

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**DNA RIBOSSOMAL 5S: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA,
ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E POTENCIAL COMO
BIOMARCADOR PARA ANÁLISES MOLECULARES EM
ESPÉCIES DE TUBARÕES**

DANILLO PINHAL

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de PG em
Biologia Geral e Aplicada.**

BOTUCATU - SP

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**DNA RIBOSSOMAL 5S: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA,
ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E POTENCIAL COMO
BIOMARCADOR PARA ANÁLISES MOLECULARES EM
ESPÉCIES DE TUBARÕES**

DANILLO PINHAL

ORIENTADOR: PROF. DR. CESAR MARTINS

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. OTTO BISMARCK FAZZANO
GADIG**

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de PG em
Biologia Geral e Aplicada**

BOTUCATU - SP

2007

*Aos meus pais José Luiz e Alzira
por todo amor, carinho e confiança
que em mim depositam e por todo
esforço que sempre fizeram e fazem
pela minha formação e bem estar.*

Amo vocês.

A Deus, por todas as maravilhas que faz em minha vida.

Aos meus avós Geraldo e Alzira pelo carinho e exemplo de vida, sempre.

À minha irmã Mariane, pelo carinho, incentivo e apoio constantes.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Cesar Martins, por seu profissionalismo e caráter, pela confiança depositada desde o início, pelos ensinamentos valiosos e por tudo que a oportunidade concedida me possibilitou realizar.

À querida Flávia, pelo carinho, paciência e apoio incondicional sempre me dado. Te amo muito.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Otto Bismarck Fazzano Gadig, pela amizade, auxílio e pela chance de aprender mais sobre tubarões.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

À Profa. Dra. Adriane Wasko pela colaboração, auxílio freqüente e pelas valiosas contribuições na revisão dos manuscritos constituintes desta dissertação.

Aos Profs. Drs. Cláudio Oliveira e Fausto Foresti pelos constantes esclarecimentos, sugestões e incentivo.

À Fapesp pelo auxílio financeiro (processo 05/51246-3) que possibilitou a execução deste trabalho.

Aos grandes companheiros: Konrado, Domingos e Renato Devidé, pela ajuda, histórias, conselhos e muitas risadas durante nossas "expedições" ao campo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes: Andréia Poletto, Carlos, Daniela, Kelly, Juliana, Konrado, Irani, Guilherme (Cabelo), Andréia Alves, Tatiane, Marcio, Alex, Kátia, Fernanda Alves, Juliano (Koala), Gleisy, Tatiana, Lessandra, Peterson, Jefferson, Fábio,

Guilherme, Prof. Celso, Wellcy, Patrícia, Lígia, Waldo, Karina, Luciana, Marina, Marisa, Luis, Emanuel, Ricardo, Gustavo, Marlon e Herald.

Aos amigos Carlos Araki e Daniela Ferreira, por terem sido meu "braço direito" em muitos momentos, ao longo da etapa experimental.

À Irani e Kelly Abe, pela amizade e apoio no laboratório.

Aos amigos Robson, Paulo, Justulin, Francis, Raquel, Fernanda Losi, Dezinho, Rafael e Marcos. Viva a noiteeeee!!!

À "tia" Kelly, pela amizade e pelas incontáveis e impagáveis caronas.

Aos companheiros da República Bartira: Adriano, Caíque, Osni, Renato, Sílvio e "anexos", por todos os momentos memoráveis que passamos juntos.

Aos funcionários da pós-graduação Luciene, Maria Helena e Serginho, pela amizade, paciência, muitos esclarecimentos e prontidão em todas as solicitações.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Morfologia.

Ao Mario Dreux do Instituto de Pesca de Santos pela doação de vários exemplares e ao Dr. Ernesto Ron pelo auxílio na coleta de exemplares.

Ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, ao Departamento de Morfologia, à Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, ao Instituto de Biociências de Botucatu e à Universidade Estadual Paulista, pela estrutura cedida para a realização deste trabalho.

Ao Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista, São Vicente, por ceder as instalações para triagem das amostras.

À comunidade de pesca artesanal da Praia dos Pescadores, Itanhaém-SP pelo apoio.

Aos companheiros da banda Johnny Walker: João Paulo (leitão), Cris, Cassiano, João Paulo (grilo) e Robson, por todos os acordes afinados e desafinados tocados.

Aos demais colaboradores em todo Brasil que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Se os tubarões fossem homens

"Se os tubarões fossem homens, eles seriam mais gentis com os peixes pequenos. Se os tubarões fossem homens, eles fariam construir resistentes caixas do mar, para os peixes pequenos com todos os tipos de alimentos dentro, tanto vegetais, quanto animais. Eles cuidariam para que as caixas tivessem água sempre renovada e adotariam todas as providências sanitárias cabíveis se, por exemplo, um peixinho ferisse a barbatana, imediatamente ele faria uma atadura a fim de que não morressem antes do tempo. Para que os peixinhos não ficassem tristonhos, eles dariam cá e lá uma festa aquática, pois os peixes alegres têm gosto melhor que os tristonhos.

Naturalmente também haveria escolas nas grandes caixas, nessas aulas os peixinhos aprenderiam como nadar para a guelra dos tubarões. Eles aprenderiam, por exemplo, a usar a geografia, a fim de encontrar os grandes tubarões, deitados preguiçosamente por aí. Aula principal seria naturalmente a formação moral dos peixinhos. Eles seriam ensinados de que o ato mais grandioso e mais belo é o sacrifício alegre de um peixinho, e que todos eles deveriam acreditar nos tubarões, sobretudo quando esses dizem que velam pelo belo futuro dos peixinhos. Se inculcaria nos peixinhos que esse futuro só estaria garantido se aprendessem a obediência. Antes de tudo os peixinhos deveriam guardar-se antes de qualquer inclinação baixa, materialista, egoísta e marxista. E denunciaria imediatamente os tubarões se qualquer deles manifestasse essas inclinações.

Se os tubarões fossem homens, eles naturalmente fariam guerra entre si a fim de conquistar caixas de peixes e peixinhos estrangeiros. As guerras seriam conduzidas pelos seus próprios peixinhos. Eles ensinariam os peixinhos que, entre os peixinhos e outros tubarões existem gigantescas diferenças. Eles anunciariam que os peixinhos são reconhecidamente mudos e calam nas mais diferentes línguas, sendo assim impossível que entendam um ao outro. Cada peixinho que na guerra matasse alguns peixinhos inimigos, da outra língua silenciosos, seria condecorado com uma pequena ordem das algas e receberia o título de herói.

Se os tubarões fossem homens, haveria entre eles naturalmente também uma arte, haveria belos quadros, nos quais os dentes dos tubarões seriam pintados em vistosas cores e suas guelras seriam representadas como inocentes parques de recreio, nas quais se poderia brincar magnificamente. Os teatros do fundo do mar mostrariam como os valorosos peixinhos nadam entusiasmados para as guelras dos tubarões. A música seria tão bela, tão bela, que os peixinhos sob seus acordes e a orquestra na frente, entrariam em massa para as guelras dos tubarões, sonhadores e possuídos pelos mais agradáveis pensamentos. Também haveria uma religião ali.

Se os tubarões fossem homens, eles ensinariam essa religião. E só na barriga dos tubarões é que começaria verdadeiramente a vida. Ademais, se os tubarões fossem homens, também acabaria a igualdade que hoje existe entre os peixinhos, alguns deles obteriam cargos e seriam postos acima dos outros. Os que fossem um pouquinho maiores poderiam

inclusive comer os menores, isso só seria agradável aos tubarões, pois eles mesmos obteriam assim mais constantemente maiores bocados para devorar. E os peixinhos maiores que deteriam os cargos valeriam pela ordem entre os peixinhos para que estes chegassem a ser professores, oficiais, engenheiros da construção de caixas e assim por diante. Em resumo, só então haveria civilização no mar, se os tubarões fossem homens”

Bertold Brecht

SUMÁRIO

	página
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	
1.1. <i>Introdução geral</i>	1
1.2. <i>Objetivos</i>	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. <i>Genômica de peixes</i>	4
2.1.2. <i>Estudos genômicos em Chondrichthyes</i>	5
2.1.3. <i>Marcadores moleculares aplicados à identificação de espécies</i>	6
2.2. <i>O DNA ribossomal 5S</i>	7
2.3. <i>Os tubarões como modelo de estudo: aspectos biológicos e da pesca</i>	9
2.4. <i>Espécies estudadas</i>	10
2.4.1. <i>Os tubarões do gênero Rhizoprionodon</i>	10
2.4.2. <i>Outras espécies</i>	12
2.5. <i>Referências Bibliográficas</i>	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. <i>Material</i>	20
3.2. <i>Métodos</i>	20
3.2.1. <i>Extração de DNA de tecidos</i>	20
3.2.2. <i>Amplificação do DNAr 5S por PCR</i>	21
3.2.3. <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	22
3.2.4. <i>Purificação de DNA</i>	23
3.2.5. <i>Clonagem de fragmentos de DNA</i>	24
3.2.6. <i>PCR para confirmação de presença de insertos</i>	25
3.2.7. <i>Sequenciamento do DNA</i>	25
3.2.8. <i>Análise das seqüências</i>	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	

4.1. <i>Manuscrito I</i>	28
4.2. <i>Manuscrito II</i>	40
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS	62
6. CONCLUSÕES	63
7. APÊNDICES	
<i>AP-I</i>	64
<i>AP-II</i>	66
<i>AP-III</i>	67
8. ANEXOS	
<i>AN-1</i>	71

RESUMO

Nos eucariotos superiores, o DNA ribossomal 5S (DNAr 5S) está organizado em unidades repetidas em tandem, cada qual formada por uma região codificante, altamente conservada, e por uma seqüência espaçadora não transcrita (NTS) bastante variável. Esse arranjo faz do DNAr 5S uma excelente ferramenta para a compreensão da evolução das famílias multigênicas e um promissor marcador molecular. Embora o DNAr 5S venha sendo investigado em diversos vertebrados, incluindo peixes teleósteos, são escassas as informações acerca dos peixes cartilagosos, sobretudo dos tubarões. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial do DNAr 5S como marcador molecular para discriminação de várias espécies de tubarões da costa brasileira bem como a organização estrutural e dinâmica evolutiva destas seqüências nos tubarões *Rhizoprionodon lalandii* e *Rhizoprionodon porosus*. A amplificação por PCR do DNAr 5S produziu padrões de bandas distintos em gel de agarose, representados por tamanhos de fragmentos variados, que permitiram a discriminação das espécies *Alopias superciliosus*, *Isurus oxyrinchus*, *Galeocerdo cuvier*, *Sphyrna lewini*, *Carcharhinus acronotus*, *C. leucas*, *C. limbatus* e *C. obscurus*. Pela primeira vez, uma metodologia baseada unicamente em PCR e eletroforese em gel de agarose foi suficiente para discriminar várias espécies de tubarões. Os resultados obtidos para *R. lalandii* e *R. porosus* evidenciaram a presença de duas classes do DNAr 5S de tamanho variável nesses animais: uma maior denominada classe I de ~465 pares de bases (pb) e outra menor denominada classe II de ~185 pb, as quais exibiram seqüências codificantes e espaçadoras distintas. Através de análises comparativas do gene RNAr 5S dos tubarões com seqüências de vários grupos de vertebrados foi verificado que a classe II nos tubarões representa a estrutura ancestral amplamente difundida no genoma dos Chondrichthyes e Osteichthyes. Por outro lado, a classe I apresentou características restritas aos elasmobrânquios, grupo que se encontra na base evolutiva dos vertebrados. Portanto, concluímos que o DNAr 5S representa um marcador em potencial para a discriminação de espécies de tubarões bem como possui considerável valor no esclarecimento da complexa história evolutiva dos vertebrados.

Palavras chave: DNA ribossomal 5S; *Rhizoprionodon*; tubarões; evolução molecular; identificação de espécies; conservação; elasmobrânquios.

ABSTRACT

In higher eukaryotes, the 5S-rRNA multigene family is arranged in large tandemly repeat elements, every one formed by a highly conserved ~120 base pairs (bp) coding region separated by a nontranscribed spacer region (NTS) of variable size and composition. The 5S ribosomal head-to-tail array, make them an excellent tool for the comprehension of the multigene families evolution and a good candidate as molecular marker. Although the 5S rDNA features have been investigated in several vertebrates, including bony fishes, informations regarding cartilaginous fishes, particularly on sharks, are extremely scarce. The aim of the present work was to evaluate the applicability of 5S rDNA repeats as molecular markers for the discrimination of several shark species living in Brazilian coast plus the structural organization and evolutive dynamic in the sharks *Rhizoprionodon lalandii* and *Rhizoprionodon porosus*. The PCR amplification of 5S rDNA repeats generated distincts band patterns in agarose gel that allowed the unequivocally discrimination of the species *Alopias superciliosus*, *Isurus oxyrinchus*, *Galeocerdo cuvier*, *Sphyrna lewini*, *Carcharhinus acronotus*, *C. leucas*, *C. limbatus* and *C. obscurus*. The achieved data evidenced for the first time that a simple PCR routine procedure is able to discriminate elasmobranches species. Our data for *Rhizoprionodon* sharks have shown that these species exhibited two-size classes of 5S rRNA genes: a large-one (named class I) composed of ~465 bp repeats and a short-repeat class (named class II) arrayed in ~185 bp units. These classes were differentiated by several base substitutions in the 5S rRNA coding region and completely distinct NTS regions. By comparative analyses of sharks 5S rRNA genes with those bony fishes and other vertebrates was verified that the class II is the ancestor structure widely spread in the Chondrichthyes and Osteichthyes genome. Conversely, the class I showed typical features on elasmobranches, that are the most basal living jawed vertebrates. Hence we concluded that the 5S rDNA represent a potential marker for the discrimination of related shark species and also an important source for the comprehension of the complex evolutive history of vertebrates.

Key words: 5S rDNA, *Rhizoprionodon*, sharks, molecular evolution, genetic identification, conservation, elasmobranchii.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

Apesar de ampla distribuição mundial, crescente apelo conservacionista e grande fascínio exercido sobre os homens, pouco se conhece acerca dos aspectos genéticos dentro da biologia e história de vida dos tubarões. Nos poucos dados biológicos existentes sobre esses animais, a genética aparece em estudos que privilegiam a caracterização cromossômica e a composição de bases do DNA ou como ciência auxiliar, via aplicação de ferramentas da biologia molecular. A importância dos estudos sobre os tubarões reside no fato de que estes animais são elementos tróficos de destaque no ecossistema marinho, com a grande maioria desempenhando papel central como predadores do ápice da cadeia alimentar. Adicionalmente representam valiosa fonte de produtos e subprodutos para o consumo humano direto e indireto. Outro aspecto refere-se à sua longa história de vida, com mais de 450 milhões de anos de existência, o que os torna uma grande reserva do patrimônio genético e valiosa fonte de informação relativa à evolução do genoma nos vertebrados.

No genoma dos eucariotos superiores, há uma região nuclear de dinâmica evolutiva particular conhecida como DNA ribossomal 5S (DNAr 5S), onde estão contidas múltiplas cópias dos genes que codificam o RNA ribossomal 5S (RNAr 5S), molécula constituinte da estrutura dos ribossomos. Estas cópias estão frequentemente agrupadas em longas unidades repetitivas organizadas em *tandem*, compostas não somente por uma região codificante do RNAr 5S, altamente conservada, mas também por uma seqüência espaçadora não transcrita (NTS, do inglês *non-transcribed spacer*) bastante variável. O arranjo repetitivo dos genes de RNAr 5S e de seus NTSs favorece acentuadas mudanças no genoma, produzindo polimorfismos facilmente observados entre espécies relacionadas e entre indivíduos de uma mesma espécie. Isso faz dessas seqüências, excelentes ferramentas para análises das relações evolutivas entre os diversos grupos de vertebrados, bem como potenciais marcadores moleculares espécie-específicos. Embora a seqüência nucleotídica e a organização genômica das repetições do DNAr 5S venham sendo investigadas em diversos vertebrados, incluindo peixes teleosteos, a estrutura organizacional, a dinâmica evolutiva e o potencial desse segmento do genoma como marcador genético ainda são pouco conhecidos em elasmobrânquios, particularmente nos tubarões.

Atualmente o uso de marcadores moleculares tem se mostrado extremamente eficiente no diagnóstico de espécies de tubarões, impossíveis de serem identificadas quando à venda em mercados. Isso em função do diagnóstico molecular ser realizado a partir de uma pequena

quantidade de DNA que pode ser obtido a partir de pequenos segmentos de tecidos refrigerados, congelados, secos, carcaças e etc. No entanto, a maior parte das formas de identificação de espécies de elasmobrânquios através de marcadores moleculares utiliza procedimentos relativamente caros (quase sempre envolvem sequenciamento de DNA) e que consomem muito tempo para sua realização. Com o intuito de aprimorar formas alternativas, de baixo custo e eficientes para identificar espécies de elasmobrânquios, foi proposta uma metodologia simples, rápida e de baixo custo utilizando apenas produtos de PCR do DNA ribossomal 5S para discriminação de espécies de tubarões. Os resultados compõem o **MANUSCRITO I** da presente dissertação.

Além disso, a estrutura genômica do DNAr 5S foi investigada em duas espécies de tubarões do gênero *Rhizoprionodon*. Esta abordagem é apresentada no **MANUSCRITO II**, no qual são discutidas as características organizacionais e evolutivas do DNAr 5S e suas relações com os padrões observados em outros elasmobrânquios, peixes teleósteos e vários grupos de vertebrados. A estrutura do DNAr 5S nos tubarões representa um bom exemplo da complexa organização dessas seqüências repetitivas no genoma dos peixes.

No **MANUSCRITO II** são discutidas as características organizacionais e evolutivas do DNAr 5S em duas espécies de tubarões do gênero *Rhizoprionodon*, e suas relações com os padrões observados em outros elasmobrânquios, peixes teleósteos e vários grupos de vertebrados. A estrutura do DNAr 5S nos tubarões representa um bom exemplo da complexa organização dessas seqüências repetitivas no genoma dos peixes de um modo geral.

1.2. Objetivos

Devido à sua natureza repetitiva e aos padrões particulares que governam a evolução da família multigênica do RNAr 5S, estudos envolvendo este segmento de DNA representam uma fonte interessante para a compreensão da dinâmica evolutiva do genoma e também para a identificação de marcadores moleculares valiosos à conservação genética. Além disso, existem poucas informações disponíveis sobre o DNAr 5S em elasmobrânquios, particularmente sobre tubarões, fato que norteou a definição das espécies estudadas.

Diante disto foram definidos os seguintes objetivos:

- 1) Verificar a potencialidade do DNAr 5S como marcador molecular para identificação de espécies de tubarões capturados pela pesca e assim contribuir para o adequado manejo e conservação dos tubarões da costa brasileira;
- 2) Isolar, seqüenciar e determinar a organização genômica das repetições do DNAr 5S dos tubarões *Rhizoprionodon lalandii* e *Rhizoprionodon porosus*;

3) Realizar análises comparativas do gene RNAr 5S de peixes teleósteos, elasmobrânquios e dos principais grupos de vertebrados

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Genômica de peixes

Em geral, pouco se conhece a respeito da organização genômica dos peixes. A grande característica do genoma dos peixes em relação aos vertebrados de sangue quente está na compartimentalização genômica presente nestes últimos e ausente nos peixes. As espécies de sangue quente apresentam o seu genoma organizado em mosaicos isocóricos, ou seja, segmentos de DNA caracterizados por uma composição de bases similares (Bernardi, 1992). Genes constitutivos e estruturais, por exemplo, encontram-se alocados em isocores específicos. Enquanto dadas famílias isocóricas são ricas em conteúdo GC, outras são pobres na presença destas bases. Nos peixes, anfíbios e répteis, não se observa tal compartimentalização composicional. Dessa forma, o genoma dos peixes apresenta padrões particulares de organização e entender o seu genoma pode trazer contribuições e respostas a uma miríade de questões que norteiam o entendimento da origem e evolução dos vertebrados de uma forma geral.

Algumas espécies de peixes como o “zebrafish” (*Danio rerio*) e o “pufferfish” japonês (*Takifugu rubripes*) possuem a seqüência nucleotídica do seu genoma quase totalmente conhecida. Contudo estes dados pouco têm contribuído para o entendimento da organização do genoma dessas espécies como um todo. Apesar de mapas físicos detalhados dos genomas do “zebrafish” (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/zebrafish) e do “pufferfish” (Aparício et al., 2002) já se encontrarem disponíveis, estes mapas representam apenas a seqüência de bases do genoma, sendo que análises do conteúdo gênico das seqüências não foram realizadas em profundidade. Dessa forma, ainda que o sequenciamento completo de um genoma pareça fornecer muitas informações, somente a análise destas seqüências possibilitará que este genoma seja explorado de modo mais efetivo. Uma soma significativa de seqüências de ESTs (Expressed Sequence Tags) também se encontra disponível para o zebrafish (<http://zgc.nci.nih.gov/>) e para o pufferfish (<http://www.fugu-sg.org/docs/publications.html>).

Embora aparentemente exista muita informação sobre a seqüência do genoma dos peixes, a organização de genes e famílias multigênicas no genoma destes vertebrados ainda é pouco conhecida. Na sua maioria, as informações disponíveis sobre a organização genômica dos peixes referem-se particularmente à fração repetitiva de DNA no genoma e a dados relativos a estrutura cromossômica. Sequências repetitivas como SINEs (*short interspersed repetitive elements*), LINEs (*long interspersed repetitive elements*), DNAs satélites, mini e microsátélites têm sido descritas para diversas espécies de peixes (para revisão, Martins,

2006). As informações fornecidas pela fração repetitiva do genoma têm se mostrado úteis como marcadores para estudos evolutivos, populacionais, assim como para estudos da organização e evolução do genoma. Ao lado das seqüências repetitivas descritas acima se destacam também genes repetitivos que codificam RNAr, RNAt, histonas e famílias de genes duplicados como genes das globinas e actinas, por exemplo. O conhecimento da natureza organizacional dos genes duplicados representa uma ferramenta promissora na compreensão da evolução de genes, seqüências duplicadas e, conseqüentemente, do genoma como um todo. Além disso, estes estudos são promissores na identificação de marcadores de extrema valia na biologia básica e aplicada da maioria das espécies.

2.1.2. Estudos genômicos em *Chondrichthyes*

Atualmente existem poucos dados sobre a estrutura e a organização do genoma das espécies de *Chondrichthyes*, grupo formado pelos tubarões, raias e quimeras. A maioria dos estudos realizados teve como foco a análise do conteúdo e da composição do DNA das espécies. Em se tratando de tubarões, são poucos os resultados produzidos até cerca de 25 anos atrás. Apenas recentemente, com trabalhos sobre sistemática e evolução, foram geradas informações relevantes que permitiram alguma compreensão acerca da organização genômica desses animais. Ainda assim, apenas 10% das espécies de peixes cartilaginosos tiveram seu DNA estudado, o que os coloca como grupo de constituição genômica menos conhecida entre os vertebrados. Isso ocorre pelo fato da pesquisa genética sobre os peixes cartilaginosos permanecer como atividade ocasional e fragmentada (Stingo & Rocco, 2001) e por historicamente, estes animais terem um baixo interesse comercial, condição alterada somente nas últimas décadas (Lessa et al., 2005).

Os dados disponíveis a respeito do conteúdo do DNA genômico dos *Chondrichthyes* referem-se a 113 espécies: 13 *Squalomorphii*, duas *Squatinomorphii*, 36 *Galeomorphi*, 61 *Batoidea* e duas espécies de *Holocephalii* (Stingo & Rocco, 2001). Outros estudos sobre o genoma dos peixes cartilaginosos avaliaram seqüências repetitivas (Pasolini et al., 2006), a composição de bases por coloração com o fluorocromo AT específico DAPI (Stingo et al., 1989) e a densidade do DNA por gradiente em cloreto de cério (Bernardi & Bernardi, 1990).

Mais recentemente, os genomas de vários peixes cartilaginosos vêm sendo estudados por meio de avançadas técnicas moleculares. Os alvos foram frações repetitivas do DNA como microssatélites e seqüências teloméricas, identificados em várias espécies por PCR (Polymerase Chain Reaction), SINEs e LINEs identificados por FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) (Rocco et al., 1996; Shimoda et al., 1996; Ogiwara et al., 1999; Pardini et al.,

2000), além de seqüências aleatórias do genoma, obtidas de um Holocephali (Venkatesh et al., 2005).

2.1.3. Marcadores moleculares aplicados à identificação de espécies

Recentemente, vários trabalhos no mundo todo têm relatado o uso de marcadores moleculares para identificação das espécies de tubarões capturados pela pesca. Quase todos se baseiam no fato de que as diferentes espécies apresentam ampla variabilidade de características de vida de modo que para seu adequado manejo e conservação são necessárias informações biológicas e da pesca em nível espécie-específico (Heist & Gould, 1999b). Ocorre que entre as espécies de tubarões alvo da pesca existe uma natural similaridade morfológica que prejudica sua correta identificação. Além disso, há a prática de remoção pelos pescadores de partes dos animais como cabeça, cauda e nadadeiras, caracteres morfológicos chave para identificação (Shivji et al., 2002). Juntos, esses eventos trazem prejuízo para o manejo e conservação dos tubarões, pois inviabilizam a identificação dos animais capturados e a fiscalização da pesca, quando esta existe.

As pesquisas publicadas sobre o uso de técnicas moleculares para discriminação de espécies de tubarões foram predominantemente baseadas em regiões do DNA nuclear e mitocondrial ou pela associação de ambas. Pank et al. (2001), aplicaram a reação de PCR multiplex para regiões do DNA nuclear (ITS 2, *internal transcribed spacer 2*) e mitocondrial (citocromo b) na discriminação das espécies *Carcharhinus obscurus* e *C. plumbeus*. Outras seis espécies de tubarões, sendo três espécies da família Lamnidae (*Isurus oxyrinchus*, *I. paucus* e *Lamna nasus*) e três da família Carcharhinidae (*Prionace glauca*, *Carcharhinus obscurus* e *C. falciiformis*) puderam ser também discriminadas a partir dessa metodologia (Shivji et al., 2002). Abordagem semelhante foi utilizada por Chapman et al. (2003) e mais recentemente por Shivji et al. (2005) em amostras com o nome genérico de “cação”, obtidas nos mercados asiáticos. Estes dois trabalhos constataram a presença de carne e nadadeiras do tubarão-branco (*Carcharodon carcharias*) entre as espécies comercializadas, ainda que esta espécie seja protegida por lei em vários países.

Abercrombie et al. (2005) igualmente validaram regiões do DNA ribossomal nuclear e mitocondrial para identificação de três espécies de tubarões-martelo (*Sphyrna lewini*, *S. zygaena* e *S. mokarran*) confirmando sua comercialização em nível mundial. Por sua vez Clarke et al. (2006) estimaram a proporção de cada táxon dos tubarões no total de carne e nadadeiras comercializados nos mercados asiáticos, também por diagnóstico molecular.

Em outros trabalhos a reação de PCR multiplex de seqüências de DNA mitocondrial foi associada à técnica de restrição enzimática (RFLP) para gerar fragmentos espécie-específicos que possibilitaram a discriminação de várias espécies de tubarões da Costa Atlântica dos EUA e da Austrália (Heist & Gould, 1999b; Chan et al., 2003). Depois de seqüenciadas, regiões do genoma mitocondrial foram validadas por Greig et al. (2005) para discriminação de 35 espécies de tubarões do Atlântico Norte com verificação de suficiente similaridade intraespecífica e variedade interspecífica. Ward et al. (2005) sequenciaram regiões do DNA mitocondrial (citocromo oxidase subunidade 1 ou *cox 1*) de 61 espécies de tubarões e raias, e padronizaram essas regiões como marcadores para identificação de espécies.

2.2. O DNA ribossomal 5S

Duas famílias distintas de genes que codificam para RNA ribossômico podem ser encontradas nos animais: os DNAs ribossomais de grande tamanho 18S-5.8S-28S e o DNAr de pequeno tamanho, 5S. Estas seqüências gênicas estão presentes em grande número de cópias repetidas em tandem, formando famílias multigênicas no genoma. Nos organismos de uma forma geral, incluindo bactérias e fungos, os genes ribossômicos apresentam uma ampla diversidade de arranjos e associações entre si e com outras famílias multigênicas (Martins & Wasko, 2004).

Ao contrário dos outros DNAs ribossomais, o DNAr 5S não está envolvido com a formação do nucléolo. Nas famílias multigênicas de DNAr 5S, seqüências gênicas codificantes ocorrem repetitivamente em tandem e são separadas por DNA espaçador não transcrito (NTS). O arranjo repetitivo dos genes 5S, bem como de outras famílias multigênicas, favorece acentuadas mudanças no genoma, o que produz polimorfismos facilmente observados entre espécies relacionadas ou entre membros da mesma espécie (Danna et al., 1996). As regiões de DNAr 5S codificantes compreendem uma unidade altamente conservada de 120 pares de bases (pb), enquanto os NTSs apresentam-se muito heterogêneos, variando de tamanho entre as espécies (para revisão, Martins & Wasko, 2004). A região codificante do DNAr 5S é extremamente conservada mesmo entre organismos filogeneticamente distantes. As variações nos NTSs devem-se a inserções, deleções e minirepetições (Suzuki et al., 1996). Dessa forma, o DNAr 5S mostra-se como uma excelente ferramenta na compreensão da evolução de famílias multigênicas, assim como, devido à sua intensa dinâmica evolutiva, pode funcionar como marcador genético para espécies e populações. As acentuadas variações dos NTSs têm sido utilizadas no estabelecimento de

filogenias entre espécies e grupos (Joffe et al., 1995; Udovicic et al., 1995; Cronn et al., 1996; Crisp et al., 1999; Baker et al., 2000), embora o uso de análises filogenéticas baseadas em seqüências de NTSs ainda seja muito questionado.

Em plantas de interesse comercial, uma soma significativa de trabalhos aparece na literatura abordando a caracterização do DNAr 5S através de endonucleases de restrição e mapeamento da seqüência nucleotídica (Danna et al., 1996), bem como a localização cromossômica deste DNA (Fukui et al., 1994; Prado et al., 1996; Hanson et al., 1996; entre outros). Em espécies de ratos, o DNAr 5S tem sido identificado preferencialmente na região telomérica de um (Suzuki et al. 1996) ou mais cromossomos (Szabo et al. 1978) do complemento. Em humanos, o DNAr 5S apresenta locos no par cromossômico de maior tamanho (Lomholt et al. 1995), sendo que situação diferente ocorre para os outros DNAs ribossomais, que estão localizados em outros cromossomos (Verma e Babu 1995). Em diversos mamíferos, há uma tendência geral para os genes RNAr 5S estarem localizados em região terminal de um par cromossômico da espécie, o que os difere dos genes ribossomais maiores que são usualmente localizados proximalmente ao centrômero de diversos cromossomos diferentes (Suzuki et al. 1996). Trabalhos utilizando hibridação *in situ* em anfíbios têm verificado, para muitas das espécies, a existência de um único sítio com DNAr 18S+28S por lote haplóide, enquanto o DNAr 5S encontra-se, para algumas espécies, distribuído por vários cromossomos, e em outras está restrito a um único cromossomo do lote haplóide (Pardue, 1973; Vitelli et al., 1982; Schmid et al., 1987).

Avanços significativos têm sido realizados em relação à compreensão da estrutura organizacional do DNAr 5S em diversas espécies de peixes teleósteos (Martins & Wasko, 2004). Por outro lado, a organização do DNAr 5S ainda é pouco conhecida para muitos peixes, como os elasmobrânquios (subclasse que compreende os tubarões e as raias). A alternância de regiões codificantes, altamente conservadas, com regiões espaçadoras variáveis, como ocorre com os genes RNAr 5S, possibilita a utilização da técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) para amplificar seqüências desta região e portanto a obtenção do gene 5S e seus espaçadores isolados em quantidades suficientes para experimentos de clonagem, sequenciamento e análise detalhada deste DNA. Dados prévios sugerem que as seqüências de DNAr 5S podem representar marcadores genéticos de considerável valor para identificação de espécies, subespécies, populações e híbridos de peixes, especialmente espécies de interesse econômico como truta e salmão (Pendàs et al., 1995; Carrera et al., 2000). Estudos detalhados da organização e estrutura do DNAr 5S em tubarões além de

contribuírem para a compreensão da dinâmica evolutiva de tais seqüências no genoma, podem ainda apresentar aplicação em análises populacionais e de identificação de espécies no grupo.

2.3. Os tubarões como modelo de estudo: aspectos biológicos e da pesca.

Tubarões e raias compõem o grupo dos elasmobrânquios e juntamente com as quimeras formam a classe Chondrichthyes, atualmente representada por cerca de 1.100 espécies. Destas são reconhecidas como tubarões cerca de 490 espécies no mundo (Compagno, 1999) e, no Brasil, de 82 a 85 espécies (Soto, 2001). Possuem uma longa e complexa história evolutiva, que se estende por mais de 450 milhões de anos, desde o período Ordoviciano superior até os dias atuais (Compagno, 1990). Os tubarões distribuem-se em todos os mares e oceanos, em águas tropicais, subtropicais, temperadas e frias, podendo habitar regiões costeiras e oceânicas, associados a ambientes pelágicos, demersais, recifais, estuarinos e, eventualmente, em água doce (Compagno, 1990; Gruber, 1990).

Em escala global, os elasmobrânquios têm sofrido um acentuado declínio de suas populações na natureza nas últimas décadas (Kotas et al., 1995; Vooren, 1997; Musick et al., 2000; Baum et al., 2003). A falta de políticas governamentais, que regulamentem e controlem a atividade pesqueira e a ineficiência na criação de áreas de conservação prioritárias associadas ao alto valor comercial adquirido pelas nadadeiras de tubarões, utilizadas para fins gastronômicos, indústria farmacêutica e medicinal, reúnem os principais eventos responsáveis pela atual situação de risco que atinge boa parte das espécies de tubarões. Além disso, há o problema do estereótipo extremamente negativo desses animais, adquirido ao longo dos anos devido aos casos de ataques a banhistas, mergulhadores e surfistas, que contribui efetivamente para a situação de risco do grupo.

A pressão da pesca sobre os tubarões representa efetivamente a maior ameaça às populações, fato agravado pela falta de informações importantes sobre as taxas de captura e desembarque das diferentes espécies e pela escassez de dados relativos aos principais parâmetros populacionais desses animais, o que muito dificulta o manejo adequado dos estoques (Bonfil, 1994). Adicionalmente, a degradação dos ecossistemas costeiros representa outra ameaça de grande porte às muitas espécies de tubarões que utilizam essas importantes áreas como berçários (Castro, 1993). A importância dos tubarões, no entanto, é mais acentuada sob o ponto de vista trófico, já que, consumindo grande espectro de organismos, a maioria das espécies ocupa posição de destaque na cadeia alimentar dos ecossistemas marinhos, sobretudo daqueles de regiões tropicais e subtropicais (Camhi et al., 1998). Além disso, apresentam padrões biológicos que os tornam extremamente vulneráveis à ação

antrópica, tais como crescimento lento, alta longevidade, maturidade sexual tardia e baixa fecundidade relativa (Branstetter, 1990). Nesse contexto, a pesca predatória e a degradação ambiental, aliadas à condição de vida “K” estrategista dos elasmobrânquios, que neste ponto os aproxima muito mais aos mamíferos que propriamente aos peixes (ex. alguns tubarões levam em média 20 anos para atingir a maturidade sexual e geram prole reduzida), têm feito com que diversas espécies presentes ao longo da costa brasileira estejam atualmente sob ameaça de extinção (Lessa et al., 2005).

2.4. Espécies estudadas

2.4.1. Os tubarões do gênero *Rhizoprionodon*

No Manuscrito II da presente dissertação de mestrado, foram utilizadas como modelo de estudo as espécies de tubarões *Rhizoprionodon lalandii* e *R. porosus* (Carcharhiniformes: Carcharhinidae), conhecidas popularmente como cação-frango ou rabo-seco (Figura 1).

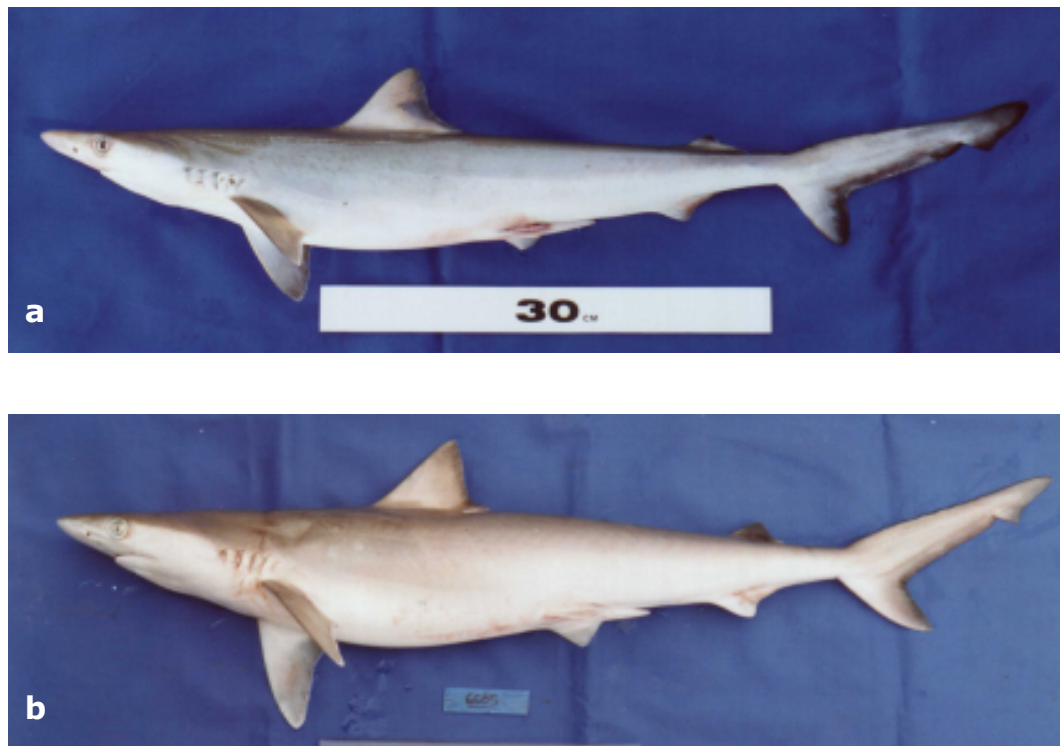


Figura 1. Exemplos das espécies de cação-frango (a) *R. lalandii* (b) *R. porosus*. Fotos: OBF Gadig.

Atualmente são conhecidas sete espécies do gênero *Rhizoprionodon*, sendo que duas ocorrem no Brasil, *R. lalandii* e *R. porosus* (Gadig, 2001). Uma terceira espécie do Atlântico Norte ocidental, *R. terraenovae*, é muito semelhante a *R. porosus*, sendo normalmente diferenciada desta pelo número de vértebras, uma vez que as chaves para identificação de *Rhizoprionodon* não apresentam caracteres morfológicos externos consistentes para separação de ambas.

Rhizoprionodon porosus possui corpo mais robusto que *R. lalandii*; focinho arredondado; distância pré-nasal de 3,3 a 4,5% do comprimento total; sulco labial superior de 1,3 a 2,3% do comprimento total; comprimento da primeira nadadeira menor que a margem anterior das nadadeiras peitorais em adultos; nadadeiras peitorais, quando comprimidas junto ao corpo, têm o seu ápice alcançando o segundo ou terceiro terços da base da primeira nadadeira dorsal, caráter mais evidente nos adultos; 24 a 25 dentes superiores, com cúspides oblíquas, destacadas da base e com bordas finamente serrilhadas em adultos, com forte chanfradura na borda comissural; dorso cinzento, normalmente mais claro, raros os tons cobre e nunca esverdeados; exemplares de médio a grande porte podem exibir pequenas pintas claras nos flancos; margem das nadadeiras dorsais e da nadadeira caudal um pouco mais escura, caráter mais evidente em neonatos e jovens; ápice da segunda nadadeira dorsal exibe mancha escura que desce até pouco acima da metade da altura dessa nadadeira, principalmente visível em animais adultos; margem posterior e ápice das nadadeiras peitorais mais claros; ventre claro; distribui-se ao longo do Atlântico ocidental, desde o sul dos EUA até Argentina; espécie costeira, habita normalmente a plataforma continental desde a superfície até cerca de 90 m de profundidade, com registros ocasionais a 500 m. Sua condição reprodutiva envolve viviparidade placentária; nascem de dois a oito filhotes por parto; alimenta-se de pequenos peixes ósseos e invertebrados, principalmente crustáceos e cefalópodos; atinge cerca de 1,2 m; machos maduros com cerca de 60 cm e fêmeas, com cerca de 70 cm; nasce entre 35 e 39 cm (Gadig, 2001).

Rhizoprionodon lalandii apresenta corpo mais esbelto que *R. porosus*; focinho mais afilado, com distância pré-nasal variando de 4,4 a 5,1% do comprimento total; o sulco labial superior varia de 1,4 a 2,1% do comprimento total; comprimento da primeira nadadeira dorsal maior que a margem anterior das nadadeiras peitorais em adultos; nadadeiras peitorais, quando comprimidas junto ao corpo, têm o seu ápice alcançando o primeiro terço anterior da base da primeira nadadeira dorsal, caráter mais evidente nos adultos; coloração do dorso é mais escura, com tons metálicos esverdeados, bronzeados ou cobre, nunca exibindo pintas, como em *R. porosus*; margem das nadadeiras dorsais e da nadadeira caudal um pouco mais

escura, caráter mais evidente em neonatos e jovens; não apresenta uma grande pinta escura na segunda dorsal que avança e desce até pouco acima da metade da altura dessa nadadeira, como em *R. porosus*; margem posterior e ápice das nadadeiras peitorais mais claros; distribuiu-se na área costeira do Atlântico ocidental, desde a superfície até cerca de 70 m de profundidade. Seu modo de reprodução envolve viviparidade placentária; alimenta-se de pequenos peixes e crustáceos; nasce com cerca de 30 cm e cresce até 80 cm de comprimento (Gadig, 2001).

No Brasil estas espécies ocorrem ao longo de toda a costa e devido ao seu alto percentual de participação nas capturas de elasmobrânquios costeiros, constituem-se num dos mais importantes recursos pesqueiros do país. Atualmente *R. porosus* é mais abundante no Nordeste enquanto *R. lalandii* predomina nas regiões Sudeste e Sul, utilizando a plataforma continental do litoral do Sudeste como berçário nos meses inverniais (Motta, 2001). Há dados que indicam que *R. porosus* era mais comum no passado no Sudeste e Sul. Em Cananéia, litoral sul de São Paulo, esta espécie foi a mais abundante em capturas com redes de emalhar durante quatro anos (1962-1965), representando 37,1% de 6141 tubarões examinados e 75,4% de 3024 *Rhizoprionodon* (cerca de três *R. porosus* para cada *R. lalandii*). Em Itanhaém, também litoral sul de São Paulo, entre 1997 e 2000 foram capturados 9258 tubarões, dos quais 16,25% foram *R. porosus*, representando 21,33% dos 7054 tubarões do gênero *Rhizoprionodon* capturados (3,7 *R. lalandii* para cada *R. porosus*). No Maranhão *R. porosus* representou 20% de 1732 tubarões e 80,1% de 432 *Rhizoprionodon* (cerca de quatro *R. porosus* para cada *R. lalandii*) (Gadig, 2001).

Apesar da importância do gênero *Rhizoprionodon*, estudos que contemplem aspectos genéticos e evolutivos dos cações-frango ainda são escassos. Os poucos dados disponíveis sobre o gênero tratam da constituição cromossômica de *R. terraenovae* (Maddock & Schwartz, 1996) e de seqüências de DNA mitocondrial dos genes 12S e 16S na mesma espécie (Greig, 2005).

Esse conhecimento é incompatível com a importância econômica e ecológica dessas espécies de elasmobrânquios, seja para as comunidades litorâneas dependentes de sua pesca, seja também para a própria estrutura trófica dos ambientes onde se inserem.

2.4.2. Outras espécies de tubarões

As demais espécies analisadas (Figura 2) não foram descritas em detalhe, uma vez que esse não foi o escopo do presente trabalho. Entretanto cabe salientar que todas representam importantes recursos pesqueiros no Brasil ou em outros países onde são capturadas e

comercializadas. Além disso todas as espécies analisadas, exceto *Carcharhinus acronotus* que é restrita ao Atlântico Ocidental, apresentam distribuição comum a vários oceanos ocupando as zonas tropicais e subtropicais, com algumas espécies atingindo as zonas temperadas ou mesmo, como *Alopias superciliosus* e *Isurus oxyrinchus*, possuindo uma distribuição circunglobal (Gadig, 2001). Essas características reforçam a importância do adequado manejo e conservação das espécies e o valor das informações contidas no Manuscrito I do presente estudo.



Figura 2. Espécies de tubarões da costa brasileira analisadas no presente estudo. Fotos: todas retiradas do site www.flmnh.ufl.edu/, exceto *Carcharhinus obscurus*, cortesia de OBF Gadig.

2.5. Referências Bibliográficas

- Abercrombie DL, Clarke SC, Shivji MS (2005) Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: Application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conserv Genet* 6:775-788
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692-4693
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Aparício S, Chapman J, Stupka E, Putnam N (2002) Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297:1301-1310
- Baker WJ, Hedderson TA, Dransfield J (2000) Molecular phylogenetics of *Calamus* (Palmae) and related rattan genera based on 5S nrDNA spacer sequence data. *Mol Phyl Evol* 14:218-231
- Baum JK, Myers RA, Kehler DG, Worm B, Harley SJ, Doherty PA (2003) Collapse and conservation of shark populations in the northwest Atlantic. *Science* 299:389-392
- Bernardi G, Bernardi G (1990) Compositional patterns in the nuclear genomes of cold-blooded vertebrates. *J Mol Evol* 31:265-281
- Bernardi G (1992) The vertebrate genome: isochores and chromosomal bands. *Chromosomes Today* 11:49-60
- Bonfil R (1994) Overview of the world elasmobranch fisheries. *FAO Fisheries Tech. Rep.* 341:1-119
- Brastetter S (1990) Early life-history implications of selected carcharhinoid and lamnoid sharks of the Northwest Atlantic. In: Pratt HL, Gruber SH, Taniuchi T (eds). *Elasmobranch as living resources: Advances in the Biology, Ecology, Systematics, and the status of the fisheries*. NOAA Tech., Rep. 90:17-28
- Camhi M, Fowler SL, Musick JA, Brautigam A, Fordham SV (1998) Sharks and their relatives – Ecology and Conservation IUCN/ SSC Shark Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. pp 39
- Carrera E, Garcia T, Céspedes A, Gonzalez I, Fernandez A, Asensio LM, Hernandez PE, Mantin R (2000). Differentiation of smoked *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* and *Brama raii* using the nuclear marker 5S rDNA. *Int J Food Sci Technol* 35:401-406
- Castro JI (1993) The shark nursery of Bulls Bays, South Carolina, with a review of the shark nurseries of the southeastern coast of the United States. *Environ. Biol Fishes* 38:37-48

- Chan RWK, Dixon PI, Pepperell JG, Reid DD (2003) Application of DNA-based techniques for the identification of whaler sharks (*Carcharhinus* spp.) caught in protective beach meshing and by recreational fisheries off the coast of New South Wales. *Fisheries Bull* 101:910–914
- Chapman DD, Abercrombie DL, Douady CJ, Pikitch EK, Stanhope MJ, Shivji MS (2003) A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: Application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conserv Genet* 4:415-425
- Clarke SC, Magnussen JE, Abercrombie DL, McAllister MK, Shivji MS (2006) Identification of shark species composition and proportion in the Hong Kong shark fin market based on molecular genetics and trade records. *Conserv Biol* 20:201-211
- Compagno LJV (1990) Alternative life-history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environ Biol Fishes* 28:33-75
- Compagno LJV (1999) Checklist of living elasmobranches. In: WC Hamlet. *Sharks, skates and rays: the biology of elasmobranch fishes*. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press. 471-498
- Crisp MD, Appels R, Smith FM, Keys WMS (1999) Phylogenetic evaluation of 5S ribosomal RNA gene and spacer in the *Callistachys* group (Fabaceae: Mirbelieae). *Plant Syst Evol* 218:33-42
- Cronn RC, Zhao X, Paterson AH, Wendel JF (1996) Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *J Mol Evol* 42:685-705
- Danna KJ, Workman R, Coryell V, Keim P (1996) 5S rRNA genes in tribe Phaseoleae: array size, number, and dynamics. *Genome* 39:445-455
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Fukui K, Kamisugi Y, Sakai F (1994) Physical mapping of 5S rDNA loci by direct-cloned biotinylated probes in barley chromosomes. *Genome* 37:105-111
- Gadig OBF (2001) Tubarões da Costa Brasileira. Tese de Doutorado, Unesp, Campus de Rio Claro, São Paulo. 343 p
- Greig TW, Moore MK and Woodley CM (2005) Mitochondrial gene sequences useful for species identification of western North Atlantic Ocean sharks. *Fisheries Bull* 103:516-523
- Gruber SH (1990) Life style of sharks. In: Gruber SH (ed.) *Discovering sharks*. American Litoral Society, Special Publication No 14

- 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
- Hanson RE, Islam-Faridi MN, Percival EA, Crane CF, Ji Y, McKnight TD, Stelly DM, Price HJ (1996) Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. Chromosoma 105: 55-61
- Heist EJ, Gold JR (1999) Genetic Identification of sharks in the US Atlantic large coastal shark fishery. Fish Bull 97:53-61
- Joffe BI, Valiejo-Roman KM, Birstein VY, Troitsky AV (1995) 5S rRNA sequences of 12 species of flatworms: implications for the phylogeny of the Platyhelminthes. Hydrobiologia 305:37-43
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16:111-120
- Komiya H, Takemura S (1979) Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. J Biochem 86:1067-1080
- Kotas JE, Rocha-Gamba M da, Conolly PC, Hostim-Silva M, Mazzoleni RC, Pereira J (1995) Gillnet Activities in Southern Brazil. Centro de Pesquisa e Extensão pesqueira do Sudeste, Instituto Brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis, Itajaí, Santa Catarina, pp 48
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinfo 5:150-163
- Lessa RPT, Vooren CM, Araújo MLG, Kotas JE, Almeida PC, Rincón G, Santana FM, Gadig OBF, Sampaio C (2005) Plano Nacional de ação para a conservação de o manejo dos estoques de peixes elasmobrânquios no Brasil. Recife, pp 100
- Lomholt B, Frederiksen S, Nederby-Nielsen J, Hallenberg C (1995) Additional assignment of the human 5S rRNA genes to chromosome region 1q31. Cytogenet Cell Genet 70:76-79
- Maddock MB, Schwartz FJ (1996) Elasmobranch cytogenetics: Methods and sex chromosomes. Bull Mar Sci 58:147-155
- Martins C (2006) Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In Fish Cytogenetics. Eds: E. Pisano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti & B. G. Kapoor. Science Publisher, Inc., USA, pp 421-432
- Martins C, Galetti Jr. PM (2001). Organization of 5S rDNA in *Leporinus* fish species: two different genomic locations are characterized by distinct non-transcribed spacers (NTSSs). Genome 44:903-910

- Martins C, Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams CR (ed) Focus on Genome Research. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, pp 335-363
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempo PP, Wright JM, Foresti F (2002) Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. Cytogenet Genome Res 98:78-85
- Motta FS (2001) A pesca artesanal e a reprodução de *Rhizoprionodon lalandii* (Elasmobranchii – Carcharhinidae) no litoral sul do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Unesp, Campus de Rio Claro, SP:88 p
- Musick JA, Burgess GH, Camhi M, Cailliet G, Fordham S (2000) Management of sharks and their relatives (Elasmobranchii). Fisheries 25:9-13
- Ogiwara I, Miya M, Ohshima K, Okada N (1999) Retropositional parasitism of SINEs on LINEs: identification of SINEs and LINEs in elasmobranchs. Mol Biol Evol 16:1238-1250
- Pank M, Stanhope M, Natanson L, Kohler N, Shivji M (2001) Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. Mar Biotechnol 3:231-240
- Pardini AT, Jones CS, School MC, Noble LR (2000) Isolation and characterization of dinucleotide microsatellite loci in the Great White Shark, *Carcharodon carcharias*. Mol Ecol 9: 1176–1178
- Pardue ML (1973) Localization of repeated DNA sequences in *Xenopus* chromosomes. Cold Spr Harb Symp Quant Biol 38:475-482
- Pasolini P, Costagliola D, Rocco L and Tinti F (2006) Molecular organization of 5S rDNA in Rajidae (Chondrichthyes): Structural features and evolution of piscine 5S rRNA genes and nontranscribed intergenic spacers. J Mol Evol 62:564-574
- Pendás AM, Mórán P, Martínez JL, García-Vásquez E (1995) Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. Mol Ecol 4:275-276
- Prado EA, Faivre-Rampant P, Schneider C, Darmency MA (1996) Detection of a variable number of ribosomal DNA loci by fluorescent *in situ* hybridization in *Populus* species. Genome 39:1020-1026

- Rocco L, Stingo V, Bellitti M (1996) Cloning and characterization of a repetitive DNA detected by *Hind* III in the genome of *Raja montagui* (Batoidea, Chondrichthyes). *Gene* 176:185–189
- Rocco L, Costagliola D, Fiorillo M, Tinti F, Stingo V (2005) Molecular and chromosomal analysis of ribosomal cistrons in two cartilaginous fish, *Taeniura lymma* and *Raja montagui* (Chondrichthyes, Batoidea). *Genetica* 123:245-253
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2344 pp
- Schmid M, Vitelli L, Batistoni R (1987) Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascapidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. *Chromosoma* 95:271-284
- Shimoda N, Chevrette M, Ekker M, Kikuchi J, Hotta Y, Okamoto H (1996) Mermaid: a family of short interspersed repetitive elements widespread in vertebrates. *Biochemical and Biophysics Research* 220: 226–232.
- Shivji MS, Chapman DD, Pikitch EK, Raymond PW (2005) Genetic profiling reveals illegal international trade in fins of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conserv Genet* 6:1035-1039
- Shivji MS, Clarke S, Pank M, Natanson L, Kohler N, Stanhope M (2002) Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conserv Biol* 16:1036-1047
- Soto JMR (2001) Annotated systematic checklist and bibliography of the coastal and oceanic fauna of Brazil. I. Sharks. *Mare Magnum* 1:51-120
- Stingo V, Capriglione T, Rocco L, Improta R, Morescalchi A (1989) Genome size and A-T rich DNA in Selachians. *Genetica* 79:197-205
- Stingo V, Rocco L (2001) Selachian cytogenetics: a review. *Genetica* 111:329-347
- Suzuki H, Sakurai S, Matsuda Y (1996) Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 72:1-4
- Szabo P, Lee MR, Elder FB, Prensky W (1978) Localization of 5S RNA and rRNA genes in the RONway rat. *Chromosoma* 65: 161-172
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680

- Udovicic F, McFadden GL, Ladiges PY (1995) Phylogeny of *Eucalyptus* and *Angophora* based on 5S rDNA spacer sequence data. *Mol Phyl Evol* 4:247-256
- Venkatesh B, Tay A, Dandona N, Patil JG, Brenner S (2005) A compact cartilaginous fish model genome. *Current Biol* 15:82-83
- Verma RS, Babu A (1995) Human chromosomes: manual of basic techniques. Pergamon Press, USA. 240 p
- Vitelli L, Batistoni R, Andronico F, Nardi I, Barsacchi-Pilone G (1982) Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary divergent anuran amphibians. *Chromosoma* 84:475-491
- Vooren CM (1997) Demersal Elasmobranchs. In Seeling U, Odebrecht C and Castello JP (eds) *Subtropical Convergence Environments: the coast and sea in the Southwestern Atlantic*. Springer-Verlag, New York, pp 141-146
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA Barcoding Australia's fish species. *Phil Trans Royal Soc B* 360:1847-1857
- Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti Jr PM (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44:893-902
- Wegnez M, Denis H, Mazabraud A, Clerot JC (1978) RNA accumulation during oogenesis of the dogfish *Scyliorhinus caniculus*. *Biochemical research on oogenesis. Dev Biol* 62:99-111

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

No presente projeto foram analisadas diversas espécies de tubarões obtidas através de desembarque pesqueiro (Tabela 1). As espécies do gênero *Rhizoprionodon*, de maior representatividade nas coletas (*R. lalandii* n=30; *R. porosus* n=28), foram utilizadas em análises mais detalhadas quanto a aspectos da organização genômica do DNAr 5S. As demais oito espécies de tubarões foram avaliadas quanto aos padrões de bandas produzidas em gel de agarose após amplificação por PCR do DNAr 5S. Um total de cinco a dez amostras de cada espécie foi analisado. A identificação das espécies foi realizada para todas as amostras e alguns espécimes não foram preservados devido ao seu grande tamanho. Exemplares menores foram preservados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes-UNESP, Botucatu, SP, Instituto de Pesca, Santos, SP, e Campus do Litoral Paulista-UNESP, São Vicente, SP. Segmentos de tecidos (fígado, brânquias, músculo, nadadeiras) foram coletados dos animais recém obtidos da natureza e fixados/estocados em álcool 100% em freezer a -20 °C.

Tabela 1. Espécies de tubarões analisadas.

Família	Espécie	Local de coleta
Carcharhinidae	<i>Rhizoprionodon lalandii</i>	Ubatuba e São Vicente, SP
Carcharhinidae	<i>Rhizoprionodon porosus</i>	Ubatuba e São Vicente, SP
Carcharhinidae	<i>Sphyrna lewini</i>	Ubatuba, SP
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus obscurus</i>	Isla Margarita, Venezuela
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus leucas</i>	Bombinhas, SC
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus limbatus</i>	Fortaleza, CE
Carcharhinidae	<i>Carcharhinus acronotus</i>	Fortaleza, CE
Carcharhinidae	<i>Galeocerdo cuvier</i>	Espírito Santo
Laminidae	<i>Alopias superciliosus</i>	Área oceânica, SE do Brasil
Laminidae	<i>Isurus oxyrinchus</i>	Ubatuba, SP

3.2. Métodos

3.2.1. Extração de DNA de tecidos

Para extração do DNA foi utilizada a metodologia descrita por Aljanabi & Martinez (1997), que dispensa o uso de substâncias tóxicas como fenol e clorofórmio. O protocolo está descrito abaixo.

Extração de DNA

Colocar, em um tubo de 1,5 ml, 290 µl de tampão de extração (30 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 % SDS), 10 µl de Proteinase K (10 mg/ml) e aproximadamente 50 a 100 mg de tecido. Retirar totalmente o álcool do tecido (com papel absorvente) antes de iniciar a extração de DNA. Colocar em um banho-maria ou estufa a 55 °C por 2 a 3 horas. Colocar 100 µl de solução de NaCl 5 M e misturar bem invertendo o tubo vagorosamente. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Remover 300 µl de sobrenadante e transferir para um novo tubo de 1,5 ml. Adicionar 600 µl de etanol 100 % gelado (mantido no congelador). Deixar no ultrafreezer (-80 °C) por 20 minutos. Centrifugar a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Remover o sobrenadante. Adicionar 1 ml de etanol 70 % (temperatura ambiente). Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Remover o sobrenadante. Secar bem (pode colar em estufa a 37 °C por até 30 minutos). Adicionar 200 µl de água ultrapura autoclavada. Deixar na bancada ou na geladeira por pelo menos 24 horas para hidratação. Aliquotar o DNA e guardar cerca de 150 µl no freezer (-20 °C – solução estoque) e o restante na geladeira (4 °C – solução de trabalho).

A quantidade e a qualidade das amostras de DNA obtidas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% visualizado em transiluminador (Hoefer UV-25), sob luz ultravioleta e também em espectrofotômetro (BioPhotometer 6131 - Eppendorf), através da comparação de absorbância a 260-280nm.

3.2.2. Amplificação do DNAr 5S por PCR

Para obtenção de regiões do DNAr 5S, foi utilizado o método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), através do conjunto de *primers* 5SA (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5SB (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'), construídos a partir da seqüência do RNAr 5S de *Salmo gardnerii*, descrita por Komiya & Takemura (1979). Estes primers já foram aplicados com sucesso para amplificar as unidades repetitivas do DNAr 5S de várias outras espécies de peixes pertencentes a diferentes grupos (Pendas et al., 1995; Martins & Galetti, 2001a; Wasko et al., 2001; Martins et al., 2002).

Um segundo conjunto de primers, Cart5S1F (5'-CAC GCC CGA TCC CGT CCG ATC-3') e Cart5S1R (5'-CAG GCT AGT ATG GCC ATA GGC-3'), foi desenhado com base na seqüência do RNAr 5S de *Taeniura lymma* (Rajiformes), código de acesso AY278251 (Rocco et al. 2005) e *Scyliorhinus caniculus* (Carcharhiniformes), código de acesso M24954

(Wegnez et al. 1978). O conjunto de primers Cart5S1 apresenta regiões de anelamento no mesmo local do conjunto de primers 5SA e 5SB. Após a obtenção de seqüências do DNAr 5S a partir do conjunto de primers Cart5S1, um terceiro conjunto de primers foi projetado Cart5S2F (5'- TGG GAG ACC GCC TGG GAA -3') e Cart5S2R (5'- CCA AGT ACT AAC CAG GCC - 3') objetivando obter segmentos completos da região codificante do DNAr 5S (Figura 3).

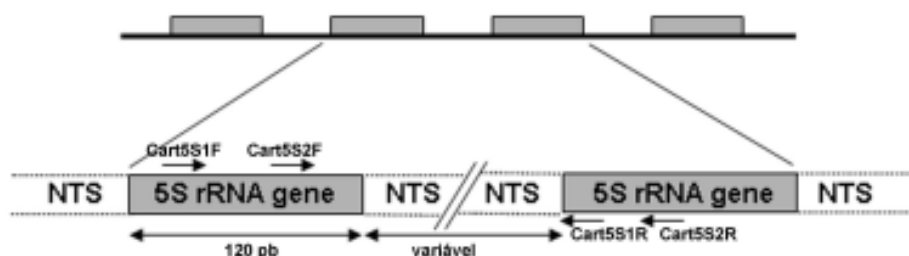


Figura 3. Regiões de homologia dos *primers* 5SA e 5SB com o gene RNAr 5S mostrando a região a ser amplificada.

As amplificações por PCR foram realizadas para um volume final de 25 μ l, contendo: 30-100 ng de DNA genômico, 150 pmol de cada *primer*, 1,25 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), tampão da taq polimerase 10 X (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$ e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen).

A reação seguiu as seguintes condições: um ciclo de denaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 30 segundos para anelamento dos primers, 72 °C por 45 segundos para alongação e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

3.2.3. Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas (4 a 10 μ l) dos produtos de PCR foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1 %, conforme protocolo descrito por Sambrook & Russel (2001). A metodologia utilizada encontra-se descrita abaixo.

Eletroforese em gel de agarose

Diluir a agarose (Ultra Pure™ Agarose - Invitrogen Life Technologies) em um volume apropriado de tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA) para que o gel fique em uma

concentração de 1 %. Aquecer a solução até que esta fique translúcida. Deixar a solução esfriar um pouco e aplicar no suporte da cuba de eletroforese horizontal. Ajustar o pente na cuba e deixar a solução de agarose solidificar. Preencher a cuba de eletroforese com tampão TAE 1x. Aplicar as amostras no gel, utilizando 2 µl de tampão de aplicação LB (Invitrogen Life Technologies). Realizar a eletroforese a 110V/150A. Corar o gel em solução de brometo de etídio (10 mg/ml) diluída a 0.1 % em tampão TAE 1x.

Os géis de agarose foram posteriormente visualizados em transiluminador (Hofer UV-25), sob luz ultravioleta, e a foto-documentação destes realizada com o programa computacional EDAS (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 - Kodak Digital Science 1D). Os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados através de comparação com um marcador de peso molecular conhecido (1Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen Life Technologies).

3.2.4. *Purificação de DNA*

A purificação de fragmentos de DNA de interesse foi realizada, para posterior clonagem destes, utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Amersham Biosciences), seguindo as especificações do fabricante, conforme descrito a seguir.

Purificação de DNA

Transferir todo o produto de PCR para uma Coluna GFX colocada em um tubo coletor, adicionar 500 µl de “Capture Buffer”, misturar com auxílio de uma pipeta e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar o tubo coletor com a Coluna GFX a 10.000 rpm por 30 segundos. Descartar o líquido do tubo coletor e colocar a Coluna GFX novamente no tubo coletor. Adicionar 500 µl de “Wash Buffer” à Coluna GFX e centrifugar a 10.000 rpm por 30 segundos. Descartar o tubo coletor e transferir a Coluna GFX para um novo tubo de 1,5 ml. Aplicar 50 µl de tampão de eluição TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) diretamente sobre a fibra de vidro da Coluna GFX. Incubar a amostra à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto para recuperar o DNA. Estocar o DNA purificado a -20 °C. Estimar a concentração do produto final através de eletroforese em gel de agarose ou em espectrofotômetro.

3.2.5. Clonagem de fragmentos de DNA

A clonagem de amostras de DNA (produtos de PCR, fragmentos isolados de gel de agarose) foi realizada para a posterior caracterização destes segmentos de DNA. Os kits de ligação pGEM-T Easy Vector System I (Promega) e InsT/AClone (Fermentas) foram utilizados para ligação dos fragmentos de interesse ao plasmídeo pGEM-T e pTZ57R/T, respectivamente, seguindo as especificações dos fabricantes. Posteriormente, foi realizada a transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α fornecidas pela Invitrogen Life Technologies e bactérias competentes preparadas no próprio laboratório. Os protocolos utilizados encontram-se descritos abaixo.

Ligação de fragmentos de DNA ao plasmídeo pGEM-T

Em um tubo de 0,5 ml, adicionar 2 μ l do inserto de interesse (\pm 100 ng de fragmento de DNA), 1 μ l de T4 DNA ligase, 1 μ l de tampão de reação 10x, 1 μ l do plasmídeo pGEM-T (50 ng) e 5 μ l de água destilada autoclavada. Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e incubar a reação a 4 °C durante 12-16 horas. Utilizar nas reações de transformação bacteriana.

Ligação de fragmentos de DNA ao plasmídeo pTZ57R/T

Misturar num tubo de 0,5 ml, 1,5 μ L de vetor (0,055 μ g/ μ L) , 2 μ L (200 ng) do fragmento do DNA de interesse, 1,5 μ L de tampão de ligação 10x, 1,5 μ L de PEG 4000 (50% w/v), 8 μ L de água estéril e 0,5 μ L de T4 DNA ligase (5 u/ μ L), totalizando um volume final de 15 μ L. Incubar a mistura a 20° C por cerca de doze horas.

Transformação de células competentes bacterianas

Colocar 50 μ l de bactérias competentes (acondicionadas a -70 °C) em um tubo de 1,5 ml e, posteriormente, adicionar 10 μ l da reação de ligação (inserto-plasmídeo), misturando cuidadosamente com uma micropipeta. Manter o tubo em gelo por 30 minutos. Aplicar um choque térmico, aquecendo o tubo a 37 °C em banho-maria por exatamente 45 segundos. Colocar o tubo imediatamente no gelo e manter por 2 minutos. Adicionar 950 μ l de meio LB líquido (peptona 1 %, NaCl 0,17 M, extrato de levedura 0,5 %, pH 7,5) à temperatura ambiente e incubar a 37 °C por 1 hora, sob agitação a 225 rpm. Centrifugar por 5 segundos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante. Espalhar o produto de

transformação em placas de Petri estéreis com meio LB sólido (peptona 1 %, NaCl 0,17 M, extrato de levedura 0,5 %, ágar 1,5 %, pH 7,5), contendo 2 µl de ampicilina (50 mg/ml) por mililitro de meio LB e 50 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-(D-galactoside) (50 mg/ml), para posterior seleção dos recombinantes (colônias brancas). Incubar as placas, com o meio de cultura voltado para cima, em estufa a 37°C durante 12-16 horas.

3.2.6. PCR para confirmação da presença de insertos

Para verificar a presença de insertos de interesse nos clones obtidos, as colônias brancas (potencialmente portadoras do inserto de interesse) foram repicadas em meio sólido LB e submetidas a reações de amplificação (PCR). Os primers M13F e M13R, que possuem homologia nas regiões que flanqueiam o local de inserção do fragmento no plasmídeo foram utilizados na reação, seguindo o protocolo descrito abaixo. Após identificação dos clones de interesse estes foram estocados a -70 °C em glicerol 15 %, em tubos de 1,5 ml estéreis. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 200 (MJ Research).

PCR para confirmação da presença de insertos

Em um tubo de 0,5 ml adicionar uma fração de DNA obtido diretamente da colônia com auxílio de um pipetador, 2,5 µL de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 1,25 µL (200 mM) de dNTPs, 1,25 µL de primer M13F (5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3') (10uM), 1,25 µL de primer M13R (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') (10uM), uma unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 18,5 µL de água estéril, totalizando um volume final de 25 µL. Realizar as reações de amplificação em termociclador com o seguinte programa: um ciclo inicial de 95° C por 3 minutos, para desnaturação, seguido de 34 ciclos a 95° C por 30 segundos, 50° C por 1 minuto para anelamento dos primers, 72° C por 2 minutos, estendendo a cadeia e, finalmente, uma elongação final a 72° C por 5 minutos. Analisar os resultados através de eletroforese em gel de agarose.

3.2.7. Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento nucleotídico dos clones de interesse foi realizado utilizando o kit DYEnamic Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare Amersham Biosciences) e seqüenciador automático (Perking-Elmer ABI Prism 377 DNA Sequencer), seguindo as

especificações dos fabricantes, como descrito a seguir. As reações de seqüenciamento foram realizadas em termociclador PTC 200 (MJ Research).

Seqüenciamento

Preparar a reação de seqüenciamento contendo 2 µl de pré-mix (fornecido no kit), 2 µl do produto purificado e 2 µl de “primer” (10 µM) e 3 µl de água ultra-pura. Realizar as reações em termociclador seguindo o programa: desnaturação inicial a 96 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 96 °C por 45 segundos, hibridação a 50 °C por 30 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos. Adicionar às amostras 2 µl de acetato de sódio 4,5 mM e 80 µl de etanol 95 %. Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 minutos a 20 °C. Remover o sobrenadante e adicionar 400 µl de etanol 70 %. Centrifugar novamente a 14.000 rpm durante 10 minutos. Remover o sobrenadante e manter o material em estufa a 37 °C por 1 hora, protegido da luz. Dissolver as amostras em solução de formamida e “blue dextran” (Formamide Loading Dye 5:2). Limpar a placa dupla de vidro com álcool, em que será colocado o gel de poliacrilamida. Colocar o pente na placa de vidro para formar os sulcos onde serão aplicadas as amostras de DNA. Colocar a placa em um forno de luz ultravioleta, inserir o gel de poliacrilamida (RapidGel™-XL6% - GE Healthcare Amersham Biosciences), com uma seringa, na placa dupla de vidro. Ligar a luz ultravioleta durante 3 minutos para polimerizar a poliacrilamida. Limpar novamente a placa de vidro, para evitar erros de leitura no seqüenciamento. Colocar o gel no seqüenciador automático e encher as cubas superior e inferior do seqüenciador com tampão TBE 1x (Tris-Ácido bórico-EDTA). Desnaturar as amostras de DNA a 80 °C por 4 minutos, em termociclador, e colocá-las imediatamente em gelo. Determinar a voltagem (1.400V) e a intensidade do laser de leitura das bases (100) no programa computacional e identificar as linhas de leitura com o número correspondente das amostras. Aplicar 2 µl de cada amostra em sua linha correspondente no gel. Iniciar a corrida do gel e realizar a leitura dos resultados.

3.2.8. *Análise das seqüências*

Para identificação de possíveis homologias, as seqüências nucleotídicas obtidas foram primeiramente submetidas a buscas online BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Altschul et al., 1990) através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (USA), “website” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Posteriormente realizou-se o

alinhamento com o programa Clustal W (Thompson et al., 1994) através do website (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>). Com a utilização do sistema de pesquisa Blastn do NCBI (Altschul et al., 1990), foi realizada uma busca por similaridade entre as seqüências obtidas e as já previamente depositadas no DNA Data Bank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) e GenBank Data Base (GB). As seqüências obtidas foram analisadas através do programa MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004), para determinação da variabilidade e distância genética entre elas. As análises de Neighbor-Joining (NJ), foram realizadas através do programa MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) empregando-se o modelo de distancia genética Kimura-2 (Kimura, 1980). A composição e diversidade dos clones foram examinadas com o auxílio do software BioEdit 7.0 (Hall, 1999). O teste de bootstrap (Felsenstein, 1985) utilizando 1000 réplicas foi aplicado para exame de ramos individuais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Manuscrito I

Discrimination of Shark Species by Simple PCR of 5S rDNA Repeats*

Danillo Pinhal¹, Otto BF Gadig², Adriane P Wasko³, Claudio
Oliveira¹, Fausto Foresti¹ and Cesar Martins¹

¹Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

²Campus Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Vicente, SP Brazil.

³Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP, Brazil

Keywords: Chondrichthyes, PCR, species identification, 5S rDNA, sharks.

Running Title: PCR discrimination of shark species

Corresponding author and reprint request: Cesar Martins, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia, CEP 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil. Telephone/Fax: ++55(14)38116264

e-mail: cmartins@ibb.unesp.br

**Manuscrito no prelo, Genetics and Molecular Biology (ISSN 1415-4757).*

Abstract

Sharks have been suffering intensive exploitation by worldwide fisheries which lead to a severe decline in several populations in the last decades. The lack of biological data on a species-specific basis associated with a k-strategist life turn difficult the correct management and conservation of these animals. The aim of the present work was to develop a DNA-based procedure to discriminate shark species by means of a rapid, low cost and easily applicable PCR analysis based on 5S rDNA repeat units amplification, in order to contribute for the preservation of these animals. The generated agarose electrophoresis band patterns allowed unequivocally distinguishing eight shark species. The achieved data evidenced for the first time that a simple PCR routine procedure is able to discriminate elasmobranches species. The described 5S rDNA PCR approach generates interesting species-specific genetic markers that can find broad application in fishery management and trade of sharks and their subproducts.

Introduction

The large worldwide increase in the Elasmobranches fisheries over the past decade is due not only to the intentional catch of these animals but also a result of a massive elasmobranches “bycatch” during Teleostei fisheries, leading to an unprecedented exploitation pressure on many shark and ray populations (Bonfil, 1994). On the contrary of other teleost fish, several examples have shown that the elasmobranches are remarkably susceptible to population declines and/or population collapses due to exhaustive exploitation (Kotas *et al.*, 1995; Vooren, 1997; Musick *et al.*, 2000; Baum *et al.*, 2003).

In a general context, the elasmobranch stocks management is complex due to a lack of basic biological data on most species. Some recently published studies have provided a more accurate picture of the status of some populations (Simpfendorfer *et al.*, 2000; Cortés, 2002; Baum *et al.*, 2003; Baum and Myers, 2004), showing that the different life-history parameters of each shark species result in a differential sensitivity to intensive exploitation (Heist and Gold, 1999; Castro *et al.*, 1999). Thus, an efficient worldwide management and conservation efforts on these animals will require fishery information on a species-specific basis. Nonetheless, this issue may not be easily achieved, due to the considerable difficulty of an accurate species identification of several usually targeted species (Bonfil, 1994; Castro *et al.*, 1999). The identification problem is exacerbated by the common fishery practice of removing the head, tail, and most fins from landed sharks while still at sea to reduce required storage space for the captured animals. This practice removes the major morphological identifying characters of the animals, making difficult the precise recognition of the species and, consequently, resulting on problems to their proper management (Shivji *et al.*, 2002).

The implement of molecular biological techniques in marine forensic science has improved the development of accurate taxonomic identification of shark species by sampling biological tissues (Lavery, 1992; Heist and Gold, 1999). Several methods mainly based on proteins separation by electrophoresis or high-performance liquid chromatography have been developed for species identification (Sotelo *et al.*, 1993). In recent years, new DNA analyses have been finding their way in the identification of species, subspecies, populations, strains, hybrids and individuals. DNA amplification using the polymerase chain reaction (PCR) (Mullis and Faloona, 1987) has been used as a powerful alternative tool to protein electrophoresis, chromatography and immunological methods, due to its simplicity, specificity and sensitivity. The PCR has become one of the most important technologies in the manipulation of genetic material, mainly for the identification of genetic markers of considerable value for practical and fundamental research. DNA-based genetic markers,

especially those related to important traits such as growth enhancement and viral and bacterial disease resistance, have been developed for aquaculture purposes primarily with the goal of improving fish stocks and strains. On the other hand, DNA markers also find application in conservation programs, specifically for stocks identification, breeding selection, analysis of loci segregation and quantitative traits, and for accessing species genetic variability (Martins *et al.* 2004).

In higher eukaryotes, the 5S ribosomal DNA (5S rDNA) array consists of multiple copies of a highly conserved 120 base pairs (bp) coding sequence, separated from each other by a variable non-transcribed spacer (NTS) (Long and David 1980) (Figure 1). The 5S rDNA represents a suitable candidate for PCR-based genetic studies due to several features: (i) head to tail organization of the 5S rDNA multigene family members; (ii) the NTS is flanked by the 5S rRNA gene copies in the 5S rDNA tandem array, thus the PCR technology can be used in the isolation of the NTSs; (iii) the 5S rRNA gene is highly conserved even among non related species and so it is possible to isolate the 5S rDNA repeats of one species based in the available sequence of another non-related species with the use of PCR; (iv) repetitive units of the 5S rDNA do not exceed the length of PCR amplification range; (v) the isolation of the repeat units of the 5S rDNA can be obtained from DNA of poor quality and quantity due to their tandem nature and small size (Martins and Wasko, 2004).

Moreover, the distinct genome organization patterns of the 5S rDNA tandem repeats have been also useful as genetic markers not only in evolutionary studies but also in practical approaches for the discrimination of fish species (Céspedes *et al.*, 1999; Sajdak *et al.*, 1998; Pendas *et al.*, 1995, Asensio *et al.*, 2001), even for species of the same genus (Perez and Garcia-Vázquez, 2004; Aranishi, 2005). Nonetheless, there are no data about the usefulness of the 5S rDNA as genetic marker in the elasmobranch fish group.

Hence, the present work intent to develop a simple and reliable DNA routine method for an accurate discrimination of diverse shark species based on simple PCR amplification and agarose gel electrophoresis analysis. For such purpose, 5S rDNA tandemly repeats were evaluated to generate species-specific amplified fragment patterns on eight different sharks species, including closely related species of the genus *Carcharhinus*.

Materials and Methods

Shark sampling and DNA extraction

Sharks belonging to the Orders Carcharhiniformes and Lamniformes were collected from several Brazilian and Venezuelan coast sites: *Sphyrna lewini* and *Isurus oxyrinchus* from

the municipality of Ubatuba (São Paulo State, Brazil); *Carcharhinus limbatus* and *C. acronotus* from the municipality of Fortaleza (Ceará State, Brazil); *Galeocerdo cuvier* from the Espírito Santo State (Brazil); *Alopias superciliosus* from the oceanic area in the Southeast Brazil; *Carcharhinus leucas* from the Bombinhas beach (Santa Catarina State, Brazil), and *Carcharhinus obscurus* from Isla Margarita (Venezuela). Five to ten samples of each species were evaluated for the analyses. Previous morphological species identification was realized on all shark samples. Species identifications of some samples (*Carcharhinus acronotus*, *C. leucas*, *C. obscurus*, *C. limbatus*, *Alopias superciliosus*, and *Isurus oxyrinchus*) were carried out using complete specimens that were not preserved due their large size. Small specimens of *Sphyrna lewini* and *Galeocerdo cuvier* were preserved in the fish collection of the Laboratório de Biologia e Genética de Peixes-UNESP, Botucatu, SP, and Instituto de Pesca, Santos, SP. The tissues were collected from specimens that were caught by commercial fisheries, or from frozen or ethanol preserved specimens. Genomic DNA was extracted from fin clip, gills and muscles according to Sambrook and Russell (2001).

PCR amplification

PCR amplifications of 5S rDNA repeats were performed as described by Martins and Galetti (2001) with some modifications. The set of primers, Cart5S1F (5'-CAC GCC CGA TCC CGT CCG ATC-3') and Cart5S1R (5'-CAG GCT AGT ATG GCC ATA GGC-3') (Figure 1) were designed based in the 5S rRNA gene sequence of the elasmobranches *Taeniura lymma* (AY278251) (Rocco et al., 2005) and *Scyliorhinus caniculus* (M24954) (Wegnez et al., 1978). Each PCR reaction mixture contained 150 pmoles of each primer, ~20 ng of genomic DNA, 1x Taq buffer, 200 µM of dNTPs, and 2 U of Taq polymerase (Invitrogen) in a final reaction volume of 25 µl. Cycling times were as follows: 5 min at 94 °C; 35 cycles of 1 min at 95 °C (denaturation), 30 s at 55 °C (annealing) and 45 s at 72 °C (elongation); and a final extension step for 5 min at 72 °C. A negative control was also included to check any contamination. The PCR products were checked by applying 3 µl of each reaction in 1.25 % (w/v) agarose gel containing 1x TAE buffer (0.04 M TRIS-acetate and 1 mM EDTA, pH 8.3) and compared with a standard DNA marker (1Kb Plus Ladder - Invitrogen). Electrophoresis was carried out in 1x TAE buffer (90 min, 120 V and ~150 mA) at room temperature. Fragments were stained with ethidium bromide, visualized under UV illumination (Hoefler UV-25) and the gel image was retrieved by using EDAS program (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 - Kodak Digital Science 1D).

Results and Discussion

PCR amplification of 5S rDNA repeats from shark specimens generated a distinct agarose gel fragment pattern for each analyzed species and no variations were detected among different samples of the same species (Figure 2). Fragment sizes ranged from ~130 bp for the minor band in blacktip shark *Carcharhinus limbatus* to ~1,000 bp for the largest band in mako *Isurus oxyrinchus*, and the unique band in bigeye thresher *Alopias superciliosus*. The tiger shark *Galeocerdo cuvier* showed a single ~520 bp band. The bands for scalloped hammerhead *Sphyrna lewini* were ~220 bp and ~480 bp. *Isurus oxyrinchus* showed other two amplified fragments of ~300 bp and 400 bp. The requien sharks, genus *Carcharhinus*, exhibited very distinct PCR band patterns, with one, two, three or four fragments in agarose gels. The blacknose shark *C. acronotus* presented only a single ~450 bp band, while ~130 bp and ~520 bp fragments were obtained for *C. limbatus*. The dusky shark *C. obscurus* and the bull shark *C. leucas*, evidenced similar three bands of ~450, ~500 and ~540 bp, with an additional band of ~230 bp in *C. leucas*. The distinct amplified fragment patterns of the analyzed shark species, observed through agarose gel electrophoresis, reflect a high variability in the 5S rDNA genomic composition owing to major differences in the NTS shark organization, since the coding region was found to be conserved in other cartilaginous fishes (Pasolini *et al.*, 2006). Nucleotide sequence analyses based on the NTS have shown that the great variability found in this region can be due to insertions/deletions, minirepeats, and pseudogenes (Nelson and Honda, 1985; Leah *et al.*, 1990; Sajdak *et al.*, 1998).

The NTSs seem to be governed by an intense mechanism of evolution, which makes this region an important source for studies concerning the organization and evolution of multigene families and genomes and also as markers to trace recent events of evolution. Previous studies have shown the presence of different 5S rDNA arrays in the fish genome (Martins and Wasko, 2004). Similarly, the multiple bands detected for some of the analyzed shark species suggest the presence of different 5S rDNA classes also among cartilaginous fishes. One interesting characteristic of the 5S rDNA repeats is the tendency to the homogenization of the different copies that are arrayed in the same cluster, that can differ extensively from the copies of a second 5S cluster (Martins and Wasko, 2004). It has been believed that multigene families evolve according to homogenization processes governed by molecular drive and concerted evolution, resulting in a sequence similarity of the repeat units that is greater within than between species (Dover, 1986; Elder and Turner, 1995). Such observation was clearly evidenced in the organization of the 5S rDNA in the Nile tilapia

Oreochromis niloticus (Martins *et al.*, 2002) and in the South American species of the genus *Leporinus* (Martins *et al.*, 2001).

Mainly among fishes, different NTS lengths have been applied as efficient genetic markers for sex identification and for inspection programs that intend to access species, hybrids, or smoked products identity. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), chromosome hybridization analyses on male and female metaphase spreads revealed a 5S rDNA chromosome sex-specific pattern (Morán *et al.*, 1996). PCR amplified products of 5S rDNA clearly discriminate Atlantic salmon (*Salmo salar*), brown trout (*Salmo trutta*), and their hybrids (Pendás *et al.*, 1995), and also several Neotropical fish species of the genus *Brycon* (Wasko *et al.*, 2001). PCR was also applied in the identification of the flatfishes *Solea solea* and *Reinhardtius hippoglossoides* (Cespedes *et al.*, 1999) and for the identification of smoked fillets of salmon, rainbow trout, and bream (*Brama raii*) (Carrera *et al.*, 2000). The present results also evidenced that 5S rDNA repeats represent good markers for shark species identification in several taxonomic levels.

Previous molecular analyses on shark species discrimination were based on a multiplex PCR assay using both nuclear (ribosomal internal transcribed spacer 2) and mitochondrial (cytochrome b) loci simultaneously (Pank *et al.*, 2001; Shivji *et al.*, 2002; Chapman *et al.*, 2003; Shivji *et al.*, 2005; Abercrombie *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2006), or on mitochondrial gene sequences (Heist and Gould, 1999; Greig *et al.*, 2005). However, these approaches are not only time consuming but also expensive. The PCR amplification of 5S rDNA repeats and agarose gel electrophoresis analysis showed to be a simple routine and low cost methodology to achieve shark species identification. Moreover, this practice can be used to reinforce the usual morphometric and morphological identification of the animals (Last and Stevens, 1994; Naylor and Marcus, 1994) and can be also used to recognize “cryptic” species, like those of the genus *Carcharhinus*, in which morphological identification can not be easily done.

Particularly in fishery management and conservation, the 5S rDNA PCR approach does not require intensive or expensive labor to be implemented. Additionally, such technology could be applied on body pieces that are commonly sold in markets with the generic name of “shark meat”, allowing assess of shark catch and trade on a species-specific basis to detect potential overexploitation of individual species.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Ernesto Ron for his help during sample collection in Venezuela and Mr. Nelson Dreux, from Instituto de Pesca (Santos, São Paulo, Brazil) for donation of several specimens. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

References

- Abercrombie DL, Clarke SC and Shivji MS (2005) Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: Application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conserv Genet* 6:775-788.
- Asensio L, Gonzalez I, Fernandez A, Cespedes A, Rodriguez MA, Hernandez PE, Garcia T, Martin R (2001) Identification of Nile perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*), and wreck fish (*Polyprion americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J AOAC Int* 84:777-781.
- Aranishi F (2005) PCR-RFLP analysis of nuclear nontranscribed spacer for mackerel species identification. *J Agric Food Chem* 53:508-511.
- Baum JK and Myers RA (2004) Shifting baselines and the decline of pelagic sharks in the Gulf of Mexico. *Ecol Lett* 7:135-145.
- Baum JK, Myers RA, Kehler DG, Worm B, Harley SJ and Doherty PA (2003). Collapse and conservation of shark populations in the northwest Atlantic. *Science* 299:389-392.
- Bonfil R (1994) Overview of World Elasmobranch Fisheries. FAO Fisheries Technical Paper No. 341. Rome.
- Carrera E, Garcia T, Céspedes A, Gozález I, Fernández A, Asensio LM, Hernández PE and Martin R (2000) Differentiation of smoked *Salmo solar*, *Onconhynchus mykiss* and *Brama raii* using the nuclear marker 5S rDNA. *Int J Food Sci Technol* 35:401-406.
- Castro J, Pardo BG, Sánchez L and Martínez P (1999) rDNA RFLPs as genetic markers for resource management in brown trout. *J Fish Biol* 55:221-225.
- Céspedes A, Garcia T, Carrera E, Gonzalez I, Fernandez A, Hernandez PE and Martin R (1999) Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J Agric Food Chem* 47:1046-1050.
- Chapman DD, Abercrombie DL, Douady CJ, Pikitch EK, Stanhope MJ and Shivji MS (2003) A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: Application

- to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conserv Genet* 4:415-425.
- Clarke SC, Magnussen JE, Abercrombie DL, McAllister MK and Shivji MS (2006) Identification of shark species composition and proportion in the Hong Kong shark fin market based on molecular genetics and trade records. *Conserv Biol* 20:201-211.
- Cortés E (2002) Incorporating uncertainty into demographic modeling: application to shark populations and their conservation. *Conserv Biol* 16:1-15.
- Dover GA (1986) Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. *Genetics* 122:249-252.
- Elder Jr. JF and Turner BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol* 70:277-320.
- Greig TW, Moore MK and Woodley CM (2005) Mitochondrial gene sequences useful for species identification of western North Atlantic Ocean sharks. *Fish Bull* 103:516-523.
- Heist EJ and Gold JR (1999) Genetic Identification of sharks in the US Atlantic large coastal shark fishery. *Fish Bull* 97:53-61.
- Kotas JE, Rocha-Gamba M da, Conolly PC, Hostim-Silva M, Mazzoleni RC and Pereira J (1995) Gillnet Activities in Southern Brazil. Centro de Pesquisa e Extensão Pesqueira do Sudeste, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Itajaí, Santa Catarina, 48 pp.
- Last PR and Stevens JD (1994) *Sharks and rays of Australia*, CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) Publishing, Melbourne, Australia, 513 pp.
- Lavery S (1992) Electrophoretic analysis of phylogenetic relationships among Australian carcharhinid sharks. In Pepperell JG (ed) *Sharks: biology and fisheries*. *Aust J Mar Freshw Res* 43:97-108.
- Leah R, Frederiksen S, Engberg J and Sorensen PD (1990) Nucleotide sequence of a mouse 5S rRNA variant gene. *Nucleic Acids Res* 18:7441-7441.
- Long EO and David IB (1980) Repeated genes in Eukaryotes. *Ann Rev Biochem* 49:727-764.
- Martins C and Galetti Jr PM (2001) 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, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempi PP, Wright JM and Foresti F (2002) Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome:

- repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet Genome Res* 98:78-85.
- Martins C and Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams CR (ed) *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, pp 335-363.
- Martins C, Oliveira C, Wasko AP and Wright JM (2004) Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes-a review. *Aquaculture* 231:37-49.
- Móran P, Martínez JL, Garcia-Vásquez E and Pendás AM (1996) Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet Cell Genet* 75:145-150.
- Mullis KB and Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Musick JA, Burgess GH, Camhi M, Cailliet G and Fordham S (2000) Management of sharks and their relatives (Elasmobranchii). *Fisheries* 25:9-13.
- Naylor GJP and Marcus LF (1994) Identifying isolated shark teeth of the genus *Carcharhinus* to species: relevance for tracking phyletic change through the fossil record. *Am Mus Novit* 94:1-53.
- Nelson DW and Honda BM (1985) Genes coding for 5S ribosomal RNA of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 38:245-251.
- Pank M, Stanhope M, Natanson L, Kohler N and Shivji M (2001) Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. *Mar Biotechnol* 3:231-240.
- Pasolini P, Costagliola D, Rocco L and Tinti F (2006) Molecular organization of 5S rDNA in Rajidae (Chondrichthyes): Structural features and evolution of piscine 5S rRNA genes and nontranscribed intergenic spacers. *J Mol Evol* 62:564-574.
- Pendás AM, Morán P, Martínez JL and Garcia-Vázquez E (1995) Application of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Mol Ecol* 4:275-276.
- Perez J and Garcia-Vázquez E (2004) Genetic identification of nine hake species for detection of commercial fraud. *J Food Prot* 67:2792-2796.
- Rocco L, Costagliola D, Fiorillo M, Tinti F and Stingo V (2005) Molecular and chromosomal analysis of ribosomal cistrons in two cartilaginous fish, *Taeniura lymma* and *Raja montagui* (Chondrichthyes, Batoidea). *Genetica* 123:245-253.

- Sajdak SL, Reed KM and Phillips RB (1998) Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of Coregonid fish. *J Mol Evol* 46:680-688.
- Sambrook J and Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2344 pp.
- Shivji MS, Chapman DD, Pikitch EK and Raymond PW (2005) Genetic profiling reveals illegal international trade in fins of the great white shark, *Carcharodon carcharias*. *Conserv Genet* 6:1035-1039.
- Shivji MS, Clarke S, Pank M, Natanson L, Kohler N and Stanhope M (2002) Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conserv Biol* 16:1036-1047.
- Simpfendorfer CA, Donohue K and Hall NG (2000) Stock assessment and risk analysis for the whiskery shark (*Furgaleus macki* [Whitley]) in southwestern Australia. *Fish Res* 47:1-17.
- Sotelo CG, Pineiro C, Gallardo JM and Perezmartin RI (1993) Fish species identification in seafood products. *Trends Food Sci Tech* 4:395-401.
- Vooren CM (1997) Demersal Elasmobranchs. In Seeling U, Odebrecht C and Castello JP (eds) *Subtropical Convergence Environments: the coast and sea in the Southwestern Atlantic*. Springer-Verlag, New York, pp 141-146.
- Wasko AP, Martins C, Wright JM and Galetti Jr PM (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44:893-902.
- Wegnez M, Denis H, Mazabraud A and Clerot JC (1978) RNA accumulation during oogenesis of the dogfish *Scyliorhinus caniculus*. *Biochemical research on oogenesis. Dev Biol* 62:99-111.

Figure legends

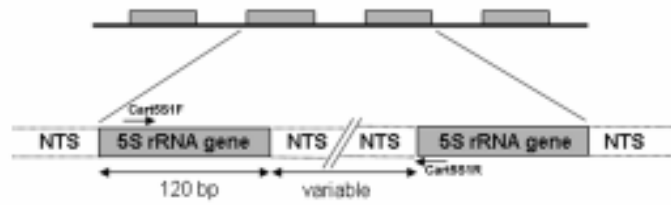


Figure 1. Arrangement of higher eukaryotic 5S rRNA genes intercalated with non transcribed DNA segments (NTS). The primers Cart5S1F and Cart5S1R annealing regions are indicated.

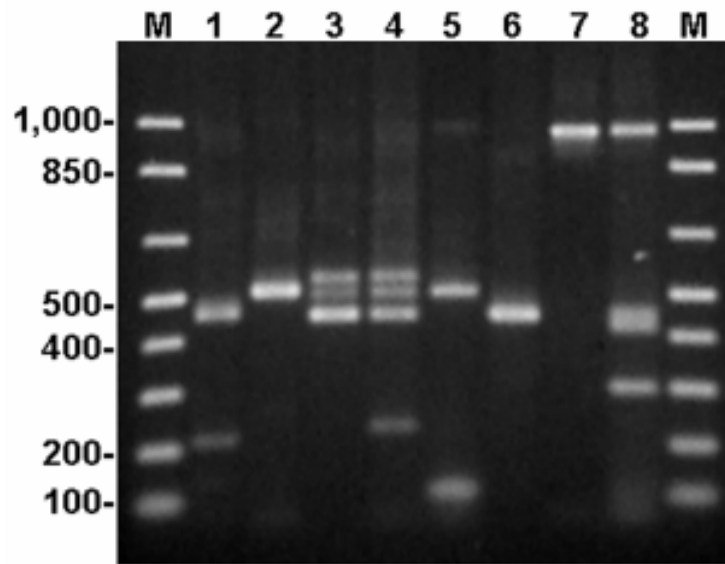


Figure 2. Agarose electrophoresis profiles of 5S rDNA-PCR products of *Sphyrna lewini* (1), *Galeocerdo cuvier* (2), *Carcharhinus obscurus* (3), *Carcharhinus leucas* (4), *Carcharhinus limbatus* (5), *Carcharhinus acronotus* (6), *Alopias superciliosus* (7), *Isurus oxynchus* (8). M, molecular weight marker in bp.

4.2. *Manuscrito II*

Molecular arrangement and evolution of the 5S ribosomal DNA in the sharks *Rhizoprionodon lalandii* and *Rhizoprionodon porosus* *

Danillo Pinhal and Cesar Martins

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brazil;

* Tel. +55 143811 6264; E-mail address: dlpinhal@ibb.unesp.br

Keywords: 5S rDNA, Elasmobranchii, sharks, molecular evolution, *Rhizoprionodon*, NTS

***Manuscrito de acordo com as normas do periódico *Journal of Molecular Evolution* (ISSN 0022-2844)**

Abstract

In higher eukaryotes, the 5S-rRNA multigene family is arrayed in large tandemly repeat elements, every one formed by a highly conserved ~120 base pairs (bp) coding region separated by a nontranscribed spacer region (NTS) of variable size and nucleotide composition. The 5S ribosomal head-to-tail array confers a particular dynamic to the evolution of these DNA sequences and the study of their general features can contribute for the knowledge of organization and evolution of the genome. Nonetheless little information related to 5S rDNA is available about cartilaginous fish: only eight species of almost 1100 recognized were investigated. Thus, in this work, we attempt for the molecular characterization of the 5S rDNA in two close related Carcharhiniform shark species, *R. lalandii* and *R. porosus*, and a further comparative analysis of data existent on lampreys, bony fishes and other vertebrates. Our data have shown that *Rhizoprionodon* sharks exhibited two classes of 5S rRNA genes: a large-one class (named class I) composed of ~465 bp repeats and a short-repeat class (named class II) arrayed in ~185 bp units. These classes were differentiated by several base substitutions in the 5S rRNA coding region and completely distinct NTS regions. In the class I, both species presented a similar composition for the gene coding region and also greatly conserved NTSs, suggesting some structural or functional role of these non-coding regions in the maintenance and regulation of 5S rRNA genes. By contrast class II was extensively variable within and between the two shark species. A comparative analysis among 5S rRNA gene sequences of elasmobranches and other vertebrates showed that the class I was closely related to bony fish, while the class II gene formed a basal cartilaginous clade. Probably the presence of two variant classes of 5S rDNA in sharks keeps the tendency for dual ribosomal genes patterns observed in other fish species. The present data regarding the 5S rRNA genes organization brings insights for the comprehension of the dynamics and evolution of multigene family in the fish genome and also also can be useful in clarifying aspects of the vertebrate genome evolution.

Introduction

Nuclear ribosomal DNA (rDNA) is organized in two distinct multigene families tandemly arrayed in the genome of higher eukaryotes. The first family contains coding sequences for the 18S, 5.8S and 26S-28S rRNAs and an intergenic non-transcribed spacer (IGS). The second family codifies the 5S rRNAs and is composed by multiple copies of a highly conserved 120 base pairs (bp) coding sequence (5S rRNA gene), separated by a variable non-transcribed spacer (NTS) (Long and David 1980).

In fish, as in other vertebrates, molecular evolution of 5S rDNA multigene family appears to be the result of a balance between mutational, homogenizing and selective forces (Robles et al. 2005). Gene conversion, transposition, and unequal crossing-over mechanisms are responsible for the concerted evolution event that lead the coding regions of 5S rDNA to become homogenized within individual genomes and populations, rather than evolving independently among repeats (Drouin and Moniz de Sá 1995). According to results described for teleost fishes of the genus *Leporinus*, the homogenization in the repeat units is greater within a specific cluster even among different species than between two clusters in the same species (Martins and Galetti 2001). Since the 5S rRNA genes are highly conserved, several authors have reflected on the usefulness of these regions as molecular markers for phylogenetic surveys among relatively far-isolated eukaryotes taxa (Suzuki et al. 1994; Pendás et al. 1995; Cronn et al 1996; Baker et al. 2000; Robles et al. 2005). Conversely to conserved pattern of 5S rRNA gene sequences, NTSs present an extensive variation in base composition and length caused by insertions/deletions, minirepeats and pseudogenes, which are frequently species-specifics and confer an accentuated dynamism to the 5S rDNA repeats (Williams and Strobeck 1985). Thus, these sequences have been chosen for inferring phylogenetic relationships at the interspecific and intergeneric levels owing to its faster rate of variance in comparison to 5S coding region. Also, the NTSs neutral condition, i.e. free (or almost free) of selective pressure, become them valuable markers for population and/or species characterization (Martins and Wasko 2004). However, a special attention must be take in account when NTS is used for phylogenetic analysis, since the 5S rDNA show a complex organization with the presence of paralogous copies in the genome (Martins and Galletti 2001).

Existing data uphold the argument that the 5S rRNA gene is quite conserved even among unrelated species (for review see Martins and Wasko 2004). This condition arises from the essential function of 5S rRNA molecule on enhancing the protein synthesis by stabilizing ribosome structure (Miroslawa et al. 2001). Furthermore, the 5S rRNA gene presents internal

control regions (ICRs) that are active as promoters for transcription and show a high level of conservation inside vertebrate clade. The “box A” is a general ICR sequence for RNA polymerase enzyme while the intermediate element (IE) and the “box C” are specific to the 5S rRNA transcription working as binding sites for the transcription factor TFIID (Pieler et al. 1987).

Although non-transcribed DNA sequences such as the NTSs seem to have no value for the genome, some studies in mammals and fishes have suggested that a TATA or TATA-like sequence located inside NTSs of these animals play a regulatory function on the 5S rRNA gene expression (Sollner-Webb 1988; Nederby-Nielsen et al. 1993; Rocco et al. 1999; Inafuku et al. 2000; Martins et al. 2000; Hallenberg and Frederiksen 2001). Microsatellites sequences exist in the NTSs also has been founded in some fish species (Deiana et al. 2000; Gornung et al. 2000; Alves-Costa et al. 2006), including elasmobranchs (Pasolini et al. 2006), and could be linked to regulatory functions of the 5S rRNA gene, that still remains to be better explained (Ota et al. 2003).

Data regarding vertebrates have reported the occurrence of different 5S rDNA classes for mammals (Hallenberg et al. 1994; Frederiksen et al. 1997). Vast data relatives to the structural and functional organization of the 5S rRNA genes has been generated for marine and freshwater bony fishes (Moran et al. 1996; Rocco et al. 1999; Céspedes et al. 1999; Deiana et al. 2000; Wasko et al. 2001; Martins and Galletti 2001a; Martins et al. 2002; Messias et al. 2003; Tigano et al. 2004; Alves-Costa et al. 2006). These studies have detected the occurrence of a double 5S rDNA size-class system, suggesting that this condition is a common feature for the group. In contrast, the structure and organization of the 5S rDNA has only been characterized in less than 1% of the nearly 1100 living Chondrichthyes species (Compagno 1999). Available data about sharks and rays (or skates) refers to 5S rRNA gene coding region sequence in one Carcharhiniform (*Scyliorhinus caniculus*, by Wegnez et al. 1978) and entire 5S rDNA repeats in six Rajiformes (*Raja montagui* and *Taeniura lymma*, by Rocco et al. 2005; *Raja asterias*, *R. clavata*, *R. polystigma*, *R. miraletus* and *Dipturus oxyrinchus*, by Pasolini et al. 2006). This relative poor knowledge on the genome structure and organization in chondrichthyes invited us to look closely to explain the process of 5S rDNA evolution not only in such fishes but also in vertebrate group. Previous studies reported the occurrence of two 5S rDNA classes in Rajidae elasmobranchs (Pasolini et al. 2006), suggesting that a double system, such detected in teleost fishes could also be a common pattern for the 5S rDNA organization in elasmobranchs.

Thus, in order to advance the understanding on the dynamics and evolution of 5S rRNA gene arrays in elasmobranchs, an evaluation on the structure and organization of the 5S rDNA in the genome of two shark species is report here. In addition, a comparative analysis of the present data and available data on lampreys, bony fish and other elasmobranchs was carried out in attempt to elucidate the evolution of 5S rDNA among vertebrates.

Material and Methods

Sampling and DNA Isolation

Shark specimens analyzed were taken from distant areas, presumably contemplating different populations. The Brazilian coast points of capture were: *R. lalandii*, Ubatuba-SP, Praia Grande-SP and Itanhaém-SP (n = 30); and *R. porosus*, Ubatuba-SP, Aracaju-SE and Fortaleza-CE (n = 28). Fin clip and gill tissues were collected from fresh or recently frozen animals and immediately immersed in tubes containing pure ethanol. Individuals were identified and preserved in the fish collection of the Laboratório de Biologia e Genética de Peixes-UNESP, Botucatu, SP, Brazil under the voucher number LBP-3001. The genomic DNA was successfully isolated from shark samples based on Aljanabi and Martinez (1997) protocol, which present an alternative procedure without handling with environmentally hazardous reagents as phenol and chloroform.

PCR Amplification, Cloning and Sequencing

The entire 5S rRNA gene and NTS were amplified from total genomic DNA by *Polymerase Chain Reaction* (PCR). The set of primers Cart5S1F (5'-CAC GCC CGA TCC CGT CCG ATC-3') and Cart5S1R (5'-CAG GCT AGT ATG GCC ATA GGC-3') were designed based in the 5S rRNA gene sequence of the elasmobranchs *Taeniura lymma* (AY278251) (Rocco et al. 2005) and *Scyliorhinus caniculus* (M24954) (Wegnez et al. 1978). After the sequencing of PCR fragments obtained, a new set of primers Cart5S2F (5'- TGG GAG ACC GCC TGG GAA -3') and Cart5S2R (5'- CCA AGT ACT AAC CAG GCC - 3') was designed to amplify the early annealing regions of Cart5S1F and Cart5S1R primers, allowing the complete sequencing of the 5S rRNA gene. PCR reactions had 25 µl of total volume which contained 2 U of *Taq* polymerase, 1× *Taq* buffer, 1.5 mM of MgCl², 200 µM of dNTPs, 100 pmol of each primer, and ~30 ng of genomic DNA. Reactions background were 35 cycles of 1 min at 95 °C, 30 s at 55 °C, and 45 s at 72 °C, with a 5-min final extension at 72 °C. A negative control was also included to check any contamination. PCR

products were assessed by electrophoresis in 1.25 % agarose gels and visualized by ethidium bromide staining and ultraviolet illumination. The DNA amplified fragments were purified using the kit GFX PCR Purification (GE Healthcare), inserted into pGEM-T plasmids (Promega) that were used to transform *E. coli* DH5 α competent cells (Invitrogen) according to Sambrook and Russel (2001). Positive clones were sequenced on the ABI Prism 377 automatic DNA sequencer (Perking-Elmer) with the kit DYEnamicTM ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare), following the manufacturer instructions.

Sequence analysis

Nucleic acid sequences were subjected to BLASTn (Altschul et al. 1990) searches at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), and the sequence alignment was performed using the computer program Clustal W (Thompson et al. 1997) and checked by hands. The whole 5S rDNA sequences retrieved from *Rhizoprionodon* sharks were deposited in GenBank (Accession Numbers: XXXXXXXX). Sequences of 5S genes from different vertebrate taxa used in comparative and evolutionary analysis were obtained from Pasolini et al. (2006) and in the NCBI database. Neighbor- Joining (NJ) analyses employing the Kimura-2-parameter genetic distance model (Kimura 1980) were carried out on the entire 5S rDNA and on 5S gene and NTS sequences separately using the software MEGA 3.1 (Kumar et al. 2004). Sequence composition and diversity among clones was examined with software BioEdit 7.0 (Hall 1999). Bootstrap resampling (Felsenstein 1985) was applied to assess support for individual nodes using 1000 replicates.

Results

Amplification and sequence analysis of 5S rDNA

The pairs of primers Cart5S1F/R and Cart5S2F/R allowed the amplification by PCR of the whole 5S rDNA repeats in *Rhizoprionodon* sharks. Two fragments of roughly 465 bp and 185 bp (hereafter referred as class I and class II, respectively) were obtained for both species and the BLASTn search confirmed that the obtained sequences correspond to 5S rDNA repeat units. These units consisted of a 120 bp coding region (5S rRNA gene) as well as a NTS of variable length and composition (Figure 1). A clear difference between the 5S rDNA classes was the number of thymidine residues located in the T-rich tail region of the 5S rRNA gene: four thymidines in class I and five in class II (Figure 1). These repeated sequences correspond to transcriptional terminators (Korn and Brown 1978).

Sequencing of 49 clones showed that each class of 5S rDNA was characterized by distinct NTS and 5S rRNA genes sequences (Figure 1), which presented variable levels of genetic divergence (Table 2). The GC content in 5S rRNA genes of class I and class II of *R. lalandii* were 52.5 % and 54.7 % respectively, while *R. porosus* exhibited rates of 53.1 % for class I and 55.2 % for class II. The sharks 5S rRNA gene sequences presented some class-specific base substitutions. Regarding *R. porosus*, the coding sequences class I and class II presented two and six base substitutions, respectively, whereas in *R. lalandii* these value was four substitutions for each class. Common alterations detected in the 5S rRNA genes of class II in relation to those of class I are indicated in the Table 3. A transition at position 116 (G → A) became sharks class I genes free of *Hind* III restriction site (extensively conserved among bony fishes), and previously also described for rays species (Pasolini et al. 2006). In general, these base shifts were detected outside ICRs. When in ICRs they are present in Box A and/or Box C, but never in IE (Figure 1).

Sequence analysis of NTSs

A poor relationship was detected among the different NTS classes between or within species, as these classes were separated in individual branches on relationship surveys with bootstrap value of 100 % in NJ tree (Figure 2b). NTSs diverged deeply in length (class I: 343 bp and class II: 64-68 bp), base composition (mean values of GC content: class I = 61.4 % and class II = 49.6 % in *R. porosus*; class I = 62.1 % and class II = 53.4 % in *R. lalandii*), and in nucleotide sequence with few similarity (Figure 1). The mean genetic distance of NTS classes, considering all clones from the two species, was highly variable (NTS I: 0.025 ± 0.007 ; NTS II: 0.257 ± 0.094). NTS II spacers from *R. lalandii* and *R. porosus* did not match in nucleotide sequence. By contrast NTS I in these species showed large identical sequences (e.g. positions 29-97). However five species-specific sites located at positions 98, 207, 254, 337 and 338, were sufficient to detach all *R. lalandii* sequences from those of *R. porosus* (Table 1). The NTS I paralogous and orthologous sequences length only varied faintly in *R. porosus*, ranging from 335 to 343 bp while all *R. lalandii* class I clones presented 343 bp. Such variation detected only in *R. porosus* was related to the variable number of [TCCC]_n motifs identified at positions 251-270 in this species.

TATA-like elements, believed to be regulatory regions for 5S rRNA gene transcription, also appears in the NTSs of sharks. These elements were found to be modified to AATT in NTS I and TAAA in NTS II (Figure 1).

5S rDNA in Elasmobranchii and Teleostei: comparative surveys

Numerous phylogenetic analyses were carried out between and within the *Rhizoprionodon* species. These analyses have considered separately: the entire 5S rDNA sequences, only the 5S coding regions and just the NTSs. The clustering of 5S sequences in two distinct classes was supported by 5S rDNA, NTS and 5S coding region trees (Figure 2 a,b,c,d). Comparative analyses carried out within 5S gene classes of *R. lalandii* and *R. porosus* did not allowed us to point species-specific nucleotide sites which discriminate these species. In the phylogenetic analysis the two classes of 5S genes were separated by a high bootstrap value (91) but the species were not separated in distinct branches of the tree (Figure 2d).

Another interesting fact was the presence of a 5S rDNA dual pattern in all specimens checked independently of population origin. Additionally, it was not found differences among paralogous 5S genes or NTS sequences of the same 5S rDNA class of *Rhizoprionodon* sharks from distinct populations. Phylogenetic relations among paralogous and ortologous 5S genes sequences of 8 elasmobranches species (2 orders), several teleostei orders, amphibians, reptiles, birds and mammals were constructed using NJ analysis. All trees assembly the elasmobranches species in an isolate clade supported by 70% of bootstrap value, whereas 5S genes of class II clustered closely to bony fish (Figure 3).

Discussion

5S rDNA classe I and classe II in Rhizoprionodon sharks: does it mean a dual 5S rDNA system for elasmobranches?

PCR and sequencing results unequivocally demonstrated that two size-classes of 5S rDNA gene units, differentiated by distinct coding and NTS sequences, are present within the genome of the carcharhinidae sharks *R. lalandii* and *R. porosus*. The existence of 5S rDNA variant copies has been reported for several mammals and amphibians (Komiya et al. 1986; Little and Braaten 1989; Leah et al. 1990; Frederiksen et al. 1997). Different types of 5S rDNA repeats, especially characterizing a double-class pattern, also have been previously documented in several bony fish species (Pendás et al. 1995; Sadjak et al. 1998; Martins and Galetti 2001a; Alves-Costa et al. 2006) and some elasmobranches of the Rajidae family (Pasolini et al. 2006). The accumulated data have demonstrated that the presence of 5S rDNA classes seem to be a general trend for teleost fishes and a consequence of the intense dynamism of these tandem repeat elements in the genome (Martins and Galetti 2001b). Therefore, it is likely that the two 5S rDNA classes correspond to two distinct subfamilies of

5S rRNA genes. These finds uphold the complex organization of this repeated element in fishes. 5S rRNA gene classes differently regulated in somatic and oocyte cells were described for several vertebrates, including lampreys and bony fishes (Komiya et al. 1986). Experiments of gene expression would be of great value to check any differential expression pattern of both 5S gene classes detected in the *Rhizoprionodon* sharks.

Sharks exhibited a higher similarity in the 5S rDNA units within a specific class even among the two different species than between two classes in the same species. This probably occurred because the 5S rDNA have the tendency for homogenization of the different copies that are arrayed in a same cluster, which can differ extensively from the copies of a second 5S cluster (Martins and Galetti, 2001; Martins and Wasko, 2004). Such observation was clearly evidenced in the organization of the 5S rDNA in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Martins et al. 2002) and in the South American species of the genus *Leporinus* (Martins and Galetti 2001). It has been believed that multigene families evolve according to homogenization processes governed by molecular drive and concerted evolution, resulting in a sequence similarity of the repeat units that is greater within than between species (Dover 1986; Elder and Turner 1995). Molecular routes that lead to concerted evolution are unequal crossing-over, gene conversion and replication slippage, but the rate at which the variant repeat types become homogenized depends upon other aspects such as the amount of repeats in an array, strength of natural selection and effective population size (Schlötterer and Tautz 1994). Thus, discrepancies observed in the obtained sequences (i.e. variable length and base composition) must be the product of normal levels of divergence between orthologous genes in *Rhizoprionodon* species. Moreover, the high level of transitions versus transversions in these species, suggests that homogenizing forces were acting strongly across the 5S rDNA transcribing region, thus preserving the ribosome function.

NTS analyses

A variable degree of similarity was found within each class of NTSs in *Rhizoprionodon spp.* While the NTS I show a much conserved pattern, the NTS II was diverse and seems to evolve faster than the NTS I. However, both classes of NTS branched out *R. lalandii* from *R. porosus* in phylogenetic trees (Figure 2b,c)

Although non-transcribed DNA sequences such as the NTSs seem to have no function, it has been recently demonstrated that the presence of conserved elements located inside this non-transcribed spacer also plays an important role in the regulation of the 5S rRNA gene expression in mammals (Nederby-Nielsen et al. 1993, Hallenberg and Frederiksen 2001). In

fishes, a conserved TATA-like sequence has been observed upstream the 5S rRNA gene in several teleostei, as *Salmo salar* (Pendás et al. 1994), *Carassius auratus* (Murakami and Fugitani 1998), *Coregonus* (Sajdak et al. 1998), *Gasterosteus aculeatus* (Rocco et al. 1999), *Acheilognathus tabira*, *Cyprinus carpio* (Inafuku et al. 2000), *Oreochromis niloticus* (Martins et al. 2000), *Brycon* (Wasko et al. 2001) and *Leporinus* (Martins and Galetti 2001a), suggesting a possible influence in the transcription level of this gene. In elasmobranchs, such sequences were detected in five rajid species (Pasolini et al. 2006), but no data regarding sharks had been reported earlier. In this paper, the analysis of upstream sequences of 5S rRNA genes from *Rhizoprionodon* identified an upstream TATA-like control element at positions -25 in NTS I and -30 in NTS II, interestingly, the same positions recognized in rajid spacers (Pasolini et al. 2006). Although the role of these sequences for 5S genes transcription is still unknown, is intriguing the high conservation of TATA-like sequences positions in elasmobranchs species currently studied. This subject suggests some structural pattern for such elements shared by elasmobranchs, in opposition to bony fishes, where the TATA-like sequences had an irregular position among different genera.

Comparative analysis of 5S rRNA genes among Chondrichthyes, Osteichthyes and other vertebrates

Cartilaginous fish correspond to the ancestor of tetrapods and bony fishes and diverged from other vertebrate lineages about 500 million years ago (Kumar and Hedges, 1998). Describing the cartilaginous fish genome is, therefore, essential for gaining insights into the ancestral condition of vertebrate genomes. In this study, a comparative analysis of 5S rDNA repeats from shark species with those of other vertebrates leads us to several interesting reflections. From relationship analyses it could be verified that the 5S rRNA genes class II of *R. lalandii* and *R. porosus* are similar to those detected in Rajid species as well as in classes I and II of several teleostei. By contrast, class I resemble long sequences exclusive of cartilaginous fishes. This suggests that the different 5S rDNA classes of teleostei have been originated from an ancestral form class II-like, still existent in elasmobranchs. Interestingly enough, the *Rhizoprionodon* 5S class I sequences had no recognizable homologs in lampreys that also have 5S genes class II type. Concerning 5S class I genes, were found in *Rhizoprionodon* sharks, some regions common to elasmobranch fish and also, others conserved within all vertebrate group, except bony fishes (Supplementary data in annex). Considering the burst of genome duplications around 350-600 MY ago during early chordate evolution (McLysaght et al. 2002), is possible that duplications before the divergence between

Chondrichthyes and the ancestor of Osteichthyes have created new paralogous copies on 5S rRNA gene families currently existing in these groups but absent in lampreys. Thus, the evolution of a second 5S rRNA gene class would have arise isolatable in cartilaginous fishes, explaining the existence of own sequences for the paralogous copies of 5S rRNA genes in these animals.

In relation to the role of the different elasmobranch gene classes, more studies are necessary to clarify their expression and functionality. The presence of control elements in the NTS-I and NTS-II, the T-rich tail in the 3' ending of the gene and conserved ICRs in both *Rhizoprionodon* species suggests that the two kind of the 5S rRNA genes might be functional in sharks.

References

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692-4693
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Alves-Costa FA, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F, Martins C (2006) Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in Tilapiini fishes. *Genetica* 127:243-252
- Baker WJ, Hedderson TA, Dransfield J (2000) Molecular phylogenetics of *Calamus* (Palmae) and related rattan genera based on 5S nrDNA spacer sequence data. *Mol Phyl Evol* 14:218-231
- Barciszewska MZ, Szymanski M, Erdmann VA, Barciszewski J (2001) Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim Pol* 48:191-198
- Céspedes A, Garcia T, Carrera E, Gonzalez I, Fernandez A, Hernandez PE, Martin R (1999) Identification of sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J Agric Food Chem* 47:1046-1050
- Compagno LJV (1999) Systematics and body form. In: Hamlett, WC (Ed.), *Sharks, Skates and Rays: The Biology of Elasmobranch Fish*. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, pp 1-42
- Cronn RC, Zhao X, Paterson AH, Wendel JF (1996) Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *J Mol Evol* 42:685-70
- Deiana AM, Cau A, Salvadori S, Coluccia E, Cannas R, Milia A, Tagliavini J (2000) Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Perciformes,

- Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome. *Chromosome Res* 8:213-218
- Dover GA (1986) Linkage disequilibrium and molecular drive in the rDNA gene family. *Genetics* 122:249-252
- Drouin G, Moniz de Sá M (1995) The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol* 12:481-493
- Elder Jr JF, Turner BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol* 70:277-320
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Frederiksen S, Cao H, Lomholt B, Levan G, Halleberg C (1997) The rat 5S rRNA bona fide gene repeat maps to chromosome 19q12→qter and the pseudogene repeat maps to 12q12. *Cytogenet Cell Genet* 76:101-106
- Gornung E, De Innocentiis S, Annesi F, Sola L (2000) Zebrafish 5S rRNA genes map to the long arms of chromosome 3. *Chromosome Res* 8:362-362
- 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
- Halleberg C, Nederby-Nielsen J, Frederiksen S (1994) Characterization of 5S rRNA genes from mouse. *Gene* 142:291-295
- Halleberg C, Frederiksen S (2001) Effect of mutations in the upstream promoter on the transcription of human 5S rRNA genes. *Biochim Biophys Acta* 91565:169-173
- Inafuku J, Nabeyama M, Kikuma Y, Saitoh J, Kubota S, Kohono S (2000) Chromosomal location and nucleotide sequences of 5S ribosomal DNA of two cyprinid species (Osteichthyes, Pisces). *Chromosome Res* 8:193-199
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120
- Komiya H, Hasegawa M, Takemura S (1986) Differentiation of oocyte- and somatic-type 5S rRNAs in animals. *J Biochem* 100:369-374
- Korn LJ, Brown DD (1978) Nucleotide sequence of *Xenopus borealis* oocyte 5S DNA: comparison of sequences that flank several eucaryotic genes. *Cell* 15:1145-1156
- Kumar S, Hedges SB (1998) A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* 392:917-920

- Kumar S, Tamura K, and Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163
- Leah R, Frederiksen S, Engberg J, Sorensen PD (1990) Nucleotide sequence of a mouse 5S rRNA variant gene. *Nucleic Acids Res* 18:7441-7441
- Little R, Braaten D (1989) Genomic organization of human 5S rDNA and sequence of one tandem repeat. *Genomics* 4:376-383
- Long EO, David IB (1980) Repeated genes in Eukaryotes. *Ann Rev Biochem* 49:727-764
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Wright JM (2000) Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. *Hereditas* 133:39-46
- Martins C, Galetti Jr PM (2001a) Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct non-transcribed 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, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempa PP, Wright JM, Foresti F (2002) Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet Genome Res* 98:78-85
- Martins C, Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In Williams CR (ed) *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, pp 335-363
- McLysaght A, Hokamp K, Wolfe KH (2002) Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nature* 31:200-202
- Messias LH, Ferreira DC, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F, Martins C (2003) 5S rDNA organization in the fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchidae, Synbranchiformes). *Hereditas* 139:228-231
- Móran P, Martínez JL, Garcia-Vásquez E, Pendás AM (1996) Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet Cell Genet* 75:145-150
- Murakami M, Fujitani H (1998) Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid gimbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). *Genes Genet Syst* 73:9-20

- Nederby-Nielsen J, Hallenberg C, Frederiksen S, Sorensen PD, Lomholt B (1993) Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 26:3631-3636
- Ota K, Tateno Y, Gojobori T (2003) Highly differentiated and conserved sex chromosome in fish species (*Aulopus japonicus*: Teleostei, Aulopidae). *Gene* 317:187-193
- Pasolini P, Costagliola D, Rocco L, Tinti F (2006) Molecular organization of 5S rDNA in Rajidae (Chondrichthyes): Structural features and evolution of piscine 5S rRNA genes and nontranscribed intergenic spacers. *J Mol Evol* 62:564-574
- Pendás AM, Moran P, Freije JP, Garcia-Vasquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Cell Genet* 67:31-36
- Pendás AM, Mórán P, Martínez JL, Garcia-Vásquez E (1995) Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brow trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Molecular Ecol* 4:275-276
- Pieler T, Hamm J, Roeder RG (1987) The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* 48:91-100
- Robles F, de la Herran R, Ludwig A, Rejon CR, Rejon MR, Garrido-Ramos MA (2005) Genomic organization and evolution of the 5S ribosomal DNA in the ancient fish sturgeon. *Genome* 48:18-28
- Rocco L, Russo C, Stingo V, Aprea G, Odierna G (1999) Characterization of 5S rDNA in *Gasterosteus aculeatus* (Teleostei, Gasterosteidae). *Ital J Zool* 66:285-289
- Rocco L, Costagliola D, Fiorillo M, Tinti F, Stingo V (2005) Molecular and chromosomal analysis of ribosomal cistrons in two cartilaginous fish, *Taeniura lymma* and *Raja montagui* (Chondrichthyes, Batoidea). *Genetica* 123:245-253
- Sajdak SL, Reed KM, Phillips RB (1998) Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *J Mol Evol* 46:680-688
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2344 pp
- Schlötterer C, Tautz D (1994) Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. *Curr Biol* 4:777-783
- Sollner-Webb B (1988) Surprises in polymerase III transcription. *Cell* 52:153-154

- Suzuki H, Moriwaki K, Sakurai S (1994) Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs. *Mol Biol Evol* 11:704-710
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res* 24:4876-4882
- Tigano C, Rocco L, Ferrito V, Costagliola D, Pappalardo AM, Stingo V (2004) Chromosomal mapping and molecular characterization of ribosomal RNA genes in *Lebias fasciata* (Teleostei, Cyprinodontidae). *Genetica* 121:95-100
- Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galetti Jr PM (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44:893-902
- Wegnez M, Denis H, Mazabraud A, Clerot JC (1978) RNA accumulation during oogenesis of the dogfish *Scyliorhinus caniculus*. *Biochemical research on oogenesis. Dev Biol* 62:99-111
- Williams SM, Strobeck C (1985) Sister chromatid exchange and the evolution of rDNA spacer length. *J Theor Biol* 116:625-636

Table 1. Nucleotide variations in the NTS I among the two analyzed shark species.

NTS class I					
Nucleotide position	98	207	254	337	338
<i>R. lalandii</i>	C	C	T	G	C
<i>R. porosus</i>	G	G	C	A	G

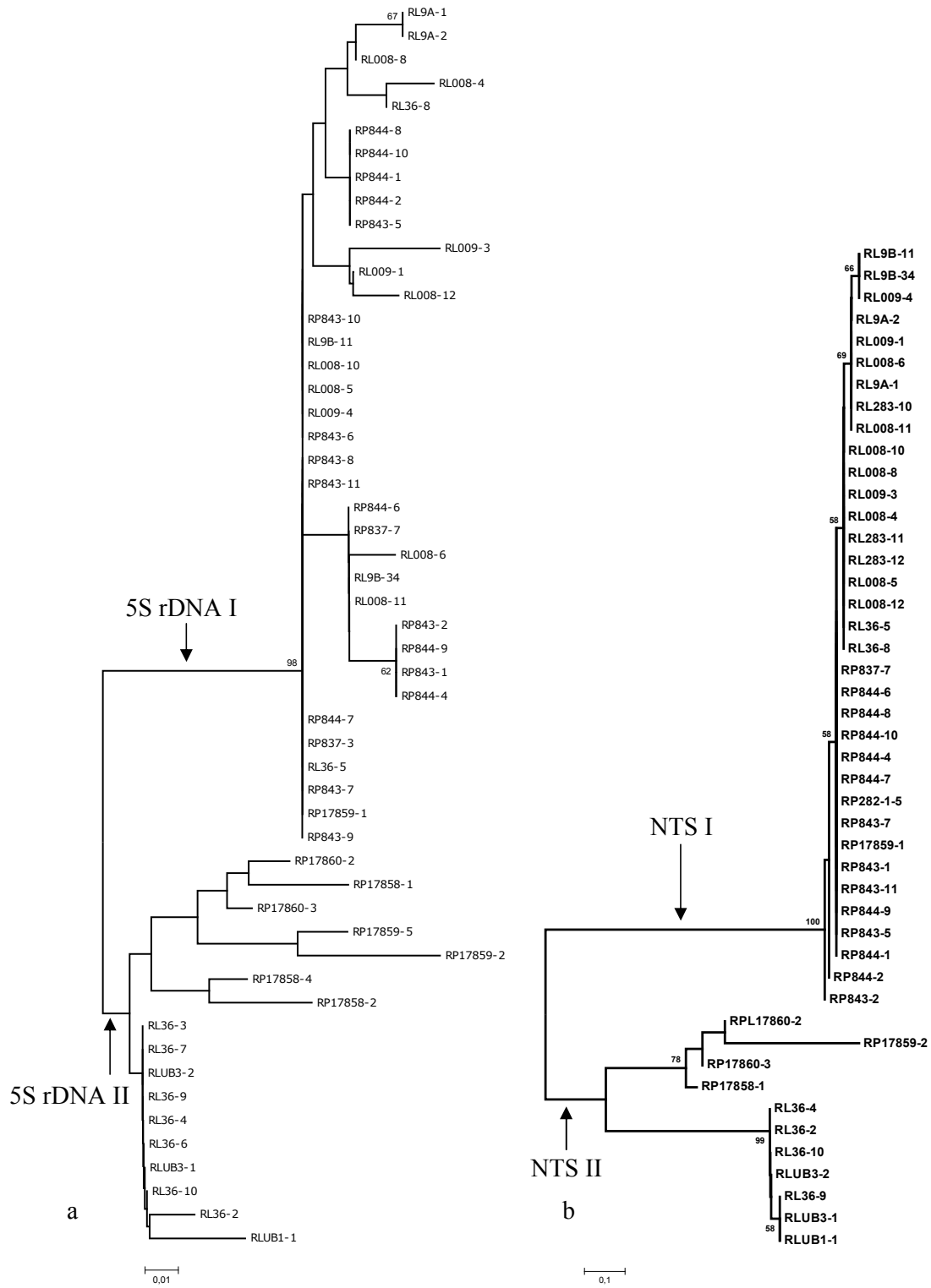
Table 2. Genetic distance of the 5S rRNA genes and NTS classes among *Rhizoprionodon* sharks

	5S rDNA class I			5S rDNA class II		
	NC	L	GD ± SE	NC	L	GD ± SE
5S gene						
<i>R. lalandii</i>	16	120	0.016 ± 0.007	10	120	0.003 ± 0.003
<i>R. porosus</i>	15	120	0.014 ± 0.007	8	120	0.035 ± 0.012
All	31		0.015 ± 0.006	18	120	0.053 ± 0.016
NTS						
<i>R. lalandii</i>	16	338-345	0.008 ± 0.004	10	64-68	0.121 ± 0.035
<i>R. porosus</i>	15	340-348	0.017 ± 0.005	8	67-72	0.136 ± 0.111
All	31		0.025 ± 0.007	18		0.257 ± 0.094

NC, Number of clones; L, length in base pairs GD, Genetic distance; SE, Standard error

Table 3. Comparison of variable nucleotide sites recognized in 5S rRNA gene classes.

Nucleotide sites	5S rRNA gene										
	3	15	18	23	24	40	60	61	64	112	116
<i>Rhizoprionodon</i> class I	C	T	T	A	A	T	A	C	A	A	G
<i>Rhizoprionodon</i> class II	T	C	C	T	T	C	G	G	G	T	A



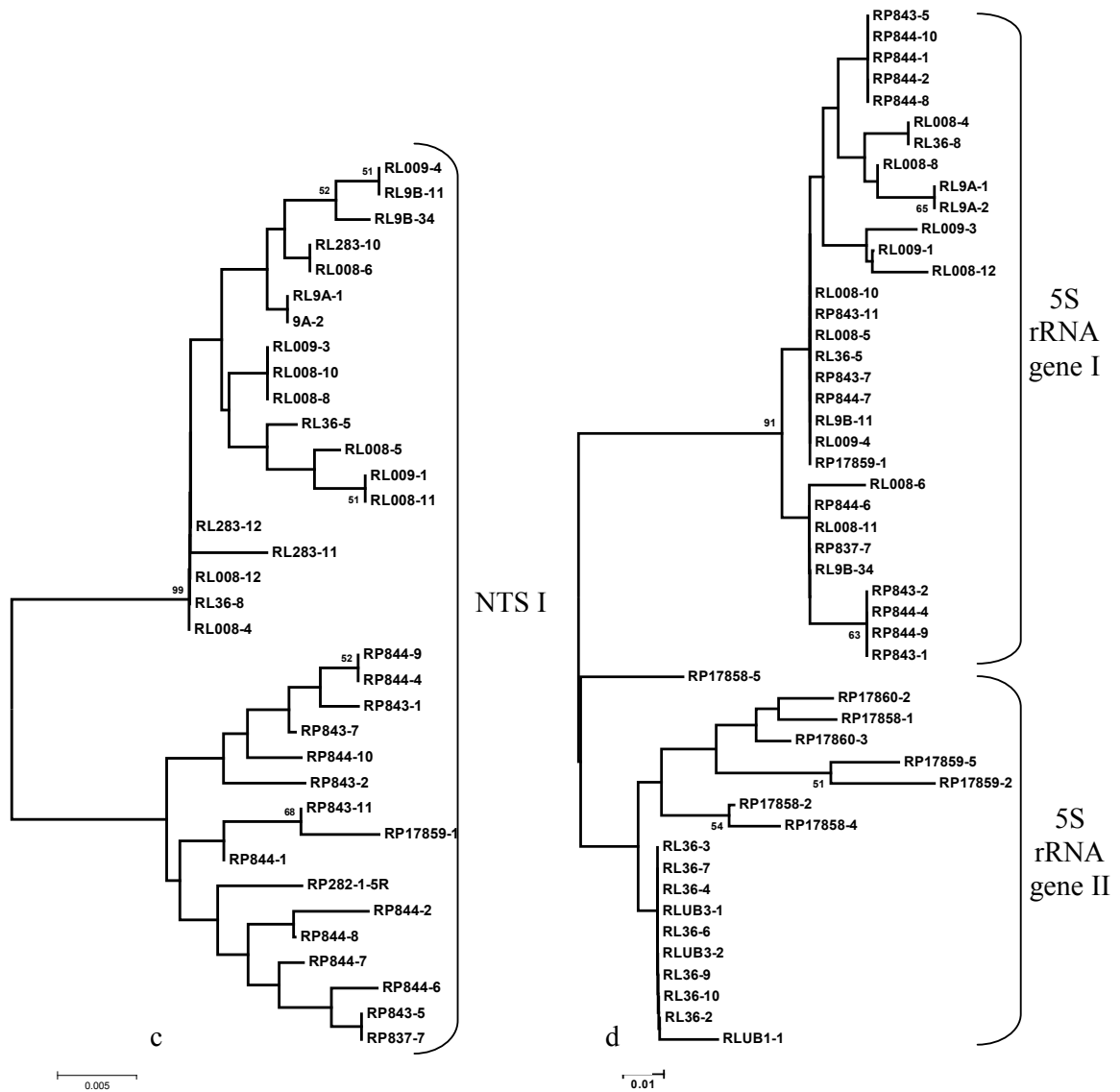


Figure 2. Recovered Neighbor-joining trees for the whole 5S rDNA sequences (A), all NTS sequences (B), NTS I only (C), and 5S rRNA gene only (D). Note in A, B and D the existence of two main branches in the trees discriminating the two 5S rDNA classes. In these trees, the name of the sequences correspond to the first 2 letters of their species names (RL, *R. lalandii* and RP, *R. porosus*) and the number of the clone analyzed. The scale bar indicates the genetic distance based in Kimura-2-parameter analysis. Bootstrap values under 50 are omitted.

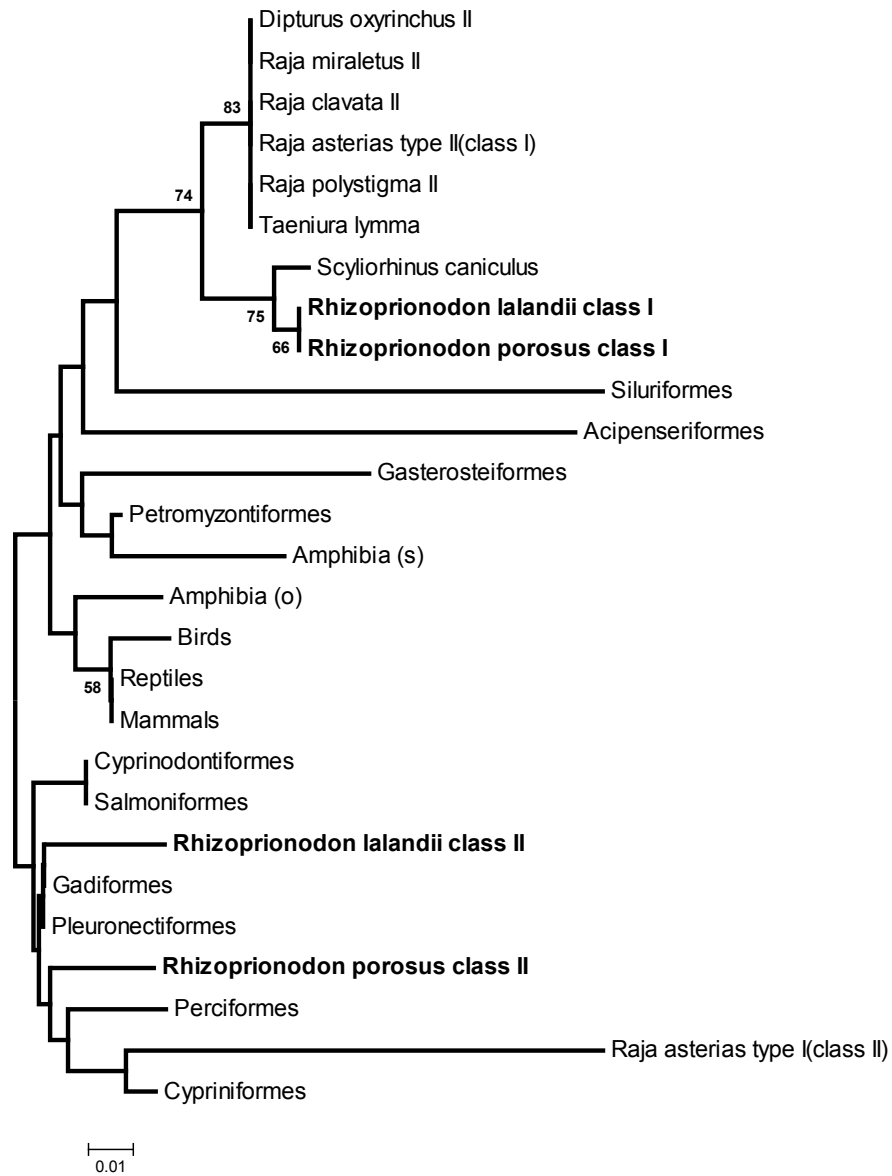


Figure 3. Neighbor-joining tree for the whole 5S rRNA genes of vertebrates. The scale bar indicates the genetic distance based in Kimura-2-parameter analysis. Bootstrap values under 50 are omitted.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os estudos genéticos têm contribuído de modo efetivo para o conhecimento acerca de muitos aspectos da biologia básica e aplicada das espécies de tubarões. Apesar desse avanço recente, o baixo valor econômico dos peixes cartilagosos resultou historicamente numa baixa prioridade dos recursos financeiros destinados à sua pesquisa o que sempre dificultou o conhecimento das espécies. Atualmente a situação mudou em parte, posto que várias espécies de elasmobrânquios tornaram-se alvo da pesca comercial, em substituição às capturas de peixes ósseos, adquirindo alto valor de mercado. Contudo os investimentos em pesquisa nos peixes cartilagosos continuam aquém das necessidades do grupo.

O conjunto de dados gerado pelo presente estudo quanto à identificação de espécies, reforça a importância de investimentos em pesquisa genética aplicada como meio de preservar esses animais. Diversos estudos relativos à pesca, estruturação populacional e comércio mundial dos tubarões mostram que se a exploração desses animais continuar no atual nível, em breve haverá colapso de muitas populações com o possível desaparecimento de espécies. Dessa forma, o aumento do conhecimento científico em nível espécie-específico com o uso ferramentas moleculares associadas às ferramentas clássicas para a identificação de espécies, permitirá a adoção de medidas de manejo e conservação visando a sustentabilidade no uso dos tubarões como recurso pesqueiro.

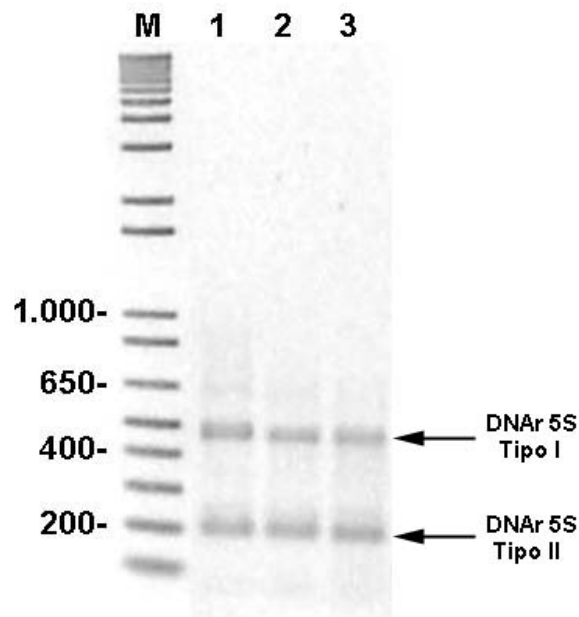
Alguns avanços têm sido obtidos com dados cromossômicos e genômicos gerados, mesmo sendo estes restritos a poucas espécies. Os dados são importantes por possibilitarem a caracterização de espécies ou de populações quanto às relações evolutivas, níveis de variabilidade genética e status de conservação na natureza. Adicionalmente, a compreensão da estrutura e organização dos genomas dos tubarões pode fornecer informações esclarecedoras sobre os mecanismos evolutivos que governam a evolução dos peixes como também nortear o entendimento das relações filogenéticas destes em relação aos demais vertebrados. Dessa forma, os conhecimentos acumulados através da análise do DNAr 5S nos tubarões do gênero *Rhizoprionodon* permitiram esclarecer um pouco da complexidade que governa a evolução do genoma dos organismos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas demonstram que o DNAr 5S pode servir como marcador genético de grande valia para estudos evolutivos e para a identificação de espécies relacionadas de tubarões. A partir do conjunto de dados levantados para o gênero *Rhizoprionodon*, pode-se concluir que a presença de duas classes do DNAr 5S em tubarões corrobora a idéia de que duas classes distintas desse segmento represente uma constante entre as espécies de peixes. Além disso, as análises comparativas dos genes RNAr 5S possibilitam inferir que os elasmobrânquios retêm ainda características de um genoma ancestral a partir do qual ocorreu a diversificação para a condição observada atualmente nos demais vertebrados.

7. APÊNDICES

AP-I. Gel de agarose com produtos de PCR do DNAr 5S obtidos com os primers Cart5S1F/R para *R. lalandii* (1 e 2) e *R. porosus* (3). M, representa marcadores de peso molecular em pares de bases.



AP-II. Alinhamento das seqüências nucleotídicas contendo os NTSS classe I obtidos para *R. lalandii* (RL) e *R. porosus* (RP). As bases que discriminam as seqüências de *R. lalandii* de *R. porosus* estão realçadas na cor cinza. Os pontos representam similaridades na seqüência de bases.

RP 843-7	TTGCTGCCAG	CAGGGGTGC	CCACTAGGCA	GGCTCGGGC	AGTGCCGGCC	CCGAGGCAGC	CAACCTTTTG	GCCGGAGGGA	[80]
RP 844-6	..A.....C.....	[80]
RP 844-9	[80]
RP 843-1	[80]
RP 843-2	[80]
RP 844-1	..A.....C.....	[80]
RP 844-2	..A.....C.....	[80]
RP 844-4	[80]
RP 844-7C.....	[80]
RP 844-8	..A.....C.....	[80]
RP 843-5	..A.....C.....	[80]
RP 844-10	[80]
RP 843-11	..A.....C.....	[80]
RP 837-7	..A.....C.....	[80]
RP 282-1-5RC.....	[80]
RP 17859-1	..A.....G.C.....	[80]
RL283-1-10RC.....	[80]
RL 283-1-1FinvertC.....	[80]
RL 283-1-1RC.....	[80]
RL 008-4C.....	[80]
RL 008-5	T.....C.....	[80]
RL 008-6C.....	[80]
RL 008-8C.....	[80]
RL 009-1	T.....C.....	[80]
RL 009-3C.....	[80]
RL 009-4C.....	[80]
RL 36-5	T.....C.....	[80]
RL 008-10C.....	[80]
RL 008-11	T.....C.....	[80]
RL 008-12C.....	[80]
RL 36-8C.....	[80]
RL 9B-11C.....	[80]
RL 9B-34C.....	[80]
RL 9A-1C.....	[80]

RL 9A-2C.....							[80]
RP 843-7	GGCTGAGGGA CTTTGCTGTG TGCTCTCTGG GAGATGTCGT TGTGGCAAGA TCGACCCGGA AGCGCCAAGC GCACCATCTG							[160]
RP 844-6							[160]
RP 844-9							[160]
RP 843-1						A	[160]
RP 843-2							[160]
RP 844-1						C	[160]
RP 844-2					T		[160]
RP 844-4							[160]
RP 844-7					T		[160]
RP 844-8						C	[160]
RP 843-5						C	[160]
RP 844-10							[160]
RP 843-11							[160]
RP 837-7						C	[160]
RP 282-1-5R						C	[160]
RP 17859-1							[160]
RL 283-1-10R	G						[160]
RL 283-1-1Finvert	C		A				[160]
RL 283-1-1R	C						[160]
RL 008-4	C						[160]
RL 008-5	C						[160]
RL 008-6	C						[160]
RL 008-8	C						[160]
RL 009-1	C						[160]
RL 009-3	C						[160]
RL 009-4	C						[160]
RL 36-5	C						[160]
RL 008-10	C						[160]
RL 008-11	C						[160]
RL 008-12	C						[160]
RL 36-8	C						[160]
RL 9B-11	C						[160]
RL 9B-34	C						[160]
RL 9A-1	C						[160]
RL 9A-2	C						[160]
RP 843-7	TGCTGCCAGC AATATCCACC AGGACGTGCC CAGCGCAGGA TCTCTGGTGT GTCAATGGGG TTGACCC-AA ACACACGTC							[240]
RP 844-6AC.A					C	[240]
RP 844-9AC.A					C	[240]
RP 843-1A				C	C	[240]
RP 843-2						C	[240]
RP 844-1AC.A					C	[240]
RP 844-2AC.A					C	[240]
RP 844-4AC.A					C	[240]
RP 844-7A				C	C	[240]
RP 844-8						C	[240]
RP 843-5AC.A					C	[240]
RP 844-10AC.A					C	[240]
RP 843-11						C	[240]
RP 837-7AC.A					C	[240]
RP 282-1-5RAC.A					C	[240]
RP 17859-1G				G	C	[240]
RL283-1-10RAC.A					C	[240]
RL 283-1-1FinvertAC.A					C	[240]
RL 283-1-1RAC.A					C	[240]
RL 008-4AC.A					C	[240]
RL 008-5AC.A					C	[240]
RL 008-6AC.A					C	[240]
RL 008-8AC.A					C	[240]
RL 009-1AC.A					C	[240]
RL 009-3AC.A					C	[240]
RL 009-4AC.A					C	[240]
RL 36-5AC.A					C	[240]
RL 008-10AC.A					C	[240]
RL 008-11AC.A					C	[240]
RL 008-12AC.A					C	[240]
RL 36-8AC.A					C	[240]
RL 9B-11AC.A					C	[240]
RL 9B-34AC.A					C	[240]
RL 9A-1AC.A					C	[240]
RL 9A-2AC.A					C	[240]
RP 843-7	AGTGTTCCT FCCCTCCCTC CCTCCCTCCG CCTCTGACCA AAGCGGAAAG CCAGGTCCT CTGACCCGTC AGTCTGAATT							[320]
RP 844-6							[320]
RP 844-9							[320]
RP 843-1							[320]
RP 843-2							[320]
RP 844-1							[320]
RP 844-2							[320]
RP 844-4							[320]
RP 844-7							[320]
RP 844-8							[320]
RP 843-5							[320]
RP 844-10							[320]
RP 843-11							[320]
RP 837-7							[320]
RP 282-1-5R							[320]
RP 17859-1							[320]
RL 283-1-10R	T					G	[320]
RL 283-1-1Finvert	T						[320]
RL 283-1-1R	T						[320]
RL 008-4	T						[320]
RL 008-5	T						[320]
RL 008-6	T					G	[320]
RL 008-8	T						[320]
RL 009-1	T					G	[320]
RL 009-3	T						[320]
RL 009-4	T				A	G	[320]
RL 36-5	T						[320]
RL 008-10	T						[320]

RL 008-11T.....G.....	[320]
RL 008-12T.....G.....	[320]
RL 36-8T.....G.....	[320]
RL 9B-11T.....A.....G.....	[320]
RL 9B-34T.....A.....G.....	[320]
RL 9A-1T.....G.....	[320]
RL 9A-2T.....G.....	[320]
RP 843-7	GGCCAGAAGT GAGGGCAGAG ACT	[343]	
RP 844-6T.....T.	[343]	
RP 844-9T.....	[343]	
RP 843-1A.....	[343]	
RP 843-2G.	[343]	
RP 844-1G.	[343]	
RP 844-2	[343]	
RP 844-4T.....	[343]	
RP 844-7T.....-	[343]	
RP 844-8T.....	[343]	
RP 843-5T.....	[343]	
RP 844-10A.....G.	[343]	
RP 843-11A.....G.	[343]	
RP 837-7T.....	[343]	
RP 282-1-5R	[343]	
RP17859-1A.....G.	[343]	
RL 283-1-10RGC..G.	[343]	
RL 283-1-1FinvertGC..G.	[343]	
RL 283-1-1RGC..G.	[343]	
RL 008-4GC..G.	[343]	
RL 008-5	..G.....GC..G.	[343]	
RL 008-6GC..G.	[343]	
RL 008-8GC..G.	[343]	
RL 009-1GC..G.	[343]	
RL 009-3GC..G.	[343]	
RL 009-4GC..G.	[343]	
RL 36-5GC.C.G.	[343]	
RL 008-10GC..G.	[343]	
RL 008-11GC..G.	[343]	
RL 008-12GC..G.	[343]	
RL 36-8A.....CC.A.G.	[343]	
RL 9B-11N.....CC.A.G.	[343]	
RL 9B-34	..G.....N.....CC.A.G.	[343]	
RL 9A-1	..N.....N.....GC..G.	[343]	
RL 9A-2GC.N.G.	[343]	

AP-III. Sequências analisadas referentes às classes I e II do DNA ribossomal 5S nos tubarões do gênero *Rhizoprionodon*. As regiões relativas aos primers Cart5S1F/R foram removidas.

>843-7
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACTAGGCAGGCTGCGGGCAGTGC CGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTGTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAGGACGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 GTGTGTC AATGGGGTTGACCCAAACACTACGTCAGTGTTCCTTCCCTCCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCTC
 TGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGCGAGAGACT

>844-6
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTACTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACTAGGCAGGCTGCGGGCAGTGC CGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTGTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 GTGTGTC AATGGGGTTGACCCAAACACTACGTCAGTGTTCCTTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCTCTGACCCG
 TCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGTGACAGAGACT

>844-9
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTATTTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACTAGGCAGGCTGCGGGCAGTGC CGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTGTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 GTGTGTC AATGGGGTTGACCCAAACACTACGTCAGTGTTCCTTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCTCTGACCCG
 TCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGTGACAGAGACT

>843-1
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTATTTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACTAGGCAGGCTGCGGGCAGTGC CGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTGTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAGGACGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 GTGTGTC AATGGGGTTGACCCAAACACTACGTCAGTGTTCCTTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCTCTGACCCG
 CCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGCGAGAGACT

>843-2
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTATTTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACTAGGCAGGCTGCGGGCAGTGC CGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTGTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAGGACGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 GTGTGTC AATGGGGTTGACCCAAACACTACGTCAGTGTTCCTTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCTCTGACCCG
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCAGAGACT

>844-1
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTACTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACTAGGCAGGCTGCGGGCAGTGC CGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTGTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 GTGTGTC AATGGGGTTGACCCAAACACTACGTCAGTGTTCCTTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCTCTGACCCG
 TCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCAGAGACT

>844-2
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTACTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACTAGGCAGGCTGCGGGCAGTGC CGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTGTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCTGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 GTGTGTC AATGGGGTTGACCCAAACACTACGTCAGTGTTCCTTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCTCTGACCCG
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCAGAGACT

>844-4
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTATTTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACTAGGCAGGCTGCGGGCAGTGC CGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTGTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 GTGTGTC AATGGGGTTGACCCAAACACTACGTCAGTGTTCCTTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCTCTGACCCG
 TCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGTGACAGAGACT

>844-7
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACTAGGCAGGCTGCGGGCAGTGC CGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTGTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCTGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAGGACGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 GTGTGTC AATGGGGTTGACCCAAACACTACGTCAGTGTTCCTTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCTCTGACCCG
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGTGACAGAGACT

>844-8
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTACTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACTAGGCAGGCTGCGGGCAGTGC CGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTGTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAGGACGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 GTGTGTC AATGGGGTTGACCCAAACACTACGTCAGTGTTCCTTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCTCTGACCCG
 TGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCAGAGACT

>843-5

TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACCAGGCAGGCTGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTCTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 CTGTCTCAATGGGGTTGACCCCAAACACTACGCAGTGTTCCTTCCTCCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGGCCCT
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCCGACAGT

>36-5
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGTAGGGGCT
 GCCCACCAGGCAGGCTGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTCTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 CTGTCTCAATGGGGTTGACCCCAAACACTACGCAGTGTTCCTTCCTCCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCCT
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCCGACAGT

>008-10
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACCAGGCAGGCTGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTCTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 CTGTCTCAATGGGGTTGACCCCAAACACTACGCAGTGTTCCTTCCTCCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCCT
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCCGACAGT

>008-11
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGTAGGGGCT
 GCCCACCAGGCAGGCTGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTCTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 CTGTCTCAATGGGGTTGACCCCAAACACTACGCAGTGTTCCTTCCTCCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGGCCCT
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCCGACAGT

>008-12
 TCGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACCAGGCAGGCTGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTCTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 CTGTCTCAATGGGGTTGACCCCAAACACTACGCAGTGTTCCTTCCTCCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCCT
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCCGACAGT

>36-8
 TCGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGCATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACCAGGCAGGCTGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTCTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 CTGTCTCAATGGGGTTGACCCCAAACACTACGCAGTGTTCCTTCCTCCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGTCCCT
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCCGACAAAGT

>9B-11
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACCAGGCAGGCTGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTCTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 CTGTCTCAATGGGGTTGACCCCAAACACTACGCAGTGTTCCTTCCTCCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGGCCCT
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAANTGAGGGCCGACAAAGT

>9B-34
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACCAGGCAGGCTGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTCTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 CTGTCTCAATGGGGTTGACCCCAAACACTACGCAGTGTTCCTTCCTCCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGGCCCT
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAANTGAGGGCCGACAAAGT

>9A-1
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGCATACCAGGTACAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACCAGGCAGGCTGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTCTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCAGTACGTGTTTCCTTCCTTCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGGCCCTCTGACCCGTCAGTCTGAATTGNN
 CAGAANTGAGGGCCGACAGT

>9A-2
 TCGGAAGCTAAGCAGACTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCTGGGCATACCAGGTACAGTAGGCTTTTGTGCCAGCAGGGGCT
 GCCCACCAGGCAGGCTGCGGGCAGTGCCGGCCCCGAGGCAGCCAACCTTTTGGCCGGAGGGAGGCTGAGGGACTTTGCTCTGTGCTCTCTGGGA
 GATGTCGTTGTGGCAAGATCGACCCGGAAGCGCCAAGCGCACCATCTGTGCTGCCAGCAATATCCACCAACAAGTGCCAGCGCAGGATCTCTG
 CTGTCTCAATGGGGTTGACCCCAAACACTACGCAGTGTTCCTTCCTCCCTCCCTCCCTCCGCTCTGACCAAAGCGGAAAGCCAGGGCCCT
 CTGACCCGTCAGTCTGAATTGGCCAGAAGTGAGGGCCGANAGT

>17858-4
 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGTGACCACCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACATCTGGTCATCA
 AAAACAGTCTTCTAAAGTAGACAGGTGGTGATTACATTTGATAAAAACCATATTTTCGAATTTTTTCTTCA

>17859-5
 TCGGAAGCCAAGCAAGTTCGGCCTGGTTAGTACTTGGATAGGTGACCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTGGCCTTCTTTTGT
 CAAAATCACCATATTNANGACATTTNATGATGNCTTTTATANAATAGCAGCNTTNTGAGTNCNATAGCC

>17858-2

ACGGAAGCTAAGCAGGGTCAGGCCTGCTTAGTACTTGGATGGGTGACCACCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTACAGGCTATGGGCC
CCTTAAAAAGTCACGTTACACACGCACATATGCGCCATTTTTCACCTAGCAAATG

>17858-5
TCGGAAGCTAGGCAGGTTACAGCCCTGGTTAGTACTTGGCTGGTTGATTGCATGGGAATACCAGGTGCTGTTAGCTTTTTACAGGCCATGGGCT
GCTTAAAAAGTCACGTTACACACGCACATATGCGCCATTTCTACCTAGCAAATG

>17859-2
TCGGAAGCCAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATAGGTGACTACCTAGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTGCGTCTCCTTTTTCT
CGACTTGTGCCGCAGGCATGCATAAAAGACACATTTCTGGCACGCCCTCATG

>17860-2
TCGGAAGCCAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCCGGTGTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTAGTCT
CTCCGTGGGCCACAGGCATGCATAAAAGACACATTTCTGGCACGCCCTCATG

>17860-3
TCGGAAGCCAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCCGGTGTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTCTCT
CTCCGTGGGCCGCAGGCATGCATAAAAGACACATTTCTGGCACGCCCTCATG

>17858-1
TCGGAAGCCAAGCAAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGAATGGGAGACCCCTGGGAATACCCGGTGTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGTCT
CTCCATGGGCCGCAGGCATGCATAAAAGACACATTTGGCACACACCCCTCATG

>36-2
TCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTCAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGCAG
ACGGACAGCGGTGGCATGTGTAATAGCGTGTGCGCGTGCCCTCGTG

>36-4
TCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGCAG
ACGGACAGCGGTGGCATGTGTAATAGCGTGTGCGCGTGCCCTCGTG

>UB3-1
TCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGCAG
ACGGACAGCGGTGGCATGTGTAATAGCGTGTGCGCGTGCCCTCTTG

>UB3-2
TCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGCAG
ACGGACAGCGGTGGCATGTGTAATAGCGTGTGCGCGTGCCCTCGTG

>UB1-1
TCGGGAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGCAG
ACGGACAGCGGTGGCATGTGTAATAGCGTGTGCGCGTGCCCTCTTG

>36-10
TCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGCAG
ACGGACAGCGGTGGCATGTGTAATAGCGTGTGCGCGTGCCCTCGTG

>36-9
TCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGCAG
ACGGACAGCGGTGGCATGTGTAATAGCGTGTGCGCGTGCCCTCTTG

>36-3
TCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGCAG
ACCACAGACAGTGGTGAATGTGTAATAGCGGTTTTGCGCGTGCCCTCGTG

>36-6
TCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGCAG
ACCACAGACAGTGGTGAATGTGTAATAGCGGTTTTGCGCGTGCCCTCGTG

>36-7
TCGGAAGCTAAGCAGGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGCTTTTTCACTCTCCTTTGCAG
ATCGAGTGCCACAGACAGGGTGAATGTGTAATAGCGGTTTTGCGCGTGCCCTCGTG

8. ANEXOS

AN-I. Sequências consenso parcial do gene ribossomal 5S de diversos grupos de vertebrados recuperadas de bancos de dados e utilizadas no presente trabalho. Sequências MRC (Major Rule Consensus) foram obtidas de Pasolini et al. (2006).

```

Petromyzontiformes MRC TCGGAAGCTAAGCAGGGTCGFGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGTTGTAGGC*TT
Elasmobranchii
S.caniculusM24954 TCGGAAGCTAAGCAGATTACAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCAGTAGGC*TT
Dipturus oxyrinchus c37 TCGGAAGCTAAGCAGGCTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCCGTAGGC*TT
R. miraletus c57 TCGGAAGCTAAGCAGGCTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCCGTAGGC*TT
R. polystigma C36 TCGGAAGCTAAGCAGGCTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCCGTAGGC*TT
R. clavata c05 TCGGAAGCTAAGCAGGCTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCCGTAGGC*TT
R. asteriasc15 typeII TCGGAAGCTAAGCAGGCTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCCGTAGGC*TT
R.asterias type I TCGGAKRCCAAGCAGGTCAGFGCCTGGTCAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGC*TT
T.lymmaAY278251 TCGGAAGCTAAGCAGGCTCAGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCCGTAGGC*TT
Ray-finned fishes
Acipenseriformes MRC TCAGAAGCTAAGCAACGTTGGGCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCACTGGGAATATCAAGTGCTGTAGGCATT
Cypriniformes MRC TCGGAAGCTAAGCAGGTTTGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGC*TT
Cyprinodontiformes MRC TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGC*TT
Gadiformes MRC TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGC*TT
Gasterosteiformes MRC TTGGAAGCTAAGCAGGTCGTGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Perciformes MRC TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTCAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGC*TT
Pleuronectiformes MRC TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGC*TT
Salmoniformes MRC TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACTGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAAGC*TT
Siluriformes TCGGAAGCAAAGCAGAGTTGGGCCTGGTTAGTACTTGGTTGGGAGACTGAATGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Amphibia
Xtropicalis (o) x12622 TCGGAAGCTAAGCAGGGACGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCTGGTGCTGTAGGC*TT
Xtropicalis (s) x12624 TCGGAAGCTAAGCAGGGACGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGTTGTAGGC*TT
Gatrothecariobm74438 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Newtml3611 TCAGAAGTTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTTGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Reptila
Iguanaiguanam10817 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Birds
GallusgallusX01309 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCTCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Mammals
Mfascaf193591 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Rnorvegicusx83746 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Mmusculusx71804 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Hsapiensv00589 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Syrianhamsterj00063 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Ratk01594 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT
Btaurusx57170 TCGGAAGCTAAGCAGGTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGCTGTAGGC*TT

```