



## LIFE BERLENGA

*LIFE13/NAT/PT/000458*

### **Análises genéticas das espécies *Rattus rattus* e *Oryctolagus cuniculus* na ilha da Berlenga Grande**

#### **Objectivo principal:**

Avaliar os níveis de diversidade e diferenciação genética das populações de ratazana-preta (*Rattus rattus*) e coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) residentes na ilha Berlenga Grande em comparação com outras populações da mesma espécie (continentais e insulares).

#### ***Rattus rattus***

Foram analisadas geneticamente um total de 19 amostras de ratazana-preta capturadas na ilha Berlenga Grande na sequência de campanhas de monitorização destas espécies que antecederam a campanha de erradicação. Assim, uma pequena amostra de tecido da orelha foi utilizada para extração de ADN genómico para posterior amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) de marcadores moleculares adequados aos objectivos deste trabalho.

Foram seleccionados 2 marcadores moleculares mitocondriais – citocromo b e d-loop, amplamente utilizados em trabalhos que visam, nomeadamente, avaliar a origem da colonização de determinada população de uma determinada espécie em ilhas/arquipélagos assim como evidenciar a diferenciação de populações.

#### **Citocromo b**

Numa primeira fase foi avaliado o gene citocromo b (1140 pares de bases) em 14 indivíduos, para confirmação do estatuto específico da ratazana-preta residente na Berlenga Grande. Na sequência desta análise foram obtidos dois haplótipos (sequências únicas) que diferiam apenas em uma base. Por comparação com sequências publicadas em bases de dados públicas (GenBank) foi confirmado o estatuto taxonómico da espécie – *Rattus rattus*. Foram igualmente analisadas, para comparação, quatro amostras provenientes da ilha do Corvo (Açores) e duas da ilha da Madeira. Apesar de, à data desta análise, não existirem amostras de ratazana preta provenientes do continente português para comparação, foram seleccionadas sequências de diferentes áreas geográficas de forma a permitir uma vasta cobertura da



área de distribuição da espécie para comparação com as amostras obtidas na ilha Berlenga. Assim, foram seleccionadas preferencialmente sequências resultantes de amostras oriundas da Europa (Espanha, França, Itália, Grécia, ilhas Canárias) e África (Argélia, Tunísia, Senegal, Benim, Zâmbia) assim como sequências provenientes de espécimes de outros continentes.

A espécie *Rattus rattus* apresenta uma distribuição mundial, formando um complexo constituído por diferentes linhagens mitocondriais previamente identificadas (baseada em dados de citocromo b). A distribuição destas linhagens apresenta estrutura geográfica, sendo que a linhagem I é a única presente na Europa Ocidental. Após análise de todas as sequências foi possível concluir que a ratazana-preta da Berlenga se enquadra na linhagem I de citocromo b de *Rattus rattus*.

De forma a permitir uma análise o mais abrangente possível em termos geográficos, as sequências foram truncadas a 700 pares de bases. Daí resultou uma única sequência para a ilha Berlenga que apresentava total redundância/identidade com sequências publicadas provenientes de Espanha, França, Itália, Tunísia, ilhas Canárias (Tenerife, La Palma, El Hierro, La Gomera, Gran Canária, Lanzarote), Senegal e Benim. Esta ausência de diferenciação genética ao longo de áreas geográficas bastante vastas é coerente com uma colonização recente (do ponto de vista evolutivo).

### **D-loop**

De modo a permitir uma análise mais fina dos dados e procurar maior estrutura na distribuição da variação genética a nível geográfico foi analisado um marcador mitocondrial de evolução mais rápida – o d-loop (um fragmento de 561 pares de bases). Assim, foram avaliadas 19 amostras de *Rattus rattus* da ilha Berlenga bem como 5 amostras entretanto disponíveis de Portugal continental (oriundas da Samarra, Lisboa, Montijo, Viana do Alentejo e Porto Côvo), uma de Espanha continental (Burguillos del Cerro), 4 da ilha do Corvo (Açores), 8 da ilha da Madeira e 4 da ilha de Porto Santo. Destas 41 amostras analisadas, apenas foram encontrados 5 haplótipos, sendo que todos os animais da Berlenga Grande partilhavam a mesma sequência, igualmente encontrada em Portugal continental, na Madeira e em Porto Santo. Os restantes haplótipos apenas se distinguem da sequência mais comum (partilhada por 35 das amostras analisadas) em uma única mutação.

### **Conclusões:**

Assim sendo, infere-se que a população de *Rattus rattus* que habita actualmente a ilha Berlenga não apresenta qualquer divergência a nível do DNA mitocondrial (citocromo b



e d-loop) quando comparada com outras populações, mesmo que provenientes de origens geográficas muito distintas. Em termos evolutivos, este padrão genético observado neste contexto geográfico é consistente com um fenómeno de colonização recente (em termos evolutivos), mediado pelo homem.

A partir exclusivamente das análises genéticas efectuadas não existem quaisquer evidências que a referida população da Berlenga tenha sofrido um processo de diferenciação que justifique atribuir-lhe qualquer estatuto de protecção. Um nível significativo de diferenciação desta população face, por exemplo, a outras populações continentais e/ou insulares, teria uma assinatura molecular ao nível de ambos os marcadores analisados, o que não se verificou. Acrescenta-se ainda que, hoje em dia, alterações ao estatuto taxonómico de populações é um processo que conta, invariavelmente, com análises genéticas como as levadas a cabo neste trabalho.

### ***Oryctolagus cuniculus***

Na sequência de campanhas de acção de avaliação da população de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) na ilha Berlenga Grande foram recolhidas amostras de tecido da orelha dos animais capturados. Destas, foram seleccionadas 17 amostras para avaliação genética do estatuto taxonómico da população e despistagem de indícios de hibridação com coelho doméstico. A pequena amostra de tecido da orelha foi utilizada para extracção de ADN genómico para posterior amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) de marcadores moleculares adequados aos objectivos deste trabalho.

Após pesquisa bibliográfica, foram seleccionados 2 marcadores moleculares para análise – um marcador mitocondrial (d-loop) e um marcador nuclear localizado no cromossoma X (gene F9). A utilização conjunta dos dois tipos de marcador genéticos permitem a detecção de fenómenos de hibridação que poderiam não ser detectados utilizando apenas um dos marcadores.

Adicionalmente, para comparação, foram analisadas 3 amostras de coelho doméstico assim como 5 amostras de coelho-bravo originárias de Portugal continental (Maфра, Alvito, Viana do Alentejo e Mértola ) e 2 amostras originárias da ilha da Madeira (Fajã da Ovelha e Arco da Calheta).



### **D-loop (em curso)**

Este marcador mitocondrial (de transmissão exclusivamente materna) permite a discriminação entre as duas sub-espécies de coelho-bravo existentes na Península Ibérica – *Oryctolagus cuniculus cuniculus* e *Oryctolagus cuniculus algirus*. Esta última é a sub-espécie presente em território português e aquela cuja ocorrência é mais provável na ilha Berlenga Grande. Sendo transmitido à descendência exclusivamente pelas fêmeas (e não sofrendo recombinação) é particularmente informativo acerca das linhagens maternas que sejam bem sucedidas a colonizar uma ilha.

### **Gene F9 (em curso)**

Este gene localiza-se no cromossoma X, pelo que apresenta herança bi-parental (é passado às gerações seguintes quer pelos machos quer pelas fêmeas). A selecção deste marcador prendeu-se com a análise da literatura e a identificação de cada sub-espécie (bem como de animais domésticos) com base nas sequências obtidas.

### **Resultados e conclusões preliminares:**

As análises dos dados já recolhidos a nível laboratorial (para ambos os marcadores moleculares) ainda se encontram em curso. Contudo, através da inspecção visual das sequências obtidas (e comparação individual com sequências publicadas em bases de dados públicas) foi já possível identificar a presença, na maioria dos animais da Berlenga analisados, de sequências características de coelho doméstico ao nível de ambos os marcadores moleculares. Este resultado é validado pela comparação com os resultados obtidos para os animais selvagens oriundos do continente, que resultaram em sequências características de coelho-bravo da sub-espécie *Oryctolagus cuniculus algirus*, como seria expectável. Da mesma forma, as sequências obtidas para os 3 coelhos domésticos analisados confirmaram o seu estatuto doméstico. Em ambos os casos (amostras de coelhos selvagens e domésticos), os resultados obtidos foram coerentes para ambos os marcadores moleculares estudados. No caso dos animais da ilha Berlenga Grande foi possível detectar sequências características quer de coelho doméstico (a maioria) quer de coelho-bravo. Este cenário é compatível com uma situação de hibridação entre ambos, sendo que em algum momento terá sido introduzido coelho doméstico na ilha que se reproduziu com o coelho-bravo residente, deixando uma assinatura genética do evento.



Apesar de, fenotipicamente, o coelho da Berlenga se assemelhar totalmente ao coelho-bravo, geneticamente é possível concluir através da análise destes 2 marcadores que a penetração do genoma de coelho doméstico na população da Berlenga foi bastante bem sucedida. Assim sendo, com base apenas nos resultados obtidos, um cenário de potencial translocação de animais da Berlenga para o continente, resultaria na contaminação genética das populações selvagens continentais caso os animais translocados conseguissem reproduzir-se com estes últimos. As consequências seriam imprevisíveis para o património genético desta espécie que ficaria, seguramente, ameaçado.

### **Responsável Técnico**

Sofia Gabriel, PhD

Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e Bolseira de Pós-Doutoramento

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Edifício C2, 3º piso, sala 2.3.03

Tel. 21 750 00 00 ext. 22303

Sofia Gabriel