

TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DE *GLOSSOPHAGA SORICINA*

Ana Carolina Barreto de Abreu Macedo ¹

Mariana Pires Campos Telles * ¹

Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Brasil

carolbabreu@gmail.com

tellesmpc@gmail.com

Palavras-chave: Marcadores microssatélites, Transferibilidade, Morcegos e Glossophaginae.

1 INTRODUÇÃO

Os morcegos constituem a segunda maior ordem de mamíferos do mundo, com cerca de 1200 espécies (SIMMONS 2005). *Glossophaga soricina* pertence à família Phyllostomidae, subfamília Glossophaginae, e é um morcego de médio porte, com cerca de 12g e 35 mm de antebraço que ocorre em todos os biomas brasileiros. (NOGUEIRA et al. 2007).

As espécies *Anoura caudifer*, *A. geoffroyi*, *Lonchophylla mordax* e *L. dekeyseri* pertencem à mesma subfamília Glossophaginae, os dois primeiros a tribo Glossophagini e os dois últimos a Tribo Lonchophyllini. Ambos filostomídeos são nectatívoros, de pequeno a médio porte, com peso variando entre 7,5 a 18 g e antebraço entre 33,5 e 47 mm. (TADDEI, 1975a; KOOPMAN, 1994; MOLINARI, 1994; SOLMSEN, 1998, SIMMONS & WETTERER, 2002; MUCHHALA et al., 2005; REID, 1997; WOODMAN & TIMM, 2006; ALBUJA & GARDNER, 2005).

As espécies *L. mordax* e *L. dekeyseri* são bastante similares em aparência geral, diferenciando-se em relação a caracteres cranianos e dentários. Há registro de ambos para o cerrado, mas *L. mordax* estende-se a Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica. *Anoura caudifer* e

A. geoffroyi também são espécies semelhantes, ocorrendo em todos os biomas brasileiros (MARINHO-FILHO & SAZIMA 1998; MARINHO-FILHO & SAZIMA, 1998).

A genética molecular têm se tornado uma importante ferramenta para o estudo da biologia de populações animais, especialmente para aquelas cujas informações são difíceis de ser obtidas por meio de observações diretas (BRYJA et al 2009). Em morcegos, o uso de marcadores moleculares tem levado a descrição e compreensão de peculiaridades sobre o grupo, como por exemplo, sistemas de reprodução e acasalamento, estudos sobre paternidade, biologia de abrigos e dispersão (McCracken et al 2006). Um dos marcadores moleculares mais utilizados atualmente para estudos de identificação individual e populacional é são os microssatélites, chamados também de SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeat*), que se caracterizam por serem regiões repetitivas não codificantes do DNA compostas de pequenos motivos de 1 – 6 nucleotídeos repetidos em tandem, presentes tanto em procariotos quanto em eucariotos (OLIVEIRA et al., 2006). Este marcador é muito utilizado pelo seu alto poder de detecção da diversidade genética, ou seja, seu alto poder informativo por loco (muitos alelos por região microssatélite avaliada), que normalmente apresentam alta taxa de mutação exibindo uma extensiva variação alélica e altos níveis de heterozigiosidade (Carvalho & Pitcher, 1995).

Os alelos de locos microssatélites diferenciam-se uns dos outros pelo número de unidades de repetição que apresentam nos cromossomos homólogos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

No entanto o alto custo e falta de mão de obra especializada são consideráveis. Isso torna todo o processo necessário para o desenvolvimento prévio dos iniciadores relativamente oneroso (ZUCCHI et al., 2002; BRONDANI et al., 2003). Os iniciadores (*primers*) são as seqüências únicas do DNA que flanqueiam cada um dos locos de uma região específica do tipo microssatélite e uma vez disponíveis (*primers*) o trabalho torna-se fácil e possível de ser executado em laboratórios não muito sofisticados.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo geral testar o potencial de transferibilidade dos primers desenhados para amplificar regiões microssatélites da espécie *G. soricina*, para as espécies *Anoura caudifer*, *A. geoffroyi*, *Lonchophylla mordax* e *L. dekeyseri*.

3 METODOLOGIA

Uma vez que o isolamento e desenvolvimento dos iniciadores (*primers*) já foram realizados, para a transferibilidade é preciso testar a capacidade de otimização dos mesmos para as quatro espécies em questão.

Foi realizada a extração do DNA a partir de tecido (que garante maior quantidade de DNA) das espécies, utilizando um kit de extração de DNA específico. Após a extração, o DNA total foi quantificado com o auxílio de um marcador de peso molecular conhecido, em gel de agarose 1%, em uma cuba horizontal contendo tampão Tris-Borato-EDTA (TBE). Para a visualização das bandas o gel foi corado com brometo de etídeo (10mg/mL) e sob a luz ultravioleta foi fotografado com o auxílio do fotodocumentador.

Depois de quantificado, o DNA foi diluído para uma concentração ideal para ser usada nas reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em termociclador. O volume final da reação é de 15 μ L, constituído de 5 μ L de DNA (~5ng/ μ L); 4,4 μ L dos iniciadores (1,8 μ M); 1,5 μ L tampão da enzima 10X (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100); 0,5 μ L de MgCl₂ (50mM); 1,3 μ L de d’NTP (2,5mM); 1,3 μ L de BSA (Albumina Bovina – 10mg/ml); 0,2 μ L da enzima Taq-Polimerase (5 unidades/ μ L), completando-se o volume com 0,8 μ L de Água Milli-Q. Em seguida, a mistura desses reagentes da PCR (mix) é acondicionada em tubos e levadas ao termociclador que será programado conforme os passos descritos a seguir: Desnaturação do DNA por aquecimento à 94°C por cinco minutos; 30 ciclos de amplificação que ocorrerá em a 94°C por um minuto, um minuto para o anelamento dos *primers* (temperatura específica para cada *primer*), extensão da molécula de DNA a 72 °C por um minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por sete minutos.

Alíquotas de cada produto da amplificação são submetidas à eletroforese vertical em gel de acrilamida 6%, utilizando TBE 1X, para checar a eficiência da amplificação de cada loco microssatélite desenvolvido (par de iniciadores), utilizando três indivíduos de cada espécie. Para a visualização dos produtos amplificados, é realizada a coloração dos géis de poliacrilamida com nitrato de prata, seguindo o protocolo de Creste *et al.* (2001). Após a revelação e secagem as placas contendo os géis foram colocadas sobre a luz branca para a obtenção dos genótipos, e os melhores locos foram escolhidos utilizando como parâmetro o marcador *Ladder* 10bp como padrão de peso molecular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transferibilidade das regiões microssatélites foi realizada somente para as espécies *Anoura geoffroyi*, *Lonchophylla mordax* e *L. Dekeyseri* sendo que, dos doze locos testados, 3 (25 %) obtiveram um padrão de amplificação satisfatório e 4 (33,33 %) não apresentaram amplificação satisfatória, os demais locos foram descartados.

Para os locos GS 03, 10, 13 e 14, que ainda não amplificaram com sucesso, é necessário a realização de mais testes, sendo necessário muitas vezes, a mudança de temperatura. O ajuste da temperatura de anelamento dos locos é feita a partir do aumento ou diminuição da temperatura, até que a visualização das bandas tenha melhor resolução.

Dos locos que amplificaram (GS02, GS12 e GS15), obteve-se uma temperatura de anelamento igual ou mais alta do que a padronizada para a espécie *G. soricina*. O primer GS02 foi otimizado para as espécies *A. geoffroy* e *L. dekeyseri*, nas temperaturas de 56°C e 62°C, respectivamente. O primer GS15 otimizou para as mesmas e também para a espécie *L. mordax*, nas temperaturas de 60, 62 e 64°C, respectivamente. Já o primer GS12 otimizou apenas para *L. dekeyseri* na temperatura de 56 (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos locos transferidos para as espécies *Anoura caudifer*, *A. geoffroyi*, *Lonchophylla mordax* e *L. dekeyseri* com as temperaturas de anelamento padronizadas (Ta) para *G. soricina*

Espécies	Primer	Ta(°C)	Ta(°C)
			<i>G. soricina</i>
<i>A. geoffroyi</i>	GS 02	56	56
	GS 15	60	60
<i>L. mordax</i>	GS 15	64	60
	GS 15	60	60
<i>L. dekeyseri</i>	GS 02	62	56
	GS 12	56	60
	GS 15	62	60

Cada espécie foi submetida a testes com todos os primers em diferentes temperaturas para padronização da melhor temperatura de anelamento (Tabelas 2 a 5).

Tabela 2. Relação das temperaturas de anelamento testadas para a espécie *Anoura caudifer*.

<i>Anoura caudifer</i>					
Temperatura em °C					
Primers	56	58	60	62	64
GS 02	T	T	T	T	T
GS 03	T	/	/	/	/
GS 04	x	/	/	/	/
GS 05	x	/	/	/	/
GS 07	/	x	/	/	/
GS 09	x	/	/	/	/
GS 10	T	/	/	/	/
GS 12	/	/	T	T	/
GS 13	/	/	/	/	T
GS 14	/	/	/	/	T
GS 15	/	/	T	T	/

T – primers testados mas que não otimizaram em nenhuma das temperaturas; x – primers testados mas descartados; / - temperatura não utilizada nos testes; ok – primers testados e otimizados.

Tabela 3. Relação das temperaturas de anelamento testadas para a espécie *Anoura geoffroyi*.

<i>A. geoffroyi</i>					
Temperatura em °C					
Primers	56	58	60	62	64
GS 02	ok	/	/	/	/
GS 03	T	/	/	/	/
GS 04	x	/	/	/	/
GS 05	x	/	/	/	/
GS 07	/	x	/	/	/
GS 09	x	/	/	/	/
GS 10	T	/	/	/	/
GS 12	/	/	T	T	/
GS 13	/	/	/	/	T
GS 14	/	/	/	/	T
GS 15	/	/	ok	/	/

T – primers testados mas que não otimizaram em nenhuma das temperaturas; x – primers testados mas descartados; / - temperatura não utilizada nos testes; ok – primers testados e otimizados.

Tabela 4. Relação das temperaturas de anelamento testadas para a espécie *Lonchophylla mordax*.

<i>Lonchophylla mordax</i>					
Temperatura em °C					
Primers	56	58	60	62	64
GS 02	T	T	T	T	/
GS 03	T	/	/	/	/
GS 04	x	/	/	/	/
GS 05	x	/	/	/	/
GS 07	/	x	/	/	/
GS 09	x	/	/	/	/
GS 10	T	/	/	/	/
GS 12	/	/	T	/	/
GS 13	/	/	/	/	T
GS 14	/	/	/	/	T
GS 15	T	T	T	T	ok

T – primers testados mas que não otimizaram em nenhuma das temperaturas; x – primers testados mas descartados; / - temperatura não utilizada nos testes; ok – primers testados e otimizados.

Tabela 5. Relação das temperaturas de anelamento testadas para a espécie *Lonchophylla mordax*.

Primers	<i>L. dekeyseri</i>				
	Temperatura em °C				
	56	58	60	62	64
GS 02	T	T	T	ok	/
GS 03	T	/	/	/	/
GS 04	x	/	/	/	/
GS 05	x	/	/	/	/
GS 07	/	x	/	/	/
GS 09	x	/	/	/	/
GS 10	T	/	/	/	/
GS 12	ok	/	/	/	/
GS 13	/	/	/	/	T
GS 14	/	/	/	/	T
GS 15	/	/	T	ok	/

T – primers testados mas que não otimizaram em nenhuma das temperaturas; x – primers testados mas descartados; / - temperatura não utilizada nos testes; ok – primers testados e otimizados.

Diversos estudos têm mostrado a possibilidade de transferibilidade de regiões microssatélites entre espécies pertencentes ao mesmo gênero (CIPRIANI *et al.* 1999; ZUCCHI *et al.*, 2002; BRONDANI *et al.*, 2003), ou até mesmo entre gêneros diferentes (WRITE & POWELL, 1997; ROA *et al.*, 2000).

O resultado referente ao teste de potencial de transferibilidade pode ser considerado satisfatório, já que trabalhos como o de Zucchi *et al.* (2003) de amplificação cruzada entre gêneros retrata baixa porcentagem de transferibilidade, uma vez que a porcentagem obtida foi de 25 %.

6 CONCLUSÃO

Embora sendo de gêneros diferentes, existe um potencial de transferibilidade de regiões microssatélites entre as espécies *Glossophaga soricina*, *A. geoffroyi*, *Lonchophylla mordax* e *L. dekeyseri*.

Estudos de transferibilidade de marcadores microssatélites como o realizado neste trabalho são importantes para viabilizar estudos de genética populacional em espécies de interesse para a conservação ou uso, que não possuem ferramentas moleculares informativas disponíveis.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beebe T. J. C., Rowe G., 2004. An Introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press, Oxford.
- Bryja J, Kanuch AP, Fornuskova A, Bartonicka T & Rehak Z. 2009. Low population genetic structuring of two cryptic bat species suggests their migratory behaviour in continental Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 96 (1): 103-114.
- Carvalho, G. R. e Pitcher, T. J. *Molecular Genetics in Fisheries*. New York, Chapman and Hall, 1995.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. 1998. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. EMBRAPA – CENARGEN, Brasília, DF.
- Hillis, D. M.; Mable, B.K.; Larson, A.; Davis, S. K.; Zimmer, E. 1996. *Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning*. Em: *Molecular Systematics*, 2nd Edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA.
- McCracken GF, Lumsden LF & Kunz TH. 2006. Roosting ecology and population biology. Pp. 179–184. In: Zubaid A, McCracken GF & Kunz TH (eds). *Functional and evolutionary ecology of bats*. New York, Oxford University Press.
- Nogueira MR, Dias D & Peracchi AL. 2007. Subfamília Glossophaginae Pp. 45-59. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA & Lima IP. (Org.). *Morcegos do Brasil*. Londrina.
- Oliveira et al, 2006. Microsatellite Transferability. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Departamento de Genética, Piracicaba, SP, Brasil. Pp. 6.
- Silva, A.J; Mestriner, M.A. e Alzate-Marin, A.L. Transferibilidade de marcadores microssatélites heterólogos para *Eugenia uniflora*, uma espécie arbórea ameaçada na região de Ribeirão Preto-SP. In: Congresso Brasileiro de Genética, 52. CD-ROM... Foz do Iguaçu: SBG, p.1328, 2006.
- Simmons NB. 2005. Order Chiroptera. Pp. 312-529 in Wilson DE & Reeder DA (eds). *Mammal Species of the World: a Taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Ferreira-Ramos, Ronai, Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Eugenia uniflora* L. na região de Ribeirão Preto (SP), utilizando marcadores microssatélites. Ribeirão Preto, 2008.