

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Tadarida brasiliensis* ENTRE AMÉRICA DO NORTE E SUL BASEADO EM SEQUÊNCIAS DE COI DE mDNA

Angel Larroza; Kelly Brondani; Ana Maria Rui; Juliana Cordeiro; Fabio Ricardo Pablos

¹*Universidade Federal de Pelotas – angellarroza@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas - kellybrondani@hotmail.com*

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

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

⁵*Universidade Federal de Pelotas – fabiopablos@hotmail.com*

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 seus estudos são utilizados diferentes marcadores moleculares, genes mitocondriais são considerados ideais já que o genoma mitocondrial tem alta taxa de mutação, herança maternal e não sofrer recombições, tornando-os úteis na investigação da história das populações (ARIAS ET AL, 2003). O gene citocromo oxidase subunidade I (COI) é considerado um dos genes codificadores de proteínas mais conservados no genoma mitocondrial (BROWN, 1985), sendo bastante utilizado em estudos de genética de populações e em estudos filogeográficos (DERYCKE et al, 2010). Estudos de variação genética possuem relevância para o entendimento das populações cujo comportamento migratório é desconhecido (WILMER et al., 1994).

Tadarida brasiliensis (I. GEOFFROY, 1824; WILKINS, 1989) é uma espécie de Chiroptera da família Molossidae e está entre as espécies de morcego mais amplamente distribuídas nas Américas. Encontrada desde o sul dos Estados Unidos até norte da Argentina, Chile e sudeste 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). A espécie é formada por populações residentes e migratórias, formando colônias que chegam a milhares de indivíduos em cavernas ou construções abandonadas (SIMAS 2015). Apesar de sua ampla distribuição padrões migratórios no Sul da América do Sul ou mesmo entre a América Central e do Norte para esta espécie ainda são desconhecidos. O objetivo deste trabalho é analisar a diversidade das sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) de populações de *Tadarida brasiliensis* da América do Norte e do Sul.

2. METODOLOGIA

As sequências do gene COI de *Tadarida brasiliensis* da América do Norte foram obtidas por meio de buscas in silico nos bancos de dados online GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Já os exemplares da América do Norte foram capturados utilizando armadilha harp-trap e armadilha tipo puçá. Os indivíduos

foram mortos por inalação de éter (licença SISBio n.º 52646-1). Após a identificação, tecido muscular peitoral foi isolado e armazenado em etanol 90% a -20°C, para posterior extração de DNA.

A extração do DNA foi realizada utilizando o kit para extração *DNeasy® Blood&Tissue Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Foi analisada a sequência do gene citocromo oxidase subunidade I (COI). Para as reações de PCR foram utilizados os primers VF1d /VR1d (COI), enzima *HotStarTaqMaster Mix kit* (Qiagen), programa de termociclador seguindo as recomendações. Os produtos de PCR foram sequenciados pela empresa Macrogen (<http://foreign.macrogen.com/eng/>).

As sequências foram alinhadas no programa MEGA6 (TAMURA et al. 2013) utilizando a ferramenta Clustal W. As análises de diversidade populacional, intra população e inter populações foram realizadas utilizando o programa DnaSP v5.10 (ROZAS et al., 2003). A rede de haplótipos foi construída utilizando o programa Network (Fluxus Technology Ltda. 2016). Foi realizada uma análise de neutralidade para geração da diversidade genética utilizando o teste D de Tajima, e um teste de fixação de alelos por meio do índice Fst. Ambos testes foram realizados no programa DnaSP v5.10.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises incluem 92 sequências, considerando as 39 obtidas com a busca in silico e 53 sequências extraídas de nossas coletas. Uma matriz de dados foi construída totalizando 692 nucleotídeos. Na tabela 01 são apresentados os dados de diversidade, onde observamos uma alta diversidade haplotípica dentro de cada população (Hd), já a diversidade nucleotídica (Pi) e o número de sítios variáveis (S) é baixo, ou seja, apesar da alta diversidade de haplótipos a mudança entre cada sequência é pouca.

Tabela 01: Dados de diversidade genética obtidos das sequências de mDNA de *Tadarida brasiliensis* da América do Norte e Sul.

População*	N	h	Hd	Pi	S	Tajima's D Test
Arizona	7	7	1	0,00507	11	
Brasil	53	29	0,969	0,02489	49	
California	8	2	0,25	0,00038	1	
El Progresso	6	6	1	0,00558	11	1,47973
Florida	6	3	0,6	0,00335	6	
Texas	6	6	1	0,00751	11	
Georgia	5	4	0,9	0,00699	10	
Total	91	31	0,918	0,03486	53	

N: número de sequências; H: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; Pi: diversidade nucleotídica; S: sítios polimórficos; Tajima's D Test: teste de neutralidade. *Não foi possível calcular para o Mississipi por ter apenas uma sequência.

O teste de neutralidade D de Tajima apresentou resultados não significativos para as diferenças entre as sequências, o que quer dizer que não há pressão seletiva atuando nas sequências, ou seja, a diversidade existente dentro das populações é ao acaso, é neutra.

Na análise da rede de haplótipos (figura 1) podemos observar uma separação entre as populações da América do Norte e América do Sul e que elas não compartilham haplótipos entre si. Vemos que a distância que separa as populações é de 17 passos mutacionais. Possivelmente, a distância observada entre as Américas é dada pela falta de coleta entre os dois pontos. Observamos também que entre as populações da América do Norte não há estrutura, já na população da América do Sul existe uma segregação, ainda que por poucos passos mutacionais.

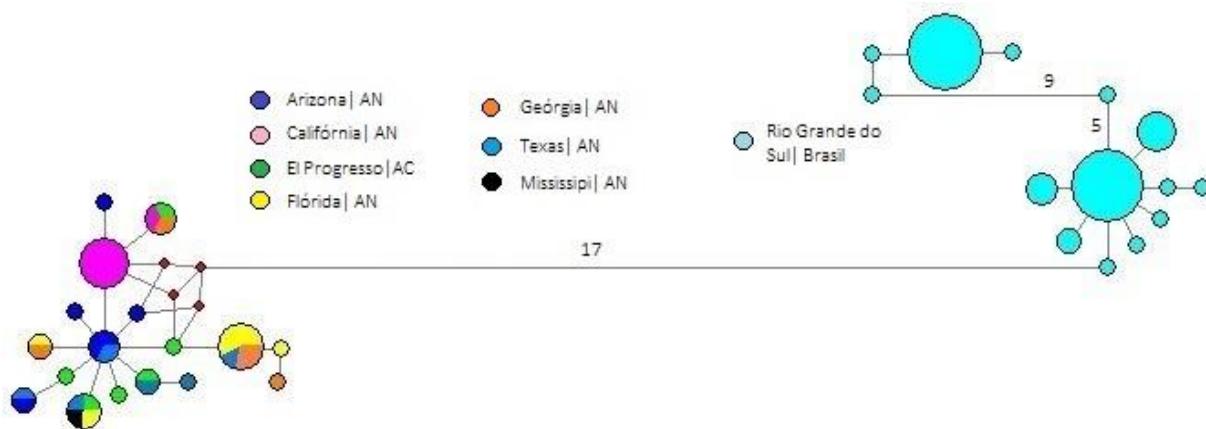


Figura 01: Rede de haplótipos da sequência de COI de *Tadarida brasiliensis*. Os números representam a quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos. Os links sem número apresentam menos de 5 passos mutacionais.

Os dados de Fst demonstram que as populações da América do Norte e do Sul não estão fixadas. Valores mais baixos correspondem a menores diferenças entre as sequências comparadas, valores mais altos correspondem a maiores diferenças. A variação entre as populações da América do Norte e do Sul vai de 0,73233 a 0,79375. A variação entre as populações da América do Norte vai de -0,00909 a 0,75789. Como estamos trabalhando com apenas uma população da América do Sul não é possível calcular, não temos dados para variação intrapopulacional.

As variações interpopulacionais com números mais elevados estão na Califórnia. Na Califórnia a variação só na América do Norte vai de 0,2589 a 0,75789. Já a variação entre as demais populações é baixa. O baixo valor indica pouca diferenciação gênica, ou seja, indica um alto fluxo gênico entre essas populações. Este mesmo padrão é observado na população da América do Sul, demonstrando um alto fluxo gênico.

Os índices de Fst de comparação das populações ao Sul da distribuição de *T. brasiliensis* com as populações ao Norte da distribuição apresentaram valores bastante altos, indicando uma alta fixação das sequências nucleotídicas, representando um baixo fluxo gênico entre essas populações.

4. CONCLUSÕES

Analizando os dados obtidos em conjunto para o gene COI de *Tadarida brasiliensis* pode-se dizer que há uma divisão entre as populações da América do Norte e da América do Sul. Estes resultados corroboram com os dados da região controle (D-loop), onde também se observou estrutura genética entre as populações das Américas (SOUZA et al, 2017).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BROWN, W.M. The mitochondrial genome of animals. In: **Molecular Evolutionary Genetics**, R.J. MacIntyre (ed.). New York: Plenum Press, p. 95-130, 1985.

DERYCKE, Sofie et al. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. **Plos One**, v. 5, n. 10, p. e13716, 2010.

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 pf DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451 – 1452, 2009.

SIMAS, P.V.M et al. **Bat Coronavirus in Brazil Related to Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses.** Emerging Infectious Diseases. v. 21, n. 4, p.729-731, 2015.

SOUZA, Angel et al. **Diversidade haplotípica de Tadarida brasiliensis (Chiroptera: Molossidae) baseado nas sequências da região controladora do DNAmt disponível *in silico*.** In: ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2017. Pelotas. Anais.... Pelotas: Encontro de Pós-Graduação Universidade Federal de Pelotas, 2017. p. 1 - 4.

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.

Wilmer, J.W; Moritz, L; Hall, C. and Toop, J. **Extreme Population Structuring in the Threatened Ghost Bat, Macrodermagigas: Evidence from Mitochondrial DNA.** Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences. v.257, p.193-198, 1994.

WILKINS, T. K. **Mammalian Species Tadarida brasiliensis.** The American Society of Mammalogists, n.331, 1989.