

INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NO ESTUDO DO MTDNA DE AVES MARINHAS: SEQUENCIAMENTO POR NANOPOROS REVELA VARIAÇÕES ESTRUTURAIS E HETEROPLASMIA EM THALASSARCHE CHLORORHYNCHOS

Luize Hoffmann Dallagnese, Gabriela Scholante Delabary, Annelise Zabel Sgarioni, André Oliveira de Souza Lima
Genética - Genética Molecular e de Microorganismos

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção de energia por meio da fosforilação oxidativa. O genoma mitocondrial (mitogenoma, mtDNA) distingue-se do nuclear por codificar proteínas específicas desse processo, além de apresentar estrutura circular e tamanho cerca de 70 mil vezes menor. Nas aves, o mtDNA varia entre 16 e 20 mil pares de bases e difere da maioria dos outros vertebrados quanto à organização gênica. Com o advento de novas tecnologias de sequenciamento, como o MinION (Oxford Nanopore Technologies), torna-se possível gerar leituras de fragmentos longos (>50 kb) e centenas de sequências por amplicon, permitindo identificar variações estruturais que dificilmente seriam detectadas com metodologias tradicionais baseadas em fragmentos curtos. As aves marinhas estão entre os grupos mais ameaçados de extinção, devido à pesca, à perda de habitat e à introdução de espécies exóticas nas ilhas reprodutivas. Entre elas, destaca-se o albatroz-de-nariz-amarelo (*Thalassarche chlororhynchos*), presente nos oceanos brasileiros. Este estudo teve como objetivo desenvolver uma estratégia para determinar o mtDNA completo de *T. chlororhynchos* e descrevê-lo pela primeira vez. Para isso, foram analisadas quatro amostras de DNA de albatroz (B321, C5227, C5242 e C5309), disponibilizadas pelo BAAP (Projeto Albatroz) e Ceclimar (UFRGS). As amostras foram avaliadas quanto à qualidade e quantidade de DNA, seguidas por amplificação (PCR), sequenciamento e análise do gene COI (citocromo oxidase I) para confirmar a identificação da espécie. Em paralelo, foram desenhados primers específicos para o mtDNA completo com auxílio de ferramentas de bioinformática (Ugene, Primer-BLAST), utilizando como referência a única sequência parcial disponível para a espécie no NCBI. O genoma mitocondrial foi dividido em três amplicons com regiões sobrepostas, cada um amplificado com um par de primers. Os produtos amplificados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose e utilizados para construção de bibliotecas de DNA, com adição de adaptadores para sequenciamento por nanoporos no equipamento MinION (Flowcell Flongle). O sequenciamento resultou em diversas leituras, posteriormente agrupadas por tamanho e similaridade (clusterização), permitindo a montagem dos mitogenomas pelo pacote CLC Genomics Workbench e a anotação gênica na plataforma MITOS2. Os genomas completos foram representados graficamente nos formatos linear e circular com o CGParse. A estratégia adotada, baseada em leituras longas e cobertura robusta de cada fragmento, mostrou-se determinante para revelar variações estruturais raras, que passariam despercebidas em abordagens convencionais. Foram obtidos os mtDNAs completos de quatro espécimes, com tamanhos entre 17.882 e 20.145 pb e elevado conteúdo de bases AT. Três amostras (B321, C5242, C5309) apresentaram 13 genes codificadores de proteínas (GCPs), dois RNAs ribossômicos (rRNAs), 22 RNAs transportadores (tRNAs) e uma região D-loop, enquanto a amostra C5227 apresentou 14 GCPs, 25 tRNAs e dois D-loops, indicando duplicações nos genes NAD6, tRNAs e D-loop, já relatadas como adaptações a ambientes extremos. Além disso, três dos quatro indivíduos (C5227, C5242 e C5309) apresentaram heteroplasmia, caracterizada pela presença de mais de um tipo de mitogenoma, condição com possíveis impactos biológicos neutros ou funcionais e que pode ter origem na entrada de mtDNA paterno durante a fertilização ou em processos de hibridização entre espécies. Este trabalho descreve pela primeira vez o mitogenoma completo de quatro espécimes de *T. chlororhynchos* e registra a ocorrência de heteroplasmia nessa espécie, fornecendo dados inéditos sobre diversidade genética e organização mitocondrial. Os resultados só foram possíveis graças à adoção de uma estratégia tecnológica inovadora, baseada na amplificação de longos fragmentos e no sequenciamento por nanoporos, demonstrando como a integração de metodologias avançadas pode gerar descobertas biológicas de alto impacto, com aplicações em estudos filogenéticos, monitoramento populacional e conservação de aves marinhas ameaçadas.

Palavras-chave: nanoporo; mitogenoma; albatroz.

Apoio: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI/CNPq); Universidade do Vale do Itajaí (Univali); Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Fapesc)