKOVIC, D. & PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles – causes and effects. EMBO J., 21: 5955-5959, 2002.
- UNFRIED, K., SCHIEBEL, K. & HEMLEBEN, V. Subrepeats of rDNA intergenic spacer present as prominent independent satellite DNA in *Vigna radiate* but not in *Vigna angularis*. Gene, 99: 63-68, 1991.
- VITELLI, L., BATISTONI, R., ANDRONICO, F., NARDI, I. & BARSACCHI-PILONE, G. Chromosomal localization of 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary diverse amphibians. Chromosoma, 84: 475-491, 1982.
- WATSON, J.D., MYERS R.M., CAUDY, A.A. & WITKOWSKI, J.A. DNA Recombinante: Genes e Genoma. Artmed: 3^a ed., 2009.
- WU, Z., MURPHY, C. & GALL, J.G. A transcribed satellite DNA from the bullfrog *Rana catesbeiana*. Chromosoma, 93: 291-297, 1986.

IV. ARTIGO I

**Satellite DNA derived from the 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri*
(Amphibia, Anura, Leiuperidae)**

Stenio Eder Vittorazzi¹, Luciana Bolsoni Lourenço¹, Maria Lúcia Del-Grande² & Shirlei
Maria Recco-Pimentel^{1*}

¹Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, São Paulo, Brazil

²Departamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB),
45083-900 Vitória da Conquista, Bahia, Brazil

*Corresponding author: shirlei@unicamp.br

Keywords: Amphibia, *Physalaemus cuvieri*, 5S rDNA, satellite DNA.

Abstract

In this work, we describe the first case of a family of 190 bp satellite DNA related to the 5S rDNA in anurans and the existence of two forms of 5S rDNA: type I (201 bp) and type II (690 bp). The sequences were obtained from the genomic DNA of *Physalaemus cuvieri* from Palmeiras, State of Bahia, Brazil. Analysis of the nucleotide sequence revealed that the satellite DNA obtained by digestion with *EcoRI* called PcP190EcoRI is 70% similar to the coding region of type I 5S rDNA and 66% similar to the coding region of type II 5S. Membrane hybridization and PCR amplification of the sequence show that PcP190EcoRI is repeated in tandem. The satellite DNA and the type I and type II 5S rDNA were localized to *P. cuvieri* chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization. The PcP190EcoRI sequence was localized to the centromeres of chromosomes 1 through 5, and to the pericentromeric region of chromosome 3. Type I 5S rDNA was detected on chromosome 3, coincident with the site of PcP190EcoRI. Type II 5S rDNA was detected at the interstitial region on the long arm of chromosome 5. None of these sequences co-localized with nucleolar organizer regions (NOR). Our data suggests that this satellite DNA originates from the 5S ribosomal multigene family, and probably involved occurrences of gene duplication, nucleotide divergence and sequence dispersion in the genome.

Introduction

The eukaryotic genome consists of a large amount of non-protein coding DNA. A substantial amount of genomic DNA consists of repetitive DNA, with satellite DNA making up the largest part of these repetitive sequences (Charlesworth *et al.* 1994). Repetitive coding sequences, such as those of the ribosomal genes that are present in hundreds of copies, contribute to the increase in the mass of the eukaryotic genome (Long and Dawid, 1980).

The origin of the different types of repetitive DNA in the eukaryotes is of great interest, and there are many models that attempt to provide an explanation of their origin. The main and most accepted hypotheses are unequal crossing-over, DNA polymerase slippage, rolling-circle replication and base substitution (reviewed in Charlesworth *et al.* 1994). Once it is present, satellite DNA undergoes a process of constant dynamic evolution that occurs at the molecular level and is caused by changes in two parameters: copy number and nucleotide sequence. These changes may affect individual sequences or groups of sequences, and may give rise to species specific satellite DNA profiles. In some cases, these changes correlate with chromosome evolution, potentially influencing the evolution of the species (Ugarcovic and Plohl, 2002).

The repetitive genes of eukaryotes are of interest when considering evolutionary dynamics. In some cases they are related to the origin of the repetitive non-coding sequences and are independent of their original location, a characteristic of ribosomal genes. This phenomenon has already been described for some plant species *Vigna radiata* (Unfried *et al.* 1991), *Phaseolus vulgaris* (Flaquet *et al.* 1997), *Vicia sativa* (Macas *et al.* 2003) and *Solanum lycopersicum* (Jo *et al.* 2009) that exhibit sequences of satellite DNA similar to the intergenic spacers (IGS) contained within their NORs. Some cases have also

been reported in animals, such as the fish *Hoplias malabaricus*, in which a variant satellite of 5S rDNA is found in the centromeric regions of various chromosomes, suggesting this satellite DNA originated from the 5S rDNA (Martins *et al.* 2006). The amphibian *Triturus vulgaris* provides another example in which a portion of the 40S rDNA intergenic spacer was detected in chromosome sites independent of the nucleolar organizing region (NOR) (De Lucchini *et al.* 1997).

A repetitive sequence that is highly similar to the 5S rDNA is occasionally obtained when attempting to isolate satellite DNA sequences for use as new cytogenetic markers in *Physalaemus cuvieri*. In the present work, the repetitive sequences of satellite DNA were analyzed, along with the 5S rDNA, with the aim of understanding the molecular and chromosome dynamics of these sequences within the genome of the anuran *Physalaemus cuvieri*.

Materials and Methods

Specimens

Five specimens of *Physalaemus cuvieri* (4♂ and 1♀) (Amphibia, Anura, Leiuperidae), collected in the municipality of Palmeiras (12°31'45''S e 41°33'32''W), state of Bahia, Brazil, were analysed. Voucher specimens have been deposited in the Museu de Zoologia "Prof. Dr. Adão José Cardoso" (ZUEC) in the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), with catalog numbers 13670 to 13674.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from liver and muscle samples taken from specimen ZUEC 13673 that had been stored at -80°C. The tissue fragments were immersed in TNES

(250 mM Tris pH 7.5, 2 M NaCl, 100 mM EDTA, and 2.5% SDS), supplemented with proteinase K (0.2 mg/mL) and incubated at 56°C for about 5 h. The proteins were removed following precipitation with NaCl (1.25M). The DNA was precipitated in isopropanol (100%), washed in ethanol (70%) and hydrated in TE buffer pH 8. To analyse the quality and quantity of the genomic DNA obtained, samples were subjected to gel electrophoresis (0.8% agarose gel) and to spectrophotometry.

Isolation of restriction fragments

About 3µg of genomic DNA was digested with *EcoRI* (Fermentas). The fragments were separated on a 1.2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The visible bands were cut out with a sterile blade and purified using the GFX PCR and Gel Band DNA Purification kits (GE Healthcare) in accordance with manufacturer's instructions. Complementation of the sticky ends resulting from the enzyme digestion was achieved using *Taq*-polymerase at 70°C for 2 h, as described by Sánchez *et al.* (1996).

Cloning of the fragments obtained by enzyme digestion

The DNA fragments produced by PCR and restriction digests were ligated into the pGM-T Easy Vector (Promega) and transformed into *E. coli* JM109 using TransformAid™ Bacterial Transformation (Fermentas) in accordance with manufacturer's instructions.

The bacterial suspensions were plated onto solid LB medium containing ampicillin (100 µg/mL), X-gal (2% in dimethylformamide) and IPTG (50 mM) and were incubated overnight at 37°C. The positive colonies were cultivated at 37°C for about 16 h on a new LB plate containing ampicillin. Each colony was tested for the presence of the insert using PCR (T7 and SP6 primers). The remainder of each colony was resuspended in liquid LB

containing ampicillin. After two to three hours plasmid DNA was extracted from the liquid culture using the mini-prep method described in Sambrook *et al.* (1989). A sample of each liquid culture was stored at -80°C in liquid LB containing ampicillin and glycerol (30% v/v).

DNA sequencing

PCR products were sequenced using the BigDye Terminator kit (Applied Biosystems). The reaction products were precipitated using ethanol (80%), centrifuged at 1200 rpm for 30 min, washed in ethanol (70%) and centrifuged once more for 10 min. After drying, the products were resuspended in loading dye [blue-dextran-EDTA/formamide (1:5)], denatured for three min at 94°C and sequenced using an automated sequencer. The sequences obtained were edited using the Bioedit program (version 7.0.9.0) (Hall, 1999) and compared to sequences from GenBank.

The clones obtained were used to make probes for *in situ* hybridization on chromosome preparations from the *P. cuvieri* specimens.

PCR isolation of the 5S rDNA and amplification of the repetitive sequence

5S rDNA was amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) using primers 5S-A (TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) and 5S-B (CAG GCT GGT ATG GCC GTA AGC) developed for 5S rDNA amplification in the fish *Salmo trutta* (Pendás *et al.* 1994). Two visible bands were present after electrophoresis of the PCR products: one corresponded to fragments of about 200 bp and the other to fragments of about 700 bp.

For a more accurate analysis of the repetitive unit corresponding to the *EcoRI* fragment, the primers P190F (AGA CTG GCT GGG AAT CCC AG) and P190R (AGC

TGC TGC GAT CTG ACA AGG) were designed to anneal at nucleotides 87-107 (P190F) and 33-53 (P190R) of the isolated nucleotide sequence. The amplified products were visualized using gel electrophoresis.

All bands resulting from the PCR were excised from the gel with a sterile blade and purified using the GFX PCR and Gel Band DNA Purification kits (GE Healthcare) in accordance with manufacturer's instructions. The purified products were subsequently cloned and sequenced as previously described.

Southern Blotting

Genomic DNA was digested with *EcoRI* and the fragments were separated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel. The DNA was then transferred to a membrane (Sambrook *et al.*, 1989). A digoxigenin-dUTP probe was made through PCR. The probe was hybridized to the membrane overnight at 60°C and was detected with alkaline phosphatase using the DIG Nucleic Acid Detection kit (Roche) in accordance with the manufacturer's instructions.

Chromosome preparations and fluorescence in situ hybridization (FISH)

Metaphase chromosomes were prepared from suspensions of intestinal epithelial cells that had been treated with colchicine (adapted from King and Rofe, 1976; Schmid, 1978).

Cloned fragments were PCR amplified in the presence of biotin-dUTP (satellite DNA e 5S rDNA I) or digoxigenin-dUTP (type II 5S rDNA). The resulting probes were mixed with salmon DNA (100 ng), precipitated in ethanol and resuspended in hybridization

buffer pH 7 (50 % deionized formamide, 2xSSC, 40mM phosphate buffer, 1x Denhardt solution, 1% SDS, and 10% Dextran sulphate).

The *in situ* hybridization method used was described previously (Viegas-Péquignot, 1992). Biotin-labeled probes were detected using an anti-biotin antibody and a secondary antibody coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC). The probes labeled with digoxigenin were detected using an anti-digoxigenin antibody conjugated to rhodamine.

Images of metaphase chromosomes were captured using an Olympus BX-60 microscope and edited with Image-Pro Plus. The karyograms were mounted using the cytogenetic analysis standards for this population as reported by Quinderé *et al.* (2009)

Results

Satellite DNA

Cloning of the 190 bp fragments produced by *EcoRI* digestion of the genomic DNA resulted in 17 recombinant clones. Pairwise analysis of the nucleotide sequences revealed high similarity between the cloned fragments (88-100%) and no insertions/deletions sites were detected (Fig. 1). Consequently, these fragments were considered variants of a single type of satellite DNA, hereafter called PcP190EcoRI. The base composition analysis of the cloned sequences showed an average AT content of 53%.

Enzyme digestion followed by Southern Blotting detected four distinct bands of about 190 bp, 380 bp, 570 bp, and 760 bp, revealing the tandem repeat nature of this sequence (Fig. 2).

Amplification using a pair of internal primers, which annealed in adjacent *EcoRI* restriction fragments, showed that these fragments were exactly juxtaposed. Therefore, 190 bp defines the monomeric unit of this satellite DNA.

The PcP190EcoRI sequence showed high similarity with the 5S rDNA of other vertebrates [the anurans *Engystomops petersi* (Rodrigues *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* in preparation), *Bufo americanus* (Gaskins *et al.* 1992), *Xenopus laevis* (Christiansen *et al.* 1987), *Xenopus tropicalis* (Nietfeld *et al.* 1988) and *Rana pipiens* (Gaskins *et al.* 1992), the fish *Polypterus senegalus* (Morescalchi *et al.* 2008), and the reptile *Iguana iguana* (Roy and Enns, 1976)], specially with its transcribing region (Table I). To better understand the similarities between these sequences, the 5S rDNA of *Physalaemus cuvieri* was also isolated.

5S ribosomal DNA

The *Physalaemus cuvieri* 5S rDNA revealed the presence of two types of repetitive units: one of about 201 bp (called type I) and the other of about 690 bp (called type II). Sequencing of both type I and type II 5S rDNA revealed that the potential coding regions of both are the same size and are 86% similar to each other (Table 1). The size of the NTS (nontranscribed intergenic spacers) in type I and type II 5S rDNA differ greatly (81 bp, and 570 bp, respectively) with no similarity between their nucleotide sequence (Fig. 1). Alignment of the 17 PcP190EcoRI clones with the coding regions of type I and type II 5S rDNA revealed they are 70% and 66% similar, respectively (Fig. 1).

Chromosome hybridizations

In situ hybridization with a probe to PcP190EcoRI revealed markings at the centromeric regions of chromosomes 1, 2, 3, 4 and 5, and the pericentromeric region within the short arm of pair 3 (Fig. 3a).

Using FISH, type I 5S rDNA was located to the pericentromeric region within the short arm of pair 3, while type II 5S rDNA was found in the interstitial region within the long arm of chromosome 5. It should be noted that in some metaphase chromosomes, both type II and type I 5S rDNA hybridized to the same region of chromosome 3 (Fig. 3b). This to be expected due to the similarity between the coding regions of the two forms of 5S rDNA.

Discussion

The 5S ribosomal DNA encodes 5S rRNA, a component of the largest subunit of the prokaryotic and eukaryotic ribosome that is essential for protein synthesis. The universal characteristics of these organisms are ensured by the well conserved, 120 bp genes that are present in distantly related taxons (Long and Dawid, 1980). Similarly, the 5S rDNA unit of *P. cuvieri* isolated in this research showed a region of high similarity with the 5S rDNA sequences available in GenBank. Both the nucleotide composition and the length of the NTS are quite variable, even in related species. This variation is because these regions do not correspond to 5S rRNA transcript, culminated by a low rate of selective pressure. On the contrary, the region flanking the NTS, composed of the 120 bp sequence responsible for 5S rRNA transcript, is under great selective pressure, which causes high conservation among species (Long and Dawid, 1980). Despite this variation of the NTS, the minimum size

compatible with the organization and function of these genes is about 60-80 bp (Martins and Galletti, 2001a, b).

The presence of two types of 5S rDNA, as detected in *P. cuvieri*, has been described in other vertebrates. The existence of different 5S rDNA (generally two) has been described for a variety of fish species, with sizes of approximately 200 bp and 800 bp and variable NTS sizes (Martins and Galetti, 2001a, b; Martins *et al.* 2002; Alves-Costa *et al.* 2006). In anurans, a condition very similar to that of *P. cuvieri* has been observed in the species of *Engystomops* (Rodrigues *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* in preparation), another genus within the Leiuperidae family.

It is thought that gene duplication is one of the evolutionary factors that lead to genomic diversity and complexity (Ohno, 1970; Zhang, 2003). Multigene families, such as ribosomal DNA, may have members of their family that have functional roles, while other members lack functionality (Graur and Li 2000). The present study showed that the *P. cuvieri* 5S rDNA, which is composed of a 201 bp repetitive unit and located on chromosome 3, has at least one family of satellite DNA in its chromosomal proximity. In addition, the high sequence similarity between PcP190EcoRI and the transcribing regions of 5S rDNA suggests that PcP190EcoRI originated from this ribosomal DNA sequence. Furthermore, the other chromosomal locations of PcP190EcoRI (not adjacent to the 5S rDNA site) may have originated from chromosome rearrangements involving the heterochromatic regions of the centromere. At present, it is not possible to elucidate whether the origin and the dispersal of this satellite sequence have occurred only in the lineage from which *P. cuvieri* has originated, or if these phenomena have been shared with other species.

Comparison of PcP190EcoRI sequence with sequences from the type I and type II 5S rDNA showed that the regions of higher similarity (around 70%) corresponds to the

transcriptional sequences of 5S rDNA, while the regions corresponding to the 5S NTS are not similar. This must reflect the fact that the NTS of 5S rDNA has a higher rate of evolution than the 5S rDNA transcribing region, and that the 5S rDNA kept diverging after the PcP190EcoRI satellite origin. In addition, the satellite DNA also has an accelerated mutability rate (Plohl *et al.* 2008), which can account for the base substitutions observed between the 17 monomers isolated in the current study, a fact that also contributes to the nucleotide divergence between PcP190EcoRI and 5S rDNA as a whole.

In conclusion, the high similarity between the nucleotide sequences of 5S rDNA and PcP190EcoRI, and the co-localization of these sequences in the pericentromeric region of pair 3 of the *P. cuvieri* karyotype studied here suggest that PcP190EcoRI may have originated from a duplication event of the 5S rDNA multigene family. Similarly, the presence of two types of 5S rDNA in distinct chromosomes (pairs 3 and 5) of *P. cuvieri* may have resulted from recombination events between non-homologous chromosomes that led to the variation in sequence size and nucleotide composition. Sequence analysis and chromosomal location of PcP190EcoRI and 5S rDNA in other species the genus *Physalaemus* constitute an interesting issue for further studies and may be essential for a better understanding of the evolution of these sequences.

The use of 5S rDNA as cytogenetic markers in chromosome studies of anurans is not well developed and is restricted to a few species (Schmid *et al.* 1987; Vitelli *et al.* 1982), as well as to satellite DNA (Odierna *et al.* 1999, 2004). In the *P. cuvieri* karyotype studied here, the 5S rDNA genes were not in the same site of 18S+5.5S+28S rDNA genes, which were located in chromosome pair 8 by Quinderé *et al.* (2009). Therefore, the sequences isolated in the present study may constitute an important tool for cytotaxonomic and

evolutionary studies of the *Physalaemus* group and other anurans, and may reveal surprising mechanisms involving the molecular dynamics of these organism's genomes.

Acknowledgements

We wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Programa de Excelência Acadêmica (PROEX), the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ, protocol 620163/2008-9) for financial support, the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, protocol 02010.002895/03-84) for the animal collection license.

References

- Alves-Costa FA, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F, Martins C (2006) Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in Tilapini fishes. *Genetica* 127: 243-252.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220.
- Christiansen J, Brown RS, Sproat BS, Garrett RA (1987) *Xenopus* transcription factor IIIA binds primarily at junctions between double helical stems and internal loops in oocyte 5S RNA. *EMBO J* 6: 453-460.
- Flaquet J, Creusot F, Drone M (1997) Molecular analysis of *Phaseolus vulgaris* rDNA units and characterization of a satellite DNA homologous to IGS repeats. *Plant Physiol Biochem* 35: 611-622, 1997.

Gaskins CJ, Smith JF, Ogilvie MK, Hanas JS (1992) Comparison of the sequence and structure of transcription factor IIIA from *Bufo americanus* and *Rana pipiens*. *Gene* 120: 197-206.

Graur D, Li W (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland: Sinauer.

Hall, TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.

Jo S, Koo D, Kim JF, Hur C, Lee S, Yang T, Kwon S, Choi D (2009) Evolution of ribosomal DNA-derived satellite repeat in tomato genome. *BMC Plant Biol* 9: 1-14.

King M, Rofe R (1976) Karyotypic variation in the Australian gecko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma* 54: 75-87.

Long EO, Dawid IB (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Ann Rev Biochem* 49: 727-64.

De Lucchini SD, Andronico F, Nardi I (1997) Molecular structure of the rDNA intergenic spacer (IGS) in *Triturus*: implications for the hypervariability of rDNA loci. *Chromosoma* 106: 315-326.

Macas J, Navratilova A, Meszaros T (2003) Sequences subfamilies of satellites repeats related to rDNA intergenic spacer are differentially amplified on *Vicia sativa* chromosomes. *Chromosoma* 112: 152-158.

Martins C, Galetti-JR PM (2001a) Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. *Genome* 44: 903-910.

Martins C, Galetti-JR PM (2001b) Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica* 111: 439-446.

Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti PMG (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformers: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127: 133-141.

Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parisi-Maltempi PP, Wright JM, Foresti F (2002) Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet Gen Res* 98: 76-85.

Morescalchi MA, Liguori I, Rocco L, Archimandritis A, Stingo V (2008) Karyotypic characterization and genomic organization of the 5S rDNA in *Polypterus senegalus* (Osteichthyes, Polypteridae). *Genetica* 132: 179-186.

Nietfeld W, Digweed M, Mentzel H, Meyerhof W, Koster M, Knochel W, Erdmann VA, Pieler T (1988) Oocyte and somatic 5S ribosomal RNA and 5S RNA encoding genes in *Xenopus tropicalis*. *Nucleic Acids Res* 16: 8803-8815.

Odierna G, Aprea G, Capriglione T, Castellano S, Balletto E (2004) Evidence for chromosome *Pst I* satellite DNA family evolutionary stasis in the *Bufo viridis* group (Amphibia, Anura). *Chrom Res* 12: 671-681.

Odierna G, Aprea G, Capriglione T (1999) Chromosomal and molecular analysis of some repeated families in *Discoglossus* Otth, 1837 (Anura, Discoglossidae): taxonomic and phylogenetic implications. *Ital J Zool* 66: 275-283.

Ohno S (1970) *Evolution by gene duplication*. New York: Springer-Verlag.

Pendás AM, Morán P, Freije JP, Garcia-Vázquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Cell Genet* 67: 31-36.

Plohl M, Luchetti A, Mestrovic N, Mantovani B (2008) Satellites DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409: 72-82.

Quinderé YRSD, Lourenço LB, Andrade GV, Tomatis C, Baldo D, Recco-Pimentel SM (2009) Additional cytogenetics analyses of the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on NOR variability. *Biol Res* 42: 79-92.

Rodrigues DS, Recco-Pimentel SM, Lourenço LB (2009) Isolamento, caracterização e localização cromossômica do gene ribossomal 5S de *Engystomops petersi* e *Engystomops* sp. (Anura, Leiuperidae). Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética: 119

Roy KL, Enns L (1976) Nucleotide sequence of 5 S ribosomal ribonucleic acid of *Iguana iguana*. *J Biol Chem* 251: 6352-6354.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez A, Bullejos M, Burgos M, Jiménez R, D'áz De La Guardia R (1996) An alternative to blunt-end ligation for cloning DNA fragments with incompatible ends. *Trends Genet* 12: 44.

Schmid M (1978) Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361-388.

Schmid M, Vitelli L, Batistoni R (1987) Chromosome banding in amphibia. XI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoclossidae and Pelobatidae. *Chromosoma* 95: 271-284.

Ugarkovic D, Plohl M (2002) Variation in satellite DNA profiles – causes and effects. *EMBO J* 21: 5955-5959.

Unfried K, Schiebel K, Hemleben V (1991) Subrepeats of rDNA intergenic spacer present as prominent independent satellite DNA in *Vigna radiate* but not in *Vigna angularis*. *Gene* 99: 63-68.

Viegas-Pequignot E (1992) *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson D. (ed). *In situ* hybridization: a practical approach. Oxford: Oxford University Press-IRL Press.

Vitelli L, Batistoni R, Andronico F, Nardi I, Barsacchi-Pilone G (1982) Chromosomal localization of 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary diverse amphibians. *Chromosoma* 84: 475-491.

Zhang J (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecol and Evol* 18: 292-298.

Table 1. Similarities (in percent) of the type I and type II 5S rDNA and the PcP190EcoRI fragment of *Physalaemus cuvieri* with the 5S rDNA sequences of other vertebrate species. Only the 120 bp transcribing region of 5S rDNA and its corresponding segment of PcP190EcoRI were considered for this analysis.

Species (GenBank accession No.)	<i>P. cuvieri</i> 5S I	<i>P. cuvieri</i> 5S II	<i>P. cuvieri</i> PcP190EcoRI
<i>P. cuvieri</i> 5S I (present work)	-	86	70.0
<i>P. cuvieri</i> 5S II (present work)	86	-	66.0
<i>Engystomops petersi</i> 5S I (GU586283)	100	85.0	70.0
<i>Engystomops petersi</i> 5S II (GU586284)	87.5	90	67.5
<i>Bufo americanus</i> (X58365.1)	91.6	81.6	71.6
<i>Xenopus laevis</i> (X05089.1)	85.8	79.1	75.0
<i>Xenopus tropicalis</i> (X12622.1)	93.3	83.3	72.5
<i>Rana pipiens</i> (X58368.1)	89.1	81.6	72.5
<i>Polypterus senegalus</i> 5S I (EF127897.1)	95.0	86.6	71.6
<i>Polypterus senegalus</i> 5S II (EF127898.1)	95.0	85	75.8
<i>Iguana iguana</i> (M10817.1)	94.1	85	72.5

Figure Legend

Fig. 1. Alignment of the 17 PcP190EcoRI clones and the type I and type II 5S rDNA sequence from *P. cvieri*. The intraspecific variation between the satellite DNA sequences are characterized by nucleotide substitutions and the absence of insertions and deletions. The location of the internal primers (P190F and P190R) used to verify the tandem nature of the sequences, and the *EcoRI* endonuclease cleavage sites are indicated. The grey background indicates the type I and type II 5S rDNA transcribing region. The locations of the primers used to amplify the 5S rDNA are also indicated.

Fig. 2. Membrane hybridization of *P. cvieri* genomic DNA subjected to partial digestions with *EcoRI* and detected with a PcP190EcoRI probe illustrates the repetitive tandem nature of this satellite sequence. The molecular weights are indicated for each band.

Fig. 3. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of *P. cvieri* karyotypes with (a) the PcP190EcoRI probe detected with FITC (green) showing markers in the centromeric regions of pairs 1 through 5, and (b) double-FISH with 5S rDNA probes; type I was detected by FITC (green) and type II was detected with rhodamine (red). Type I and type II 5S rDNA probes hybridized to the pericentromeric region of pair 3 (yellow color due to the green and red overlap), and hybridized to the interstitial region of pair 5. Bar = 5 μ m.

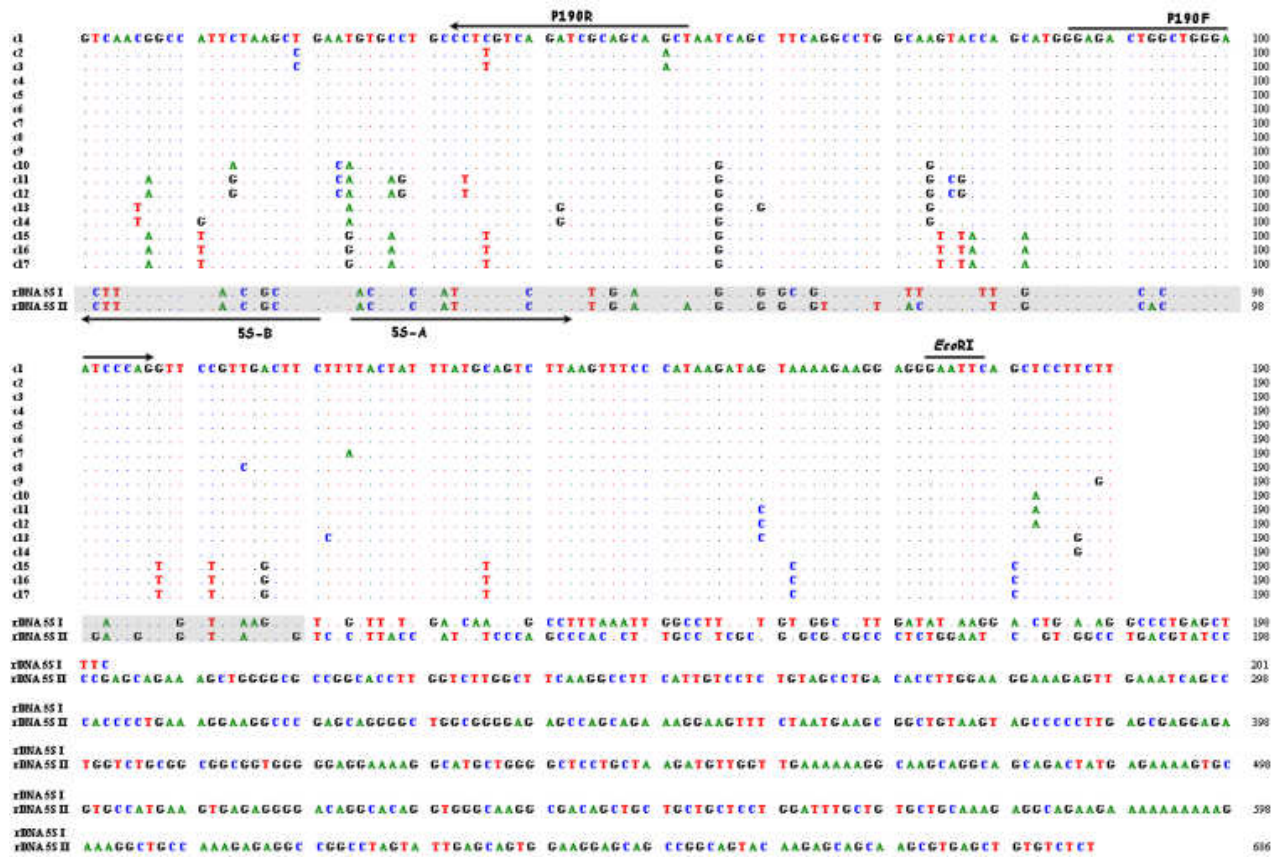


Fig. 1.

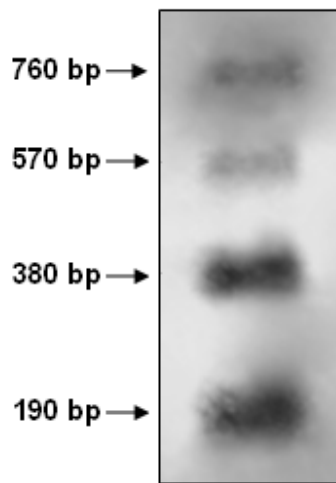


Fig. 2.

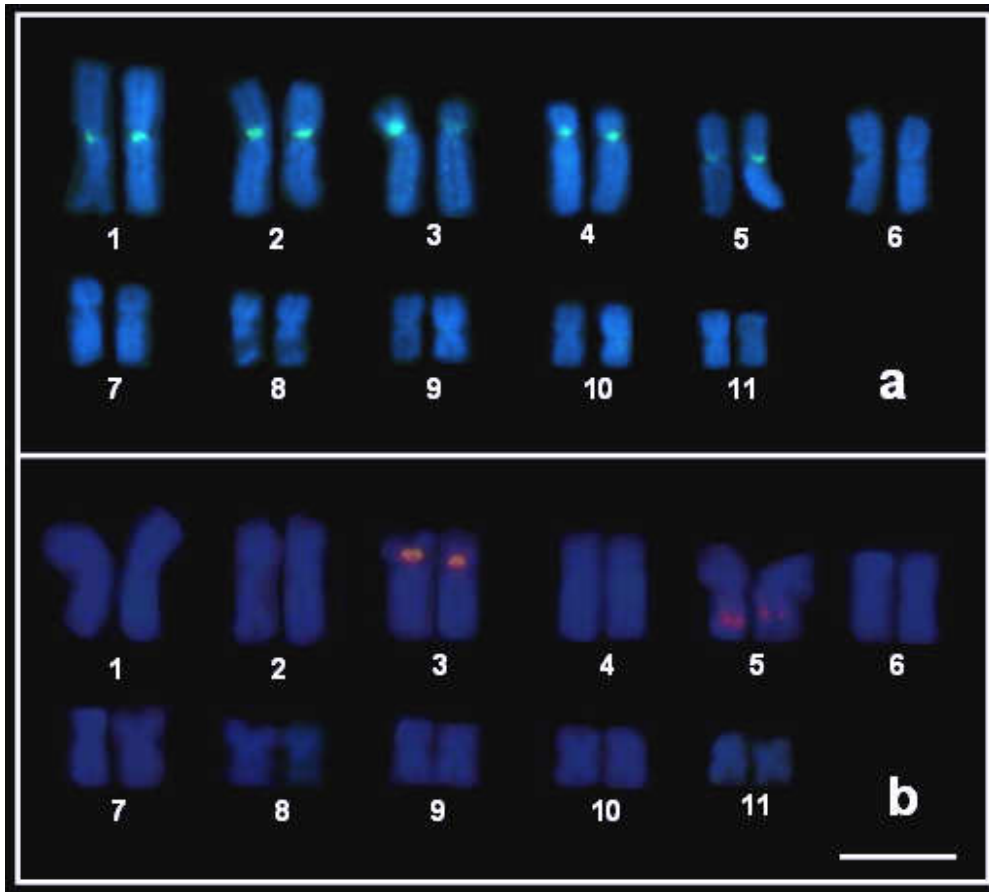


Fig. 3.

V. ARTIGO II

Distribuição de três sequências de DNA repetitivo nos cromossomos de espécies do grupo de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae)

Stenio Eder Vittorazzi¹, Luciana Bolsoni Lourenço¹, Gilda Vasconcellos de Andrade²,
Denise C. Rossa-Feres³, Sérgio Siqueira⁴ & Shirlei Maria Recco-Pimentel¹

¹Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, São Paulo, Brasil

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão (UFMA) 65040-080 São Luis, Maranhão, Brasil

³Departamento de Zoologia e Botânica, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), 15054-000 São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia 45206-190 Jequié, Bahia, Brasil

Palavras-chaves: Amphibia; Anura; *Physalaemus*; DNA repetitivo; citogenética.

Resumo

O objetivo desse trabalho foi desenvolver novos marcadores citogenéticos para o estudo do grupo de espécies de *Physalaemus cuvieri*, em especial para populações de *P. cuvieri* e outras duas espécies, *P. albonotatus* e *P. centralis*, bem como verificar a aplicabilidade de sequências repetitivas para estudo cromossômico de espécies próximas em anuros. Para tanto, três sequências de DNA repetitivo foram isoladas do genoma de indivíduos de *P. cuvieri* provenientes de Palmeiras – BA, após digestão enzimática do DNA genômico com as enzimas *EcoRI* e *PstI*. Tais sequências de 190, 883 e 174 pares de bases, denominadas PcP190EcoRI, PcP883EcoRI e PcP174PstI, foram clonadas, sequenciadas e localizadas *in situ* nos cariótipos de três populações de *P. cuvieri* (Palmeiras – BA, Urbano Santos – MA e Porto Nacional – TO), de *P. centralis* (Palestina – SP) e de *P. albonotatus* (Lambari d'Oeste – MT). Todas as regiões cromossômicas reveladas nos experimentos de hibridação são coincidentes com blocos de heterocromatina, detectados por bandamento C em estudo prévio. No entanto, as populações de *P. cuvieri* e as espécies estudadas diferem entre si pelo número e localização dos sítios hibridados com as três sequências nos cariótipos. Os dados do presente trabalho revelaram ainda diferente composição da heterocromatina entre cromossomos aparentemente homeólogos dessas espécies e populações. Esses resultados corroboram a sugestão prévia de que a população de Porto Nacional – TO pode ser uma nova espécie e indica que *P. cuvieri* pode se tratar de um complexo de espécies crípticas. As sequências repetitivas isoladas mostraram serem bons marcadores cromossômicos para esse grupo de espécies de anuros.

Introdução

O gênero *Physalaemus* é atualmente constituído de 42 espécies (Frost, 2009), as quais foram agrupadas feneticamente em sete grupos utilizando dados de morfologia externa e osteologia (Nascimento *et al.*, 2005). O grupo “cuvieri” é constituído por nove espécies, *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cicada*, *P. cuqui*, *P. cuvieri*, *P. ephippifer*, *P. erikae*, *P. fischeri* e *P. kroyeri*, e está amplamente distribuído pelo continente Sul-Americano, ocorrendo da Venezuela à Argentina, em formações abertas do Cerrado, Caatinga, Chacos e em regiões de domínios planos (Nascimento *et al.*, 2005; Frost, 2009).

As espécies *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cuqui*, *P. cuvieri*, *P. cicada* e *P. kroyeri* já foram estudadas citogeneticamente e apresentaram cariótipo bastante conservado, no número diplóide de $2n=22$ e na morfologia dos cromossomos analisados por coloração convencional (Beçak *et al.*, 1970; Denaro, 1972; De Lucca *et al.*, 1974; Silva *et al.*, 1999; Quinderé, 2007; Quinderé *et al.*, 2009). No entanto, apesar dessa aparente conservação dos cariótipos, existe uma extensa variação no arranjo das NORs em espécies do grupo “cuvieri”, assim como entre populações de *P. cuvieri* (Silva *et al.*, 1999; Quinderé, 2007; Quinderé *et al.*, 2009). Além disso, uma dessas populações de *P. cuvieri* possui cromossomos com uma acentuada diferença em relação ao padrão de banda C, enquanto em outras populações esse padrão é muito similar (Quinderé *et al.*, 2009). Algumas espécies do grupo “cuvieri” são muito similares morfologicamente, e por longo tempo foram consideradas crípticas com *P. cuvieri* (Barrio, 1965). Portanto, esse grupo constitui um interessante modelo para verificação da aplicabilidade de outros marcadores para esclarecimento desse tipo de problemática.

Sabe-se que regiões heterocromáticas são constituídas principalmente por DNAs satélites, que estão presentes em muitos eucariotos e são responsáveis pela grande

quantidade de heterocromatina encontrada no genoma desses organismos (Bachmann e Sperlich, 1993; Charlesworth *et al.*, 1994). Essas sequências que compõem a heterocromatina estão constantemente em processo de homogeneização genômica, seja por recombinação desigual na meiose, amplificação e conversão gênica ou por mecanismos de transposição de DNA (Dover, 1982). As sequências de DNA satélite não são conservadas sendo, muitas vezes, específicas para algumas espécies, o que sugere que os DNA satélites originaram-se a partir de diferentes sequências de DNA (Slamovits e Rossi, 2002). A mesma sequência pode também estar presente em espécies estreitamente relacionadas (Singer, 1982; Picariello *et al.*, 2002; Martinsen *et al.*, 2009). Os processos evolutivos que acarretam mudanças nessas sequências nucleotídicas levam à origem de perfis de DNA satélite espécie-específicos, e em alguns casos, essas mudanças podem ser correlacionadas com a evolução cromossômica e possivelmente influenciar na evolução das espécies (Ugarcovic e Plohl, 2002).

Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi isolar e estudar a organização de DNAs repetitivos nos cromossomos de três populações de *P. cuvieri* e de outras duas espécies do grupo “cuvieri”, *P. albonotatus* e *P. centralis*, buscando novos marcadores para diferenciar cromossomos aparentemente iguais quando submetidos à técnica de banda C, ampliando os estudos citotaxonômicos de anuros do gênero *Physalaemus*.

Materiais e Métodos

Espécimes

Foram analisadas três espécies de *Physalaemus*, tendo sido utilizados espécimes de uma população de *P. centralis* (Palestina – SP), de uma população de *P. albonotatus* (Lambari D'Oeste – MT) e de três populações de *P. cuvieri* (Palmeiras – BA, Urbano Santos – MA e Porto Nacional – TO), conforme detalhado na tabela 1 e na figura 1. A coleta dos animais foi realizada com permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – Processo número 02010.002895/03-84).

Extração de DNA genômico, digestão enzimática e clonagem

DNA genômico foi extraído de amostras de fígado estocadas a -80°C, provenientes de espécimes de *P. cuvieri* de Palmeiras (BA). Os fragmentos foram macerados em TNES (Tris 250 mM pH7,5; NaCl 2M; EDTA 100 mM; e SDS 2,5%), suplementado com proteinase K (20mg/ml) e mantidos a 56°C por cerca de 5 horas. As proteínas foram removidas depois de precipitadas com NaCl (1,25M). O DNA foi precipitado em isopropanol (100%), lavado em etanol (70%) e, por fim, hidratado em tampão TE a pH 8. Para a análise da qualidade e quantificação do DNA genômico obtido, amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% e espectrofotometria.

Cerca de 3µg do DNA genômico foi digerido com as enzimas *Pst*I e *Eco*RI (Fermentas), conforme instruções do fabricante. Para separação dos fragmentos gerados, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,2% e corado em brometo de etídeo. As bandas evidentes foram recortadas com lâmina estéril e purificadas utilizando o *kit GFX PCR and Gel Band DNA Purification* (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante.

A complementação das extremidades coesivas resultantes da digestão enzimática foi feita pela extensão das extremidades 3' com *Taq*-polimerase a 70°C por duas horas, conforme descrito por Sánchez *et al.* (1996). Posteriormente foi feita a ligação dos fragmentos de DNA com o vetor pGM-T Easy Vector (Promega). Os vetores recombinantes foram utilizados para a transformação de bactérias *E. coli* da linhagem JM109, com o auxílio do TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (Fermentas), seguindo orientação do fabricante.

As suspensões bacterianas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (25mg/ml), X-gal (2% em dimetilformamida) e IPTG (50mM) e incubadas *overnight* a 37°C. As colônias brancas foram cultivadas a 37°C por cerca de 16 horas em nova placa contendo meio LB sólido com ampicilina. Uma amostra de cada colônia foi submetida à reação de PCR com os primers T7 e SP6, para verificar a presença de inserto. O restante de cada colônia foi ressuspenso em meio LB líquido suplementado com ampicilina. Depois de algumas horas, parte das culturas líquidas foi utilizada para a extração de DNA plasmidial, seguindo o método de *mini-prep* descrito por Sambrook *et al.* (1989). Uma amostra de cada cultura líquida foi estocada a -80°C em meio LB líquido com ampicilina e glicerol (30% v/v).

Sequenciamento

Para o sequenciamento desses fragmentos, amostras dos produtos amplificados por PCR foram submetidas a reações de sequenciamento, com o auxílio do *kit BigDye Terminator (Applied Biosystems)*. Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados através da precipitação do DNA com etanol (80%), seguida de centrifugação a 1200 rpm por 30 minutos, e depois lavados em etanol (70%) e novamente submetidos à

centrifugação por 10 minutos. Depois de secos, os produtos obtidos foram ressuspensos em *loading dye* (*Blue-Dextran-EDTA/Formamida* (1:5), desnaturados por três minutos a 94°C e aplicados em um sequenciador automático. As sequências obtidas foram editadas com o auxílio do *software* Bioedit (<http://www.jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) e comparadas com sequências depositadas no *GenBank*.

Os clones obtidos foram usados como sondas em experimentos de hibridação *in situ* em preparações cromossômicas de *P. cuvieri*, *P. centralis* e *P. albonotatus*.

Obtenção das preparações cromossômicas

Metáfases mitóticas foram obtidas a partir de suspensões celulares do epitélio intestinal dos espécimes tratados previamente com colchicina (adaptado de King e Rofe, 1976 e Schmid, 1978).

Hibridação in situ fluorescente - FISH

Para a marcação das sondas, amostras dos fragmentos clonados foram amplificadas por PCR, na presença de dUTP-biotina ou dUTP-digoxigenina. Após essa reação, a sonda foi misturada a DNA de salmão (100 ng) e precipitada com etanol. Todo o DNA resultante foi ressuspensado em meio de hibridação a pH 7, que é composto por formamida deionizada (50%), 2x SSC, tampão fosfato (40mM), solução de Denhardt (1x), SDS (1%) e Dextran sulfato (10%).

O método de hibridação utilizado é o descrito por Viegas-Péquignot (1992). A detecção do nucleotídeo marcado foi feita com o auxílio de um anticorpo, reconhecido por um anticorpo secundário acoplado ao composto fluorescente (*Fluorescein isothiocyanate*).

As metáfases com marcações evidentes foram capturadas em microscópio Olympus BX-60, editadas no *software* Image-Pro Plus. Para montagem dos cariótipos seguiu-se a mesma ordenação proposta por Quinderé (2007) e Quinderé *et al.* (2009).

Resultados

Sequências de DNA repetitivo

Com a digestão enzimática do DNA genômico de *P. cuvieri* foram obtidas duas bandas com *EcoRI* e uma banda com *PstI*. A endonuclease *PstI* gerou fragmentos de 174 pares de bases sendo 51,15% A+T, denominados de PcP174PstI. A endonuclease *EcoRI* resultou em fragmentos de dois tamanhos, sendo um com 190 pares de bases, com conteúdo de aproximadamente 53% A+T e denominado PcP190EcoRI. Outro fragmento gerado com *EcoRI* possui 883 pares de bases com conteúdo rico em A+T (62,02%), e foi denominado PcP883EcoRI (Fig. 2).

Ao utilizar a ferramenta BLAST disponível no *GenBank*, as sequências PcP174PstI e PcP883EcoRI não revelaram similaridade com nenhuma sequência depositada nesse banco de dados, no entanto, o PcP190EcoRI mostrou similaridade de aproximadamente 70% com o DNAr 5S isolado de *P. cuvieri* (ver Vittorazzi *et al.*, em preparação).

Hibridações cromossômicas

No cariótipo das espécies *P. albonotatus* e *P. centralis* e no cariótipo das três populações de *P. cuvieri* acima mencionadas foi possível detectar regiões cromossômicas portadores das sequências de DNA repetitivos isolados nesta pesquisa.

Em *P. cuvieri* da população de Palmeiras – BA, as sondas das três sequências, PcP174PstI, PcP190EcoRI e PcP883EcoRI, hibridaram nas mesmas regiões cromossômicas,

sendo centroméricas nos pares 1 a 5 e pericentromérica no par 3 (Fig. 3a-c). O padrão de hibridação dessas sequências nos cariótipos da população de *P. cuvieri* de Porto Nacional – TO e de Urbano Santos – MA diferiu um pouco daquele encontrado no cariótipo de espécimes de Palmeiras – BA. No cariótipo de espécimes de Porto Nacional – TO, a sonda PcP174PstI hibridou nas regiões centroméricas dos pares 1 a 7 e 10 e pericentroméricas dos pares 2, 3 e 5; a sequência PcP190EcoRI hibridou nos centrômeros dos pares 1 a 9 e regiões pericentroméricas dos pares 2, 3, 5, 7 e 8; e a sonda PcP883EcoRI hibridou nas regiões centroméricas dos pares 1 a 10 e pericentroméricas dos pares 2, 3, 5, 7 e 9 (Fig. 3d-f). No cariótipo da população de Urbano Santos – MA, as sondas PcP174PstI e PcP883EcoRI hibridaram nos centrômeros dos pares cromossômicos 3 e 11, já a sonda PcP190EcoRI, além de hibridar nesses mesmos cromossomos, também hibridou na região centromérica do par 2 (Fig. 3g-i).

Em *P. albonotatus*, a sonda PcP190EcoRI hibridou na região centromérica e pericentromérica do par 4, já as sondas PcP174PstI e PcP883EcoRI hibridaram nessas mesmas regiões do par 4 e na região telomérica no braço longo do par 8 (Fig. 3j-l).

Em *P. centralis*, o padrão de hibridação para as sondas PcP190EcoRI e PcP883EcoRI foi semelhante, diferindo apenas na intensidade das marcações, sendo marcados os centrômeros dos cromossomos 1 a 5, 8 e 10, já a sonda PcP174PstI marcou as regiões centroméricas dos cromossomos 3 e 10 (Fig. 3m-o).

Discussão

As três sequências de DNA repetitivo isoladas de *P. cuvieri* da população de Palmeiras – BA possuem composição maior em bases A+T, o que é uma característica de

muitos de DNA satélites isolados de diversas espécies animais, como por exemplo, *Triturus viridescens* (Barsacchi e Gall, 1972), *Diprion pini* (Rouleux-Bonnin *et al.*, 1996), *Palorus ratzeburgii*, *Palorus subdepressus*, *Palorus genalis*, *Palorus ficicola* (Mestrovic *et al.*, 1998), *Microtus cabrerai* (Fernandez *et al.*, 2001), *Hoplias malabaricus* (Martins *et al.*, 2006), *Chionomys nivalis* (Acosta *et al.*, 2007), entre outras. No entanto, sabe-se que essa característica não é regra geral para esse tipo de DNA repetitivo, pois há descrições de DNA satélites ricos em G+C, por exemplo, em *Pteropus* (Barragán *et al.*, 2002) e *Donax trunculus* (Petrovic *et al.*, 2009).

As sequências de DNA repetitivo estão presentes em praticamente todos os organismos eucariotos, podendo ser espécie-específicas (Slamovits e Rossi, 2002) ou estarem presentes em espécies estreitamente relacionadas (Singer, 1982; Picariello *et al.*, 2002; Martinsen *et al.*, 2009). Essa última condição pode ser observada no presente estudo, uma vez que as sequências PcP173PstI, PcP190EcoRI e PcP883EcoRI são compartilhadas pelo genoma de *P. cuvieri*, *P. albonotatus* e *P. centralis*. Essas sequências não são cromossomo-específicas, característica essa já observada para muitos DNAs satélites em inúmeras espécies, como *Gobius cobitis* (Canapa *et al.*, 2002), *Astyanax scabripinnis* e *Astyanax fasciatus* (Abel *et al.*, 2006) e *Hoplias malabaricus* (Martins *et al.*, 2006). A explicação para tal fato é que essas sequências repetitivas evoluem por mecanismos de recombinação entre cromossomos não-homólogos, o que acarreta a homogeneização de tais sequências no genoma (Dover, 1986). De acordo com Bachmann e Sperlich (1993), essas sequências altamente repetitivas são restritas a regiões de heterocromatina. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com essa informação, uma vez que as sequências PcP173PstI, PcP190EcoRI e PcP883EcoRI foram localizados especificamente nas regiões

de banda C verificadas por Quinderé (2007) e Quinderé *et al.* (2009) das mesmas populações.

As três populações de *P. cuvieri*, assim como *P. albonotatus* e *P. centralis*, foram citogeneticamente analisadas por Quinderé (2007) e Quinderé *et al.* (2009), utilizando coloração com Giemsa, bandamento C e impregnação por prata para NOR. Essas espécies apresentaram um padrão cariotípico conservado apenas em relação ao número e morfologia cromossômica, pois existe uma extensa variação na posição das regiões organizadoras de nucléolo (NOR) (Fig. 3a, d, g, j e m) nas diferentes espécies e também em populações de *P. cuvieri* (Quinderé, 2007, Quinderé *et al.*, 2009). Dentre as populações de *P. cuvieri*, destaca-se a de Porto Nacional – TO, que apresentou NOR's em vários cromossomos e padrão de banda C diferenciado localizado em regiões pericentroméricas de alguns cromossomos, enquanto nas demais populações essas bandas são predominantemente centroméricas (Quinderé *et al.*, 2009). No presente trabalho, o cariótipo da população de Porto Nacional – TO também se diferenciou pela presença dos DNA repetitivos PcP174PstI, PcP190EcoRI e PcP883EcoRI na região centromérica de um maior número de cromossomos, tendo sido detectadas em todos os cromossomos, exceto no par 11. Embora não detectadas nesse par, não descartamos a possibilidade da existência dessas sequências nesse cromossomo, com um baixo número de cópias, já que é o menor cromossomo do complemento e tem uma banda heterocromática centromérica pequena.

Vale destacar ainda que várias regiões heterocromáticas pericentroméricas, detectadas por bandamento C por Quinderé *et al.* (2009) exclusivamente no cariótipo de exemplares de *P. cuvieri* provenientes de Porto Nacional – TO, mostraram ser os mesmos sítios hibridados com as sondas desta pesquisa. Aparentemente, essas são as mesmas regiões também detectadas por Quinderé *et al.* (2009) pelo método AgNOR ou por FISH

com sonda de DNAr nucleolar (HM123). Naquele trabalho, Quinderé *et al* (2009) atribuíram esse fato a uma possível similaridade entre as sequências constituintes dessas regiões heterocromáticas com a sonda HM 123 e discutiram sobre a provável presença de sequências repetitivas nesses sítios cromossômicos.

Já os cariótipos dos espécimes das populações de Palmeiras – BA e Urbano Santos – MA, embora apresentem regiões de banda C muito similares entre si, sendo predominantemente centroméricas em todos os cromossomos (Quinderé *et al.*, 2009), diferiram em relação à composição dessas regiões. Blocos heterocromáticos de cromossomos homeólogos entre os cariótipos dessas populações, que por bandamento C pareciam ser iguais, mostraram diferentes composições em relação as três sequências de DNA repetitivo aqui isoladas, exceto aquele bloco centromérico/pericentromérico do cromossomo 3, que mostrou o mesmo padrão de hibridação com os três fragmentos em questão.

As diferenças aqui observadas entre as populações de *P. cuvieri* representam novas evidências de variações interpopulacionais nesse táxon, que pode inclusive representar um complexo de espécies crípticas e merece uma cuidadosa revisão taxonômica, conforme já considerado por Quinderé *et al.* (2009). As três populações por nós analisadas são representantes dos três diferentes grupos reconhecidos pela análise citogenética conduzida por aqueles autores.

O cromossomo 3 do cariótipo de *P. centralis* e o cromossomo 4 de *P. albonotatus*, que são homeólogos ao cromossomo 3 de *P. cuvieri*, também apresentaram hibridação com as sondas PcP174PstI, PcP190EcoRI e PcP883EcoRI. Esse interessante resultado nos mostra que a origem dessas sequências aconteceu antes da divergência dessas espécies, e

que, portanto, elas foram compartilhadas por um ancestral comum entre as três espécies em questão.

Em relação à sequência PcP190EcoRI, no entanto, cabe aqui uma ressalva. Já que esse fragmento apresenta cerca de 70% de similaridade com a região codificadora de RNAr 5S de *P. cuvieri* (Vittorazzi *et al.*, em preparação), é possível que a hibridação com a sonda PcP190EcoRI tenha detectado não apenas presença desse DNA satélite, mas também do sítio de DNAr 5S. Essa questão é especialmente relevante na análise dos resultados obtidos para *P. albonotatus*, em que apenas um sítio cromossômico hibridou com tal sequência em todo arranjo cariotípico. Para elucidar tal questão, novos estudos têm sido realizados.

É interessante ressaltar que as sondas PcP173PstI, PcP190EcoRI e PcP883EcoRI em alguns casos colocalizam nas regiões cromossômicas e em outros não. Na população de *P. cuvieri* de Palmeiras – BA, por exemplo, as três sequências estão restritas às mesmas regiões dos mesmos cromossomos, já em *P. centralis*, a sonda PcP173PstI hibridou nos centrômeros dos pares 3 e 10, mas as sondas PcP190EcoRI e PcP883EcoRI além de hibridarem nesses cromossomos, também hibridaram nos pares 1, 2, 4, 5 e 8. Esses resultados não nos permitiram inferir se as três sequências fazem parte de um mesmo monômero de DNA repetitivo, ou se estão em blocos adjacentes no cromossomo. Contudo, o padrão obtido com as sondas PcP173PstI, PcP190EcoRI e PcP883EcoRI poderia ser comparado à interessante dinâmica evolutiva do DNA satélite pBuM em *Drosophila*. Algumas espécies desse gênero possuem esse DNA satélite disperso no genoma sob diferentes formas, existindo uma porção de DNA satélite α , uma porção β e outra com as duas porções intercaladas, α/β , sugerindo que a origem desse último seja decorrente da amplificação da região que faz a transição desses dois satélites, o monômero α terminal

junto ao monômero β inicial (Kuhn e Sene 2005; Kuhn *et al.*, 2008). Mecanismo semelhante poderia explicar padrão obtido no presente trabalho.

Fry e Salser (1977) propuseram a hipótese de “biblioteca de DNAs satélites”, em que grande número de cópias de uma sequência satélite estaria presente em uma espécie, já outra sequência estaria em baixo número, e em períodos evolucionários essas sequências passariam por eventos que as levariam a uma oscilação quantitativa de ganho e perda de sequências. Ainda nesse modelo, considerando o possível papel dessas sequências no emparelhamento de cromossomos na meiose, os autores discutem que as diferenças causadas por essas oscilações poderiam levar ao isolamento de alguns grupos de indivíduos, pois o cruzamento entre indivíduos com padrões muito distintos de DNA satélite seria desfavorecido. Esse seria, então, um primeiro passo para a especiação simpátrica.

Essa possível implicação da ocorrência de sequências de DNA satélite em eventos de especiação torna o estudo aqui iniciado ainda mais interessante. Já que diferenças interespecíficas e também intra-específicas puderam ser notadas em relação a algumas sequências de DNA repetitivo, é provável que um estudo envolvendo outras espécies do gênero *Physalaemus* ainda revele interessantes características evolutivas das sequências repetitivas desses anuros. Da mesma forma, a compreensão do arranjo molecular das sequências PcP174PstI PcP190EcoRI e PcP883EcoRI no genoma das espécies aqui estudadas ainda é necessária para um melhor entendimento da natureza dessas sequências.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Jonas José Vittorazzi pelo apoio no trabalho de campo. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Programa de Excelência Acadêmica (PROEX), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; processo 620163/2008-9), pelo suporte financeiro; ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA; processo 02010.002895/03-84) pela licença para coleta dos animais.

Referências

- ABEL, L.D.S., MANTOVANI, M. & MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Gen Mol Biol*, 29: 448-452, 2006.
- ACOSTA, M.J., MARCHAL, J.A. & MARTINEZ, S. Characterization of the satellite DNA Msat-160 from the species *Chionomys nivalis* (Rodentia, Arvicolinae). *Genetica*, 130: 43-51, 2007.
- AMARAL, M.J.L.V., CARDOSO, A.J., RECCO-PIMENTEL, S.M. Cytogenetic analysis of three *Physalaemus* species (Amphibia, Anura). *Caryologia* 53:283-288, 2000.
- BACHMANN, L. & SPERLICH D. Gradual evolution of a satellite DNA family in *Drosophila ambigua*, *D. tristis*, and *D. obscura*. *Mol. Biol. Evol.*, 10: 647-659, 1993.
- BARRÁGAN, M.J.L., MARTINEZ, S., MARCHAL, J.A., Bullejos, M., De La Guardia, R.D. & Sánchez, B.A. Highly repeated DNA sequences in three species of the genus *Pteropus* (Megachiroptera, Mammalia). *Heredity*, 88: 366-370, 2002.

- BARRIO, A. El género *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) en la Argentina. *Physis*, v.25. p.421 – 448, 1965.
- BARSACCHI, G & GALL, J. Chromosomal localization of repetitive DNA in the newt *Triturus*. *J. Cell Biol.*, 54: 580-591, 1972.
- BEÇAK, M.L., DENARO, L. & BEÇAK, W. Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics*, 9: 225-238, 1970.
- CANAPA, A., CERIONI, N.P., BARUCCA, M., OLMO, E. & CAPUTO, V. A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. *Chrom. Res.*, 10: 297-304, 2002
- CHARLESWORTH, B., SNIEGOWSKI P. & STEPHAN W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220, 1994.
- DE LUCCA, E.J., JIM, J. & FORESTI, F. Chromosomal studies in twelve species of Leptodactylidae and one Brachycephalidae. *Caryologia*, 27: 183-191, 1974.
- DENARO, L. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. *J. Herpetol.*, 6: 71-74, 1972.
- DOVER, G.A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*, 299: 111-117, 1982.
- DOVER, G.A. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet*, 122: 159–165, 1986.
- FERNÁNDEZ, R., BARRAGÁN, M.J.L., BULLEJOS, M., MARCHAL, J.A., MARTÍNEZ, S., GUARDIAS, R.D.D.L. & SÁNCHEZ, A. Molecular and cytogenetic characterization of highly repeated DNA sequences in the vole *Microtus cabreræ*. *Heredity*, 87: 637–646, 2001.

- FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 5.3 (12 February, 2009). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA, 2009.
- FRY, K. & SALSER, W. Nucleotide sequences of HS- α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell*, 12: 1069-1084, 1977.
- KING, M. & ROFE, R. Karyotypic variation in the Australian gecko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma*, 54: 75-87, 1976..
- KUHN, G.C.S. & SENE, F.M.. Evolutionary turnover of two pBuM satellite DNA subfamilies in the *Drosophila buzzatii* species cluster (*repleta* group): from alpha to alpha/beta arrays. *Gene*, 349: 77-85, 2005.
- KUHN, G.C.S., SENE, F. M., MOREIRA-FILHO, O., SCHWARZACHER, T. & HESLOP-HARRISON, J. S. Sequence analysis, chromosomal distribution and long-range organization show that rapid turnover of new and old pBuM satellite DNA repeats leads to different patterns of variation in seven species of the *Drosophila buzzatii* cluster. *Chrom. Res.*, 16: 307-324, 2008.
- MARTINS, C., FERREIRA, I.A., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. & GALETTI, P.M.G. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica*, 127: 133-141, 2006.
- MARTINSEN, L., VENANZETTI, F., JOHNSEN, A., SBORDONI, V., & BACHMANN, L. Molecular evolution of the pDo500 satellite DNA family in *Dolichopoda cave* crickets (Rhaphidophoridae). *BMC Evol. Biol.*, 9: 301-314, 2009.

- MESTROVIC, N, PLOHL, M, MRAVINAC, B & UGARKOVIC, D. Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus* - experimental evidence for the "library" hypothesis. *Mol. Biol. Evol.*, 15: 1062–1068, 1998.
- NASCIMENTO, B.N., CARAMASHI, U. & CRUZ, C.A.G. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-De-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arq. Museu Nac. do Rio de Janeiro*, 63: 297-320, 2005.
- PETROVIC, V., PÉREZ-GARCÍA C., PASANTES J.J., ŠATOVIĆ E., PRATS E. & PLOHL, M. A GC-rich satellite DNA and karyology of the bivalve mollusk *Donax trunculus*: a dominance of GC-rich heterochromatin. *Cytogen. Gen. Res.*, 124: 63-71, 2009.
- PICARIELLO, O., FELICIELLO, I., BELLINELLO, R. & CHINALI, G. S1 satellite as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. *Genome*, 45: 63-70, 2002.
- QUINDERÉ, Y.R.S.D. Citogenética de populações e espécies de *Physalaemus* do grupo "cuvieri" (Anura, Leiperidae). Tese (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- QUINDERÉ, Y.R.S.D., LOURENÇO, L.B., ANDRADE, G.V., TOMATIS, C., BALDO, D. & RECCO-PIMENTEL, S.M. Additional cytogenetics analyses of the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on NOR variability. *Biol. Res.*, 42: 79-92, 2009.
- ROULEUX-BONNIN, F., RENAULT, S., BIGOT, Y & PERIQUET, G. Transcription of four satellite DNA subfamilies in *Diprion pini* (Hymenoptera, Symphyta, Diprionidae). *Eur. J. Biochem*, 238: 752-759, 1996.

- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-388, 1978.
- SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F.B. & KASAHARA, S. Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. *Hereditas*, 131: 135-141, 1999.
- SINGER, M.F. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. of Cytology*, 76: 67-112, 1982.
- SLAMOVITS H.C. & ROSSI, M.S. Satellite DNA: agent of chromosomal evolution in mammals. *Mastozool. Neotrop.*, 9: 297-308, 2002.
- UGARKOVIC, D. & PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles – causes and effects. *EMBO J.*, 21: 5955-5959, 2002.
- VIEGAS-PEQUIGNOT, E. *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson, D. (ed). *In situ* hybridization: a practical approach. Oxford University Press-IRL Press, Oxford, pp.137-158, 1992.

Tab. 1. Localização geográfica, número de identificação no museu, sexo e número amostral das espécies estudadas. ZUEC – Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

<i>Espécie</i>	<i>Localidade</i>	<i>Nº de animais</i>	<i>Registro no Museu</i>
<i>P. cuvieri</i>	Palmeiras – BA	4♂ e 1♀	ZUEC13670 - 13674
	Urbano Santos – MA	1♂ e 1♀	ZUEC11962 e 11963
	Porto Nacional – TO	4♂ e 4 ind.	ZUEC14691-14694, 14699, 14702
<i>P. albonotatus</i>	Lambari D´Oeste – MT	2♂	ZUEC16418 e 16419
<i>P. centralis</i>	Palestina – SP	3♂	ZUEC13692 e 13689

Legendas e figuras

Fig. 1. Localização geográfica das populações analisadas. Populações de *P. cuvieri* de Urbano Santos – MA (a), Palmeiras – BA (b) e Porto Nacional – TO (c); *P. albonotatus* de Lambari D´Oeste – MT (d); e *P. centralis* de Palestina – SP (e).

Fig. 2. Sequências dos DNA repetitivos PcP174PstI (a), PcP190EcoRI (b) e PcP883EcoRI (c).

Fig. 3. Hibridação *in situ* das sequências de DNA repetitivo nos cromossomos da população de *P. cuvieri* de Palmeiras – BA (a-c), de Porto Nacional – TO (d-f) e de Urbano Santos – MA (g-i); população de *P. albonotatus* de Lambari D´Oeste – MT (j-l); e de *P. centralis* de Palestina – SP (m-o). Em a, d, g, j, m: cariótipos hibridados com a sonda PcP174PstI; em b, e, h, k, n: com a sonda PcP190EcoRI; e em c, f, i, l e o: com a sonda PcP883EcoRI. Setas indicam as regiões de NOR detectadas por Quinderé (2007) e Quinderé *et al* (2009). Barra = 5 µm.



Fig. 01

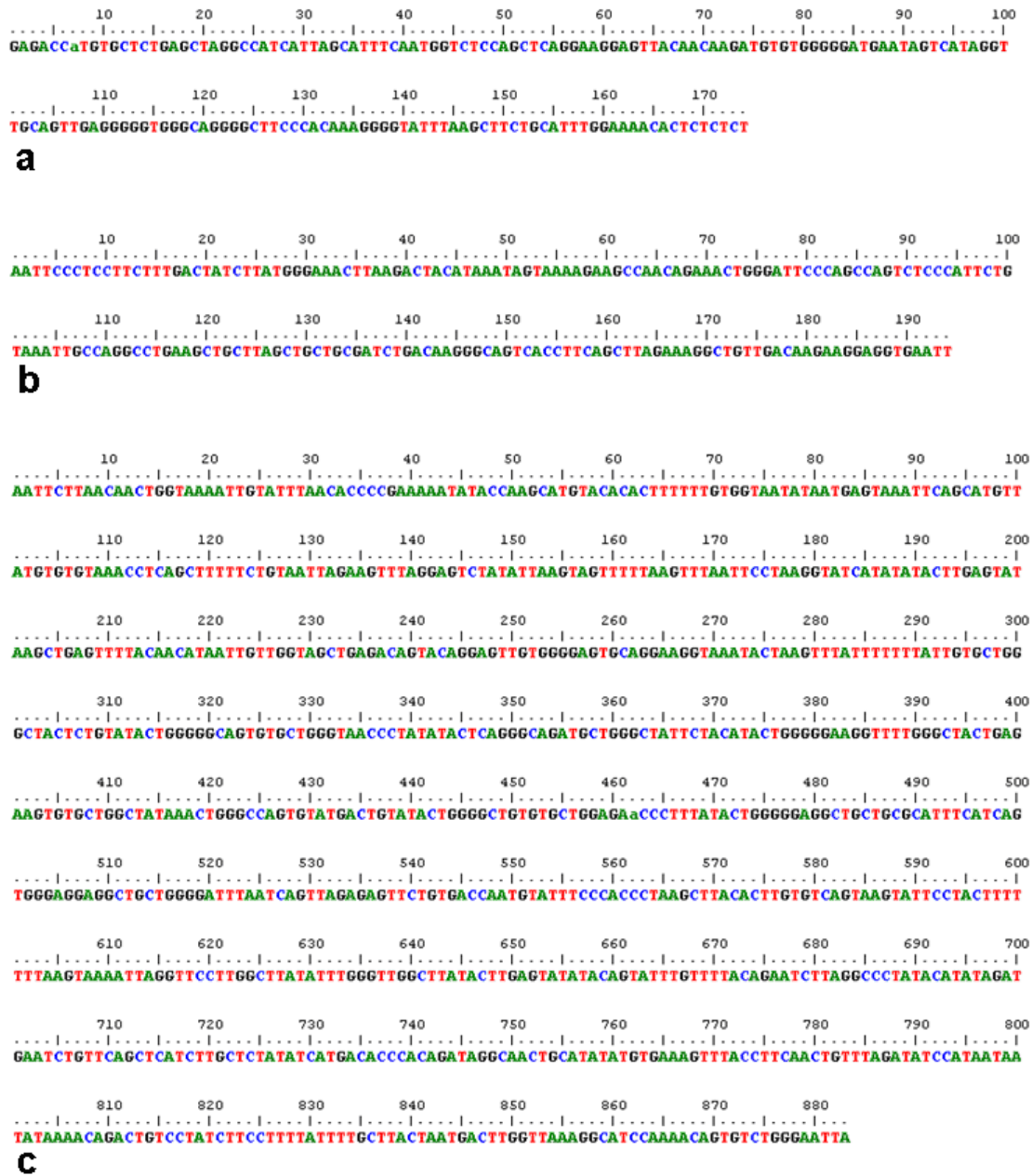


Fig. 02

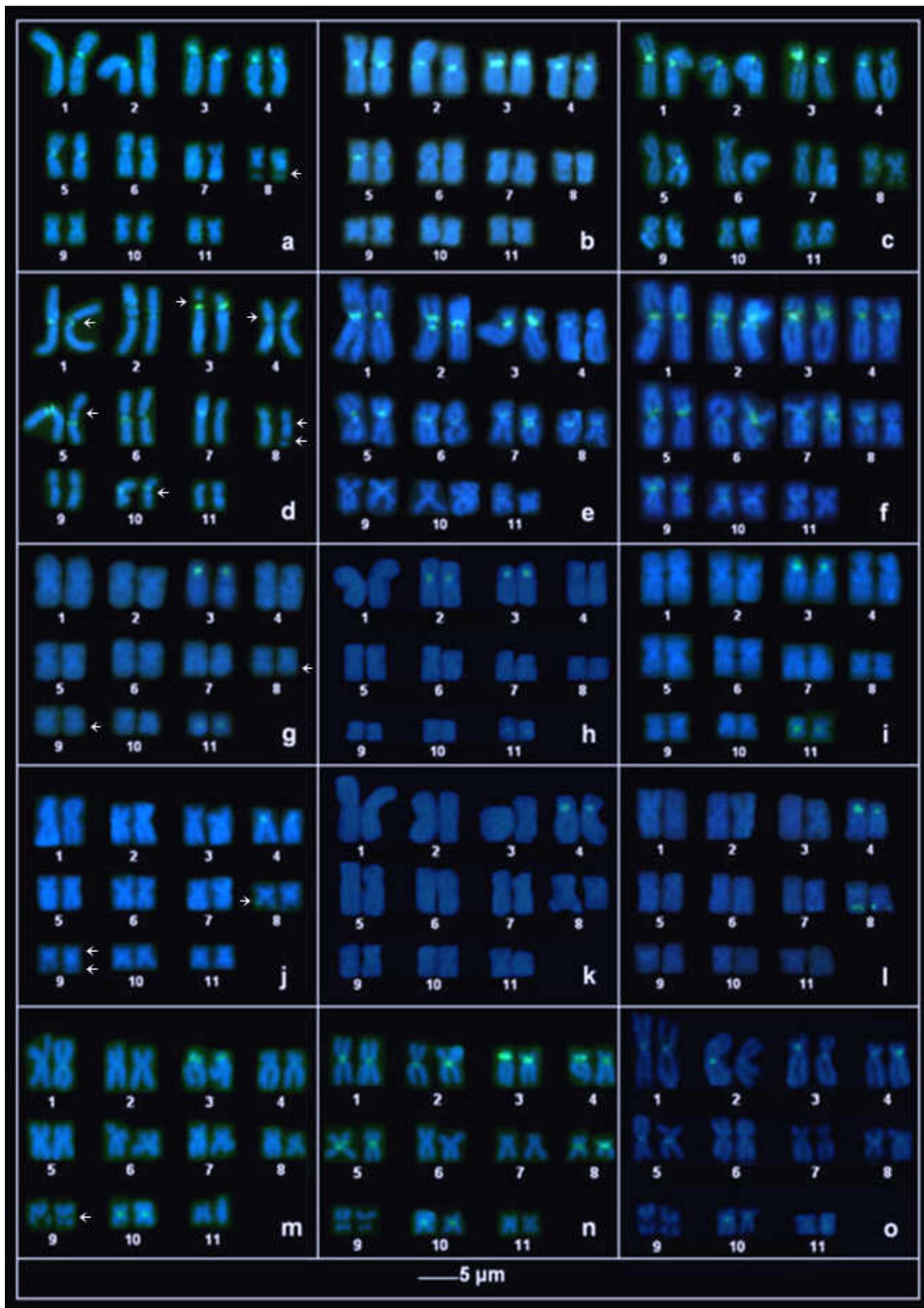


Fig. 03

VI. CONCLUSÕES

- As três sequências de DNA repetitivo isoladas nessa pesquisa, PcP174PstI, PcP190EcoRI e PcP883EcoRI, estão presentes no genoma de *P. cuvieri*, *P. albonotatus* e *P. centralis* indicando que essas sequências originaram-se antes da divergência dessas espécies.
- A presença dos três DNA repetitivos no genoma das três espécies de *Physalaemus* aqui estudadas indica um caráter evolutivo conservado dessas sequências nessas espécies.
- Foram verificadas diferenças quanto à localização cromossômica das três sequências repetitivas nas espécies desse estudo, o que pode ter sido um dos fatores que contribuíram para a diferenciação específica desses organismos.
- As diferenças cromossômicas em relação à localização das sequências repetitivas entre as três populações de *P. cuvieri* corroboram a existência de variações interpopulacionais nesse táxon que pode inclusive consistir em um complexo de espécies crípticas.
- O genoma de *Physalaemus cuvieri* é constituído de duas formas de DNAr 5S, o tipo I com 201 pares de bases, localizado no cromossomo 3, e o tipo II com aproximadamente 680 pares de bases, localizado no cromossomo 5. A análise da

sequência de bases do mostrou características similares aos genes ribossomais 5S de outras espécies.

- O DNA satélite denominado PcP190EcoRI, presente nas três espécies estudadas, possui localização cromossômica centromérica coincidente ao DNAr 5S tipo I e cerca de 70% similaridade na sequência de bases, sugerindo uma possível origem por duplicação a partir desse DNAr.
- A localização do PcP174PstI, PcP190EcoRI e do PcP883EcoRI em diferentes sítios cromossômicos nos cariótipos de *P. cuvieri*, *P. albonotatus* e *P. centralis* mostra que rearranjos cromossômicos atuaram na dispersão dessas sequências logo após sua origem.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada "ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE DNA REPETITIVO DE *Physalaemus cuvieri* e LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DO GRUPO "cuvieri" DE *Physalaemus* (AMPHIBIA, ANURA, LEIUPERIDAE)":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*: CIBIO - Biossegurança, sob Protocolo(s) nº 2005/03.

* Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Stenio Eder Vittorazzi

Aluno(a):

smkeccofimentel

Orientador(a):

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Helena Coutinho F. de Oliveira

Nome:

Função:

Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP