

DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA DE *Tadarida brasiliensis* (CHIROPTERA: MOLOSSIDAE) BASEADO NAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO CONTROLADORA DO DNAmT DISPONÍVEL *IN SILICO*

Angel Larroza¹; Fábio Ricardo Pablos de Souza²; Ana Maria Rui³; Juliana Cordeiro ⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – angellarroza@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – fabiopablos@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - ana.rui@ufpel.edu.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – juliana.cordeiro@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Genética de populações é a área responsável por analisar a quantidade e a distribuição da variação genética nas populações e as forças que controlam essa variação (HARTL & CLARK, 2010). Para tanto, são utilizados diferentes marcadores moleculares, e sequências mitocondriais são consideradas ideais, uma vez que o genoma mitocondrial apresenta taxa de mutação maior que o genoma nuclear, é transmitido por herança materna e não sofre recombinação, tornando esses marcadores ideais nos estudos populacionais. Essas características fazem com que seja possível investigar a história das populações sem a inserir variáveis complexas como a aleatoriedade das recombinações (ARIAS et al., 2003). O DNA mitocondrial possui uma região que controla a síntese de DNA e de RNA chamada de região controladora (RC) ou região D-loop. Esta é uma das regiões mais polimórficas do DNA mitocondrial de mamíferos (WILKINSON et al 1997), sendo que o DNA mitocondrial tem uma taxa de mutação de 0,043 substituições por sítio por milhão de ano (NABHOLZ, 2008). Dedevido a essas características, a região controladora do DNA mitocondrial tem sido muito utilizada nos estudos de estrutura populacional e diversidade genética das populações (RUSSEL et al 2005).

Tadarida brasiliensis (Chiroptera: Molossidae) (i. geoffroy, 1824; WILKINS, 1989) está entre as espécies de morcego mais amplamente distribuídas nas Américas. Encontrada desde o sul dos Estados Unidos até centro da Argentina, Chile e Sul do Brasil. Na América do Sul esta distribuição se estende ao longo da encosta da Cordilheira dos Andes, apresentando uma ausência na região Amazônica. Aparentemente, sua distribuição é descontínua na América Central, com ausência na Nicarágua (IUCN, 2017). Apesar de sua ampla distribuição, O padrão de deslocamento é conhecido para populações da América do norte e Centro, porém para as populações da América do Sul permanece desconhecido.. O objetivo deste trabalho é analisar a diversidade genética de *Tadarida brasiliensis* baseado em sequências da região controladora D-loop do DNA mitocondrial, e analisar como as populações estão estruturadas.

2. METODOLOGIA

As sequências de *Tadarida brasiliensis* da região controladora (CR D-loop) foram obtidas por meio de buscas *in silico* nos bancos de dados online GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências foram alinhadas no programa MEGA6 (TAMURA et al. 2013) utilizando a ferramenta Clustal W.

As análises de diversidade populacional, intrapopulacional e interpopulacional, foram realizadas utilizando o programa DnaSP v5.10 (LIBRADO e ROZAS, 2009). A rede de haplótipos foi construída utilizando o método median-joining no programa Network (BANDELT e FORSTER, 1997). Foi realizada uma análise de neutralidade para geração da diversidade genética utilizando o teste D de Tajima, e um teste de fixação de haplótipos por meio do índice Fst. Ambos testes foram realizados no programa DnaSP v5.10.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da busca no banco de dados, obtivemos um total de 220 sequências, com uma matriz de dados de 477 sítios nucleotídicos, agrupadas em 14 populações distribuídas na América do Norte, América Central e América do Sul. A tabela 1 apresenta os dados de diversidade genética para as diferentes populações e para *T. brasiliensis*. Observamos uma alta diversidade haplotípica ($H_d > 0,90$), o que é esperado para a CR (D-loop). Já a diversidade nucleotídica (P_i) e o número de sítios variáveis (S) é baixo ($P_i < 0,065$ e $S < 201$ sítios nucleotídeos dos 477 analisados). Nossos dados mostram que apesar da alta diversidade de haplótipos, a diferença entre cada sequência são consequências de variações em poucos sítios nucleotídicos.

Tabela 01: Dados de diversidade genética das populações de *Tadarida brasiliensis*.

População	N	H	Hd	Pi	S	D de Tajima
Rosário/ ARG	10	10	1,000	0,03565	46	-0,11208
Arizona/ EUA	8	8	1,000	0,04152	57	-0,56568
Arkansas/ EUA	9	8	0,972	0,00409	34	1,33882
RS/ BRL	10	8	0,956	0,05359	73	-0,36693
Califórnia/ EUA	13	12	0,987	0,03457	55	-0,48559
Chiapas/ MEX	11	11	1,000	0,03467	57	-0,76312
Concepcion/ CHL	17	11	0,912	0,02160	37	-0,33889
Colorado/ EUA	4	4	1,000	0,04008	35	-0,04935
Florida/ EUA	20	20	1,000	0,03827	76	-0,71401
El Rancho/ GLP	4	4	1,000	0,03622	32	-0,17068
Luisiana/ EUA	10	10	1,000	0,03338	52	-0,68112
MEX*	44	43	0,999	0,03902	122	-1,37032
Novo México/ EUA	10	10	1,000	0,04205	64	-0,65140
Novo México/ EUA	10	10	1,000	0,04205	64	-0,65140
Oregon/ EUA	5	4	0,900	0,02785	29	-0,62307
Texas/ EUA	20	20	1,000	0,03467	73	-0,89227
Total	220	190	0,998	0,06277	210	-0,94184

N: número de sequências da população; h: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; Pi: diversidade nucleotídica; S: número de sítios variáveis; *localidade não informada; ARG: Argentina; BRL: Brasil; :CHL: Chile; GLP: Guatemala; MEX: México; EUA: Estados Unidos

Na análise de rede de haplótipos (figura 1), observamos uma separação das populações com distribuição na América do Sul e na América do Norte, sem compartilhamento de haplótipos. Possivelmente esta separação se dá pela falta de amostragem na extensão total. O que podemos estar vendo é uma característica da taxa mutacional do D-loop, que varia bastante, porém por ter essa alta taxa mutacional a diferença entre as populações não é tão grande.

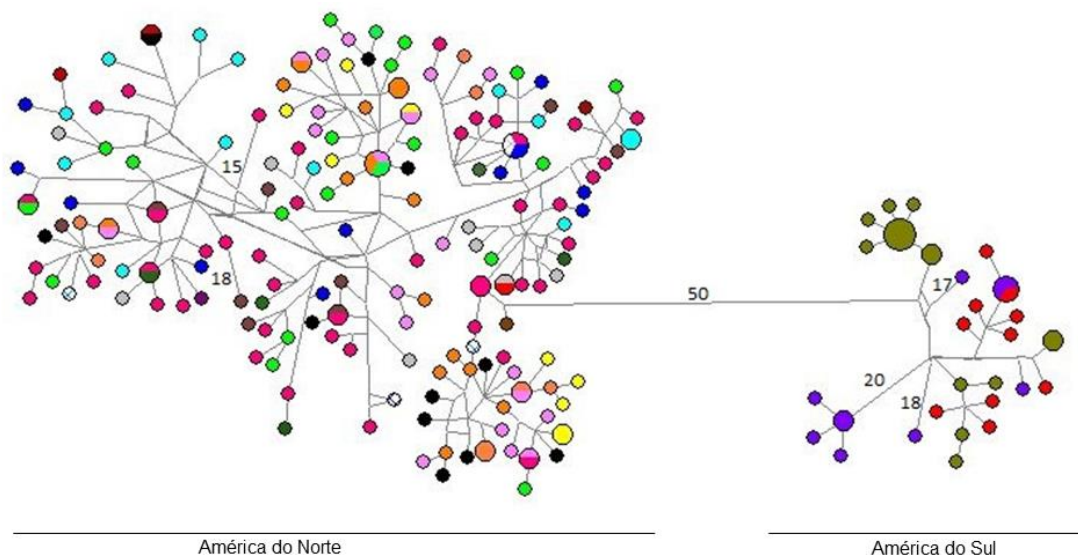


Figura 01: Rede de haplótipos da sequência CR D-loop de *Tadarida brasiliensis* calculado pelo método de median-joining no programa Network. Cada círculo representa um haplótipo (ou sequência nucleotídica) diferente. Círculos com diâmetros maiores representam mais de um indivíduo compartilhando o mesmo haplótipo. Cores diferentes representam diferentes populações. Os números nos *links* entre haplótipos representam a quantidade de passos mutacionais que os separam. Links que apresentaram menos de 15 passos mutacionais foram retirados da figura.

O teste de neutralidade D de Tajima (tabela 01) apresentou valores negativos para as diferenças entre o valor de Π e a diversidade esperada (baseado nos valores de número de sítios variáveis, S). Isto significa que a diversidade encontrada é muito menor que a esperada, apontando para uma expansão geográfica populacional de *T. brasiliensis*.

Os valores do índice de fixação F_{st} são inferiores a 0,5 nas comparações entre as populações com distribuição no mesmo continente. O valor de F_{st} varia de 0 a 1, sendo que valores próximos a zero indicam baixa estruturação populacional. Nas comparações entre as populações com distribuição na América do Norte e América Central, os valores de F_{st} variaram de -0,021 a 0,307; e nas comparações entre as populações da América do Sul, variaram de 0,196 a 0,377. Já nas comparações entre as populações com distribuição na América do Norte e Central com as populações da América do Sul, os valores variaram de 0,620 a 0,798.

Esses dados, analisados em conjunto, indicam que tanto as populações da América do Norte e Central, quanto às populações da América do Sul, apresentam um considerável nível de fluxo gênico. Possivelmente a manutenção deste fluxo gênico proporciona a homogeneização das sequências de DNAm entre diferentes populações dos Estados Unidos, México e Guatemala e, separadamente, entre as populações da Argentina, Brasil e Chile.

Já os dados de F_{st} para as comparações entre populações do norte da distribuição de *T. brasiliensis* (América do Norte e Central) com as populações do sul da distribuição (América do Sul) foram acima de 0,5. Esses valores indicam que essas populações não compartilham haplótipos por descendência, ou seja, existe uma fixação de sequências nucleotídicas nestas populações. Esta informação aponta para uma estruturação genética, potencialmente mantida pelo baixo fluxo gênico entre essas três populações.

Analisando o teste D de Tajima juntamente com a rede de haplótipos supomos que todas compartilham um ancestral comum e atualmente alguma barreira está dificultando o fluxo entre as populações. Isto explica o alto fluxo entre populações da América do Norte e Central, e nas populações da América do Sul.

4. CONCLUSÕES

Os dados de diversidade genética e fixação de haplótipos obtidos para a região CR D-loop de *Tadarida brasiliensis* apontam para uma alta diversidade genética continental. Porém, aparentemente existe uma estruturação genética que separa as populações em norte e sul no continente americano. Para confirmar esses achados, é necessário amostrar indivíduos com distribuição na região norte da América do Sul e da América Central, além de utilizar outros marcadores genéticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BANDELT, H.J, Forster, P. The myth of bumpy hunter-gatherer mismatch distributions. **American Journal of Human Genetics**, v.61, p. 980-983, 1997

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de Genética de Populações**. São Paulo: Artmed, 2010. 4ed.

IUCN 2017. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Versão 2017-1. Acessado em 14 de julho de 2017. Online. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>

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

TAMURA, K; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA7: Molecular Evolutionary 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, 1989.

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.

WILKINSON, G.S.; MAYER, F.; KERTH, G.; PETRI, B.; Evolution of Repeated Sequence Arrays in the D-Loop Region of Bat Mitochondrial DNA. **Genetics Society of America**, n.146, p.1035-1048, 1997

NABHOLZ, B.; GLEMIN, S.; GALTIER, N. Strong Variations of Mitochondrial Mutation Rate across Mammals-the Longevity Hypothesis. **Society for Molecular Biology and Evolution**. v. 25, p. 120-130, 2008.