

ANÁLISE DA REGIÃO CONTROLADORA DO DNA MITOCONDRIAL, REGIÃO D-LOOP, DE UMA COLÔNIA DE *TADARIDA BRASILIENSIS* (CHIROPTERA: MOLOSSIDAE) NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

**VITOR AUGUSTO DE SOUZA SILVA¹; KARINA SOARES DIAS²; WILLIAM
BORGES DOMINGUES³; JULIANA CORDEIRO⁴; ANA MARIA RUI⁵; FABIO
RICARDO PABLOS DE SOUZA⁶**

¹Universidade Federal de Pelotas – vtrssa@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - kkzinha_dias@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - williamwwe@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas - jlnedr@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - ana.rui@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas - fabiopablos@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Tadarida brasiliensis (Chiroptera, Molossidae) (L. Geoffroy, 1824) é uma espécie amplamente distribuída desde o sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e Chile. No Brasil não ocorre de maneira uniforme, possuindo maior abundância nas regiões sul e sudeste, ocorrendo em baixa densidade nas demais regiões (FABIAN; GREGORIN, 2007).

Apesar de sua ampla distribuição e importância, ainda não existe no Brasil trabalhos que caracterizem as constituições genômicas do DNA mitocondrial de tal espécie. No continente americano, há estudos somente no hemisfério norte (RUSSEL et al., 2005; RUSSEL et al., 2011). O objetivo deste trabalho é identificar a diversidade genética da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) em indivíduos de *T. brasiliensis* coletados na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, a fim de detectar polimorfismos para futuras inferências sobre populações. A região controladora do DNA mitocondrial (região D-loop) foi escolhida por ser um ótimo marcador molecular para estudos de diversidade genética e diferenciação de populações, pelo fato de apresentar herança materna, não sofrer recombinação, possuir altas taxas de mutação, ser facilmente isolado e, para o caso da região D-loop, parecer exercer controle de replicação e transcrição do DNA mitocondrial (ARIAS et al., 2003).

METODOLOGIA

Coletas

Os animais foram coletados de colônia localizada no forro do prédio 40 da UFPel – Campus Capão do Leão. Para a coleta foi utilizada uma rede tipo puçá que foi posicionada na saída do abrigo ao anoitecer. Os animais capturados foram então avaliados quanto ao sexo e idade e mortos por inalação de éter. Posteriormente, em laboratório, foi retirada uma amostra de tecido de músculo peitoral para extração de DNA e realização das análises genéticas.

Análise molecular

Cinco indivíduos, todos fêmea, foram utilizados neste estudo (Tb 001, 003, 004, 005 e 006). O isolamento do DNA total foi realizado utilizando o kit de extração *DNeasy® Blood and Tissue* (Qiagen), seguindo o protocolo padrão informado pelo fabricante.

A região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) foi amplificada utilizando o par de *primers* baseados na sequência já descrita para *T. brasiliensis* (Russel et al., 2005). Para as reações de amplificação foi utilizado o kit *HotStarTaqMasterMix* (Qiagen), sendo que a reação foi preparada em volume final de 25µL contendo 12,5µL de *HotStarTaq DNA Polymerase Master Mix*, 15pMol de cada *primer* e aproximadamente 100ng de DNA. O programa de PCR seguiu as seguintes etapas: 5 min de desnaturação a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 56°C para pareamento dos *primers*, e 1 minuto a 72°C para extensão, finalizando com uma etapa de extensão de 5 min a 72°C. Os produtos de PCR foram conferidos em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed (Biotium). As amostras positivas para o tamanho de aproximadamente 500pb foram purificadas utilizando o método de Exo-SAP (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen (<http://dna.macrogen.com/eng/>). Ambas as fitas (*forward* e *reverse*) foram sequenciadas.

A qualidade dos cromatogramas do sequenciamento foi verificada com o programa FinchTV v1.4.0 (Geopiza, Inc.). As sequências consenso foram montadas com auxílio do pacote de programas StadenPackage, e o alinhamento das sequências com a ferramenta ClustalW contida no programa MEGA6. As relações evolutivas entre as sequências foram inferidas por meio da construção de uma árvore filogenética utilizando o método Neighbor-Joining do programa MEGA6 utilizando teste de *bootstrap* com 1000 réplicas. As distâncias evolutivas foram computadas usando o método Kimura 2-parâmetros, também do programa MEGA6. A sequência D-loop de *Chaerophon pumilus* foi obtida no GenBank e utilizada como grupo externo. A divergência genética foi analisada no programa MEGA6 com o modelo evolutivo dos nucleotídeos Kimura 2-parâmetros. As estimativas de diversidade genética foram calculadas no programa DnaSP5.19. A rede de haplótipos foi construída usando o algoritmo median-joining no programa Network com a finalidade de verificar qual a diferenciação da sequência Tb006 com as demais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA resultou em amostras com concentrações variando de 30 e 120 ng/µL. O PCR resultou na amplificação de um fragmento de cerca de 500pb compatível com o fragmento correspondente à região D-loop do DNA mitocondrial de *T. brasiliensis* descrito por RUSSEL et al. (2005).

O sequenciamento das amostras 001, 003, 004, 005 e 006 resultou em sequências de 538, 497, 536, 554, e 701 nucleotídeos, respectivamente, gerando uma matriz de dados de 504 nucleotídeos. Foram encontrados 110 sítios polimórficos e 95 mutações únicas (*singletons*). A diversidade nucleotídica (π) das sequências foi de 10%, e a diversidade haplotípica (H_d) foi de 100%, o que representa que cada uma das sequências aqui analisadas representa um haplótipo diferente. A Figura 01 apresenta a rede de haplótipos entre as sequências aqui analisadas. O número de mutações entre as sequências é alto, variando, pelo menos, de 09 a 44 mutações. Isto indica que

as sequências destes indivíduos são altamente variáveis. Ainda chama atenção a amostra Tb006 que apresenta o maior número de mutações exclusivas (44). Também foi descrito por RUSSEL et al. (2005) uma alta variação genética em populações de *T. brasiliensis* com ocorrência na América do Norte, sendo identificados cerca de 86 haplótipos em 94 indivíduos. A diversidade nucleotídica entre as sequências foi também baixa e foram identificados 78 sítios variáveis únicos.

A análise de relações filogenéticas entre as sequências, apresentada na Figura 2, mostra o agrupamento das sequências de *T. brasiliensis* apresentando suportes de *bootstrap* variando de 67% a 82%. Pode-se notar que a amostra Tb006 apresenta uma maior diferença evolutiva, apresentado pelo maior tamanho de ramo. Quando analisamos a divergência genética entre as sequências, a média da divergência genética entre todas as sequências é de 10,6%. Quando analisamos a divergência genética par a par, as menores divergências são entre as sequências Tb01, Tb03, Tb04 e Tb05 (variando de 4,9% a 6,9%). Todas as comparações de divergência genética com a sequência Tb006 resultaram em valores maiores que 16% (de 16,1% a 18,7%). Essa variação nos valores de divergência é esperada uma vez que esta região do DNA mitocondrial analisada é altamente variável entre indivíduos de mesma espécie (CARNELOSSI et al., 2008).

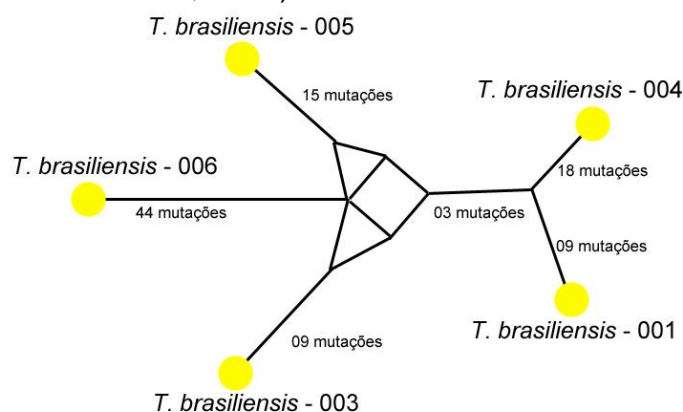


FIGURA 1. Rede de haplótipos construída usando o algoritmo median-joining no programa Network. Os círculos representam diferentes haplótipos, os quais estão identificados com o nome da amostra. Ao lado de cada ramo está identificado o número de mutações exclusivas de cada haplótipo. Entre cada *median vector* ocorreu uma mutação, não identificada na figura.

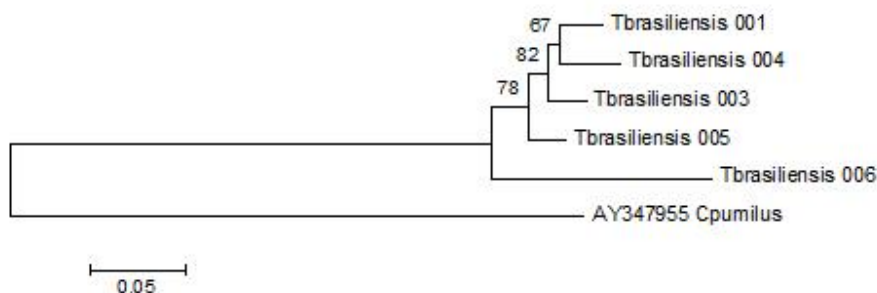


FIGURA 2. Relações filogenéticas entre as cinco sequências de *D-loop* obtidas. Método de reconstrução filogenética: Neighbor-Joining. Modelo de substituição nucleotídica: Kimura 2-parâmetros. 1000 réplicas de *bootstrap*. A sequência AY347955 de *C. pumilus* foi utilizada como grupo externo.

CONCLUSÃO

Estes resultados preliminares indicam uma alta variação genética (com baixa divergência) da região D-loop do DNA mitocondrial de *T. brasiliensis* no município de Capão do Leão no extremo sul do Rio Grande do Sul, Brasil, resultados que se relacionam similarmente aos obtidos em estudos na América do Norte.

Entretanto, para obtermos melhores parâmetros das características entre as populações desta e outras regiões será necessário um banco de dados com maior número de amostras, o que foi feito através das coletas sazonais, porém cujas análises laboratoriais ainda não foram concluídas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, G.A.R.; SANTOS, I.A. **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma, Editora UNESC, 2003, p.1-5.

CARNELOSSI, E.A.G. **Diferenças Moleculares entre citótipos de *Mazama americana* (*Artiodactyla: Cervidae*)**, Jaboticabal, 2008.

FABIÁN, M.E.; GREGORIN, R. Família Molossidae. In: REIS, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. (Ed.) **Morcegos do Brasil**. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 2007, p.149-165.

RUSSEL, A.L.; MEDELLIN, R.A.; McCracken, G.F. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). **Molecular Ecology Resources**, USA, v.14, p.2207-2222, 2005.

RUSSEL, A.L.; COX, M.P.; BROWN, V.A.; McCracken, G.F. Population growth of Mexican free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis mexicana*) predates human agricultural activity. **BMC Evolutionary Biology**, USA, v.11, p.88-96, 2011.