

CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO *D-LOOP* MITOCONDRIAL DE *Tadarida brasiliensis* (CHIROPTERA: MOLOSSIDAE) DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

DANIELA RODRIGUERO WOZEAK¹; JULIANA CORDEIRO²; WILLIAM DOMINGUES³; ANA MARIA RUI⁴; FABIO RICARDO PABLOS DE SOUZA⁵

¹Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, IB, UFPel – danielarwozeak@gmail.com

²Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, IB, UFPel – juliana.cordeiro@ufpel.edu.br

³Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – williamwwe@yahoo.com.br

⁴Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, IB, UFPel – ana.rui@ufpel.edu.br

⁵Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, IB, UFPel – fabio.pablos@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Tadarida brasiliensis (Chiroptera, Molossidae) (I. GEOFFROY, 1824) é uma espécie amplamente distribuída no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. Na América Latina, esta espécie se distribui desde o norte da Colômbia, seguindo ao sul pela região andina do Equador, Peru, Bolívia, Chile. No seu limite sul de distribuição, as populações de *T. brasiliensis* atingem a Argentina, Uruguai e o Brasil. No Brasil, a distribuição dessa espécie não é contínua, tendo sido encontrada, até o presente, grandes populações na região sul, em especial no Rio Grande do Sul, e populações menores no sudeste e centro-oeste (WILKINS, 1989).

Tadarida brasiliensis uma espécie exclusivamente insetívora (WILKINS, 1989), sendo excelentes controladores de insetos, gerando benefícios tanto econômicos como ambientais (CLEVELAND et al. 2006; FREDERICO et al. 2008).

Apesar de sua importância ecológica, econômica e grande distribuição, os trabalhos sobre as características genômicas de *T. brasiliensis* são escassos (RUSSEL et al. 2005). Este trabalho visa descrever a diversidade genética por meio da avaliação dos haplótipos da região controladora do DNA mitocondrial (*D-loop*) em indivíduos de uma população na região sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram coletados um total de 53 indivíduos. A coleta dos animais foi feita no município de Capão do Leão, em colônia localizada no campus da Universidade Federal de Pelotas. Foram realizadas quatro coletas, uma a cada estação, durante um ano. Os animais foram capturados com harp trap, diretamente na saída da colônia, ao entardecer. Para mata-los, foi utilizado éter (Licença ICMBio: 52646-1).

A extração do DNA foi realizada a partir do tecido muscular peitoral, utilizando o kit para extração *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen), seguindo o protocolo padrão disponibilizado pelo fabricante. Para amplificação da região controladora do DNA mitocondrial (*D-loop*) foram utilizados dois primers (*forward* e *reverse*) baseados na sequência de *T. brasiliensis* já descrita por RUSSEL et al. (2005). As reações de amplificação foram feitas com o kit *HotStarTaq MasterMix®* (Qiagen). Cada reação foi preparada com volume final de 25 µL contendo 12,5µL de *HotStarTaq MasterMix®*, aproximadamente 100ng de DNA e 10pmol de cada primer. O programa de amplificação do termociclador foi padronizado utilizando uma temperatura de *melting* de 56°C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1%, e fotografados em transiluminador ultraviolet.

As amostras foram purificadas, utilizando ExoSAP-It (Affymetrix) seguindo, também, o protocolo do fabricante. Logo, foram enviadas para sequenciamento de ambas as fitas (*forward* e *reverse*) na empresa Macrogen.

Para avaliar a qualidade dos eletroferogramas dos sequenciamentos foi utilizado o programa FinchTV v1.4.0 (Geopiza Inc. 2006). Após a avaliação, foi montada a sequência consenso utilizando o software Pregap e Gap4 do pacote de programas StadenPackage (STADEN et al. 2012). O programa MEGA7 (TAMURA et al. 2016) foi utilizado para o alinhamento das sequências usando a ferramenta ClustaW. A diversidade genética foi calculada com o programa DnaSP 5.10 (ROZAS et al. 2010) e a rede de haplótipos foi montada por meio do programa Network 5.0 (Fluxus Technology Ltda. 2016) com o objetivo de observar o compartilhamento de haplótipos e passos mutacionais entre os indivíduos da colônia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sequências do D-loop de todos os indivíduos foram amplificados, resultando em fragmentos com aproximadamente 500pb. Esta variação é compatível com a descrita por RUSSEL et al. (2005) para região *D-loop* do DNA mitocondrial de *T. brasiliensis*.

O sequenciamento das amostras gerou uma matriz de dados de 738pb, sendo encontrados 108 sítios polimórficos e 248 mutações únicas (*singletons*). A diversidade nucleotídica (π) das sequências foi de 6,6% e diversidade haplotípica (Hd) foi de 99,1%. Isto demonstra que, aparentemente, poucas mutações estão envolvidas com a variabilidade de haplótipos na nossa amostra.

A análise das relações haplotípicas revelou uma diversidade de agrupamentos dos haplótipos, como pode ser observado na Figura 1. Isto demonstra que os indivíduos da colônia aqui analisada, apresentam uma alta variabilidade genética. Na análise da rede de haplótipos, observa-se, principalmente, um agrupamento de haplótipos muito similares, em forma de estrela, possuindo poucos passos de mutação (de uma a cinco) de diferença entre eles (Figura 1, direita superior). A presente amostra também apresentou grupos de haplótipos com grandes variações e muitos passos mutacionais (de oito a 172 mutações).

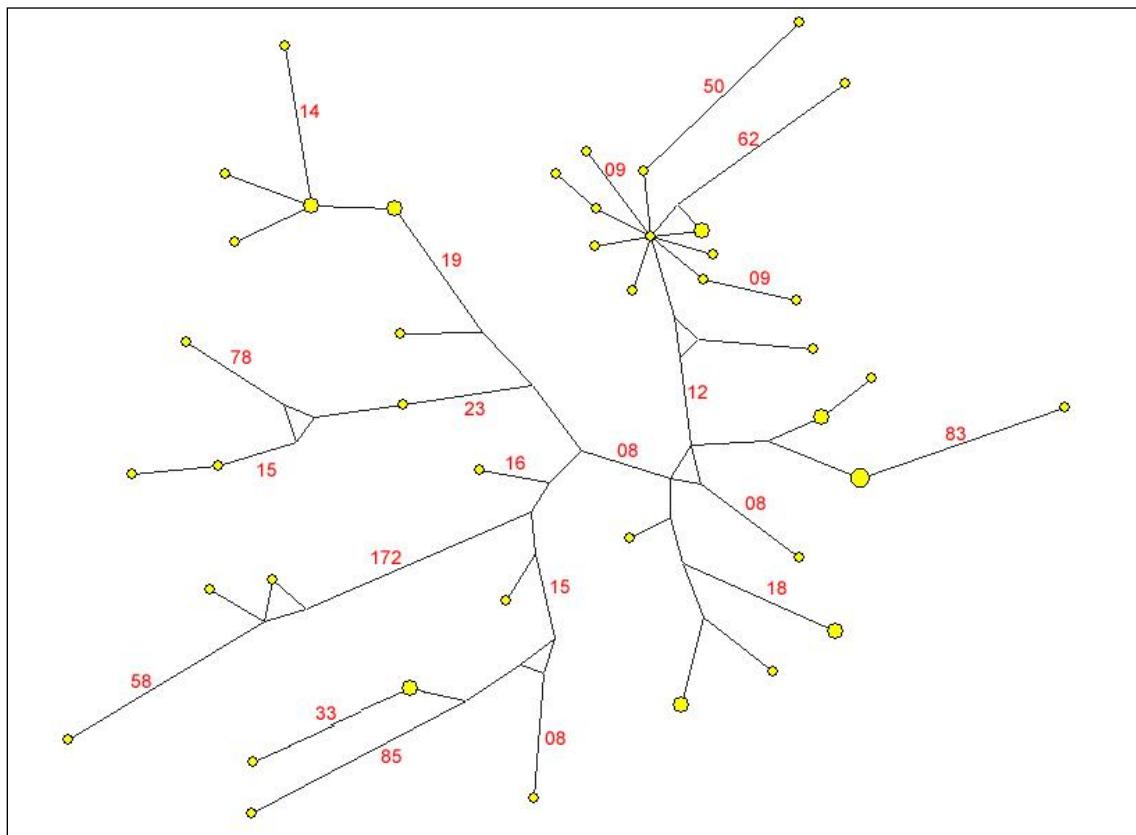


Fig. 1 – Rede de haplótipos de espécimes de *T. brasiliensis* coletadas no município de Capão do Leão, RS, Brasil, construída usando o algoritmo median-joining no programa Network. Os círculos representam diferentes haplótipos, os diâmetros são proporcionais à frequência dos haplótipos. Passos mutacionais menores que 6 foram omitidos da amostra.

4. CONCLUSÕES

Os resultados indicam grande variação na região controladora do DNA mitocondrial, *D-loop*, o que, segundo a literatura, já era esperado, por ser uma região de muita repetição nucleotídica. Com esta análise, observamos que a colônia do Campus Capão do Leão da UFPel é bastante diversa geneticamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONFIELD, JK.; WHITWHAM, A. Gap5 - editing the billion fragment sequence assembly. **Bioinformatics**, v. 26, p.1699 - 1703, 2010.

CLEVELAND, J. C. et. al. Economic value of the pest control service provided by Brazilian free-tailed bats in south-central Texas. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.4, n.5, p.238-243, 2006.

FEDERICO, P. et al. Brazilian free-tailed bats as insect pest regulators in transgenic and conventional cotton crops. **Ecological Applications**, v.18, n.4, p.826-837, jun. 2008.

FinchTV v1.4.0 Geospiza, Inc.; Seattle, WA, EUA. Disponível em: <http://www.geospiza.com/>. Acesso em: 12 mar. 2016.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. Dna SP v5: A software for comprehensive analysis pf DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451 – 1452, 2009.

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

TAMURA, K; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA7: Molecular Evolutinary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Oxford Journal**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1870 – 1874, 2016.

WILKINS, T. K. Mammalian Species *Tadarida brasiliensis*. **The American Society of Mammalogists**, n.331, p.1-10, mai. 1989.