

Eixo Temático: Biologia Aplicada

**ET-09-012**

**AVALIAÇÃO DA SIMILARIDADE ENTRE POPULAÇÕES DE *Drosophila nebulosa* (INSECTA, DIPTERA) DA CAATINGA e FLORESTAS**

Rafaela Alves de Oliveira<sup>1</sup>, Georgia Fernanda Oliveira<sup>1</sup>, Zilpa das Graças Silva de Melo<sup>1</sup>, Vera Lúcia da Silva Valente<sup>2</sup>, Claudia Rohde<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória (UFPE-CAV),

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<http://dx.doi.org/10.21472/congrebio2016.et-09-012>

**RESUMO**

Neste trabalho foram estimados os níveis de similaridade genética em populações naturais de *Drosophila nebulosa* por meio de marcadores genômicos denominados ISSR. Foram avaliados 90 indivíduos, de cinco populações da espécie, provenientes de áreas de proteção ambiental da Caatinga, Floresta Atlântica e Floresta Amazônica. Houve elevada diferenciação genética entre as populações investigadas ( $F_{ST}$  0,3341), sendo a população de Belém (Pará) mais similar à população da Reserva Biológica de Guaribas (Paraíba), enquanto que a população do Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco) foi similar tanto à população da Reserva Ecológica de Tapacurá (Pernambuco) quanto do Parque Nacional da Capivara (Piauí).

**Palavras-chave:** Diferenciação Genética; *Inter Simple Sequence Repeats*; Biomas.

**INTRODUÇÃO**

O Brasil se destaca mundialmente por sua biodiversidade e elevado grau de endemismos presentes em suas diferentes fitofisionomias, com destaque para a Caatinga, a Floresta Atlântica e a Floresta Amazônica. Nestes ambientes são encontradas moscas da família Drosophilidae, em especial a espécie *Drosophila nebulosa*, capaz de habitar tanto ambientes do semiárido, onde aparece em elevadas frequências, quanto nas matas úmidas. Embora a espécie apresente esta grande plasticidade adaptativa a ambientes naturais extremos, pouco se sabe sobre a variabilidade genética dentro e entre suas populações naturais. Estudos sobre a variação genética das populações associado ao conhecimento da sua dinâmica populacional são fundamentais para compreender os mecanismos evolutivos da espécie e para a manutenção e adaptação dos indivíduos no seu habitat natural.

**OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética em populações naturais de *Drosophila nebulosa* por meio de marcadores genéticos denominados ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

**METODOLOGIA**

Foram selecionados 90 indivíduos de *D. nebulosa* provenientes de cinco diferentes localidades, abrangendo as regiões Norte e Nordeste do Brasil, e representando os biomas Floresta Amazônica (amostra de Belém-Pará), Floresta Atlântica (amostra da Estação Ecológica do Tapacurá-Pernambuco e da Reserva Biológica de Guaribas-Paraíba) e Caatinga (amostras do Parque Nacional do Catimbau-Pernambuco e do Parque Nacional Serra da Capivara-Piauí). As

coletas dos adultos foram feitas entre 2013 e 2015, com uso de armadilhas suspensas contendo isca de banana, seguindo o modelo de Tidon & Sene (1988). Para cada população foram analisados 10 indivíduos, cada um representando a descendência de uma linhagem isofêmea, estabelecida em laboratório logo após a coleta em campo.

### **Preparação e análise do material genético**

O DNA total foi extraído individualmente, de cada macho de *D. nebulosa*, utilizando-se o kit Puregene (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante. Quatro *primers* ISSR foram selecionados para as análises: UBC 807 ((AG)<sub>7</sub>AGT), UBC 808 ((AG)<sub>7</sub>AGC), UBC 842 ((GA)<sub>8</sub>YG) e UBC 844 ((CT)<sub>8</sub>RC), e escolhidos por produzirem um elevado número de bandas polimórficas, geradas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As reações de amplificação foram realizadas em volume de 20 µL (20 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada dNTP, 1 mM de *primer*, 2,0 µL de tampão de PCR 10x, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 U de Taq-DNA polimerase e água destilada). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C para desnaturação, e 72 °C por 2 minutos de extensão, finalizando com um ciclo de extensão a 72 °C por 7 minutos. As condições temperatura de anelamento variaram conforme o *primer* utilizado, sendo o UBC 807 foi a 50,4 °C, e os demais *primers* a 52,8 °C. Um controle negativo com ausência de DNA foi utilizado em cada reação para confirmar a ausência de contaminação no *mix* de PCR.

Os fragmentos de DNA amplificados foram corados com GelRed (diluição 1:500) e separados em gel a 1,5 % por eletroforese, a uma tensão de 90 V, corrente de 100 mA e potencial 12 W, durante quatro horas, em tampão TBE 1x. Os géis foram fotografados com foto documentador Digi Doc-It (UVP) acoplado a transiluminador de luz UV. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram estimados por DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Apenas as bandas que mostraram amplificação consistente (livre de dúvidas) foram consideradas, sendo excluídas da análise as bandas muito fracas ou mal definidas. A partir dos resultados dos géis foram construídas matrizes binárias de presença (1) e ausência (0) de bandas, que foram analisadas nos programas Arlequin versão 3.5 (Excoffier & Lischer 2010), para obtenção do índice de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ), e Teste de Variância Molecular (AMOVA), com partição em dois níveis (dentro e entre populações).

Para a análise da diversidade genética das populações de *D. nebulosa* foi calculado o índice de diversidade de Nei ( $h$ ) e o índice de diversidade de Shannon ( $I$ ), com o programa Pop Gene (*Software for Population Genetic Analysis*) versão 1.32, assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg e tendo em vista a natureza dominante do marcador ISSR. No mesmo programa foram calculados os índices de heterozigosidade total observada e esperada, e a análise do fluxo gênico, obtido através do número de migrantes nas populações.

Para análise da estruturação da diversidade das populações de *D. nebulosa* foi empregada a abordagem Bayesiana sem hierarquização *a priori*, realizada no *software* Structure versão 3.2.4. A análise da estruturação das populações foi representada pelo valor K, que caracteriza as amostras pelo conjunto de frequências dos alelos compartilhados, em cada locus. Foram testados os valores de K variando de 1 a 10 e o número real de K escolhido foi a partir do método de predição baseado nos valores de K (Evanno et al., 2005). Os gráficos de estruturação genética das amostras foram gerados no programa Structure Harvester versão 2.3.4 (Evanno et al., 2005). Os grupos genéticos também foram testados utilizando o programa Mega 6.0, onde uma árvore de distância foi gerada de acordo com o modelo *Neiborn Joining* com método *bootstrap* com 1000 repetições.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Análise do polimorfismo ISSR**

Foram identificadas 82 bandas polimórficas em 90 indivíduos da espécie, variando de 300 pb e 2.000 pb de tamanho (Tabela 1). O polimorfismo de *loci* variou de 35,8 % (em Tapacurá) a 83,9 % (em Belém), com média de 63,4 %. Considerando o acasalamento ao acaso

e o equilíbrio de Hardy-Weinberg, os valores  $h$  variaram nas populações de 0,22 a 0,48, com média de 0,3597, sendo considerada alta de acordo com Nei (1978). O índice de diversidade genética  $I$  variou de 0,1493 a 0,3263, com média de 0,24 (Tabela 1). A heterozigosidade total observada nas populações foi 0,33 e a heterozigosidade esperada foi 0,24, sendo considerada alta de acordo com Nei (1978). O fluxo gênico, avaliado pelo número de migrantes entre as populações, foi considerado baixo, com valor de 1,3545. Este valor está de acordo com o esperado, pois na maioria dos casos, a distância geográfica entre duas populações esteve acima dos 600 km.

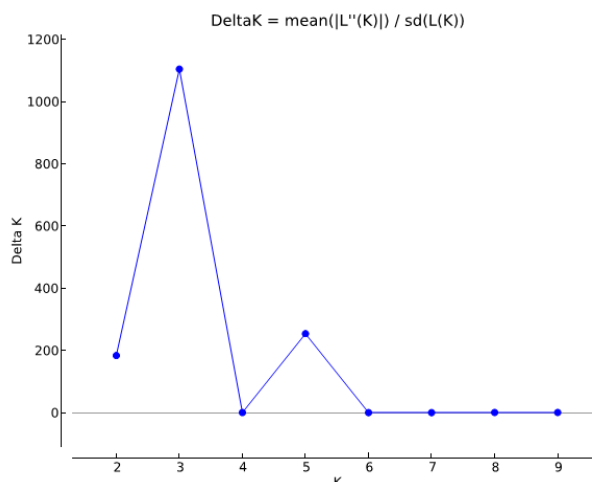
**Tabela 1.** Número total de indivíduos analisados, número de *loci*, número *loci* polimórficos e percentual de polimorfismo (%), para cada população analisada de *D. nebulosa* para o marcador ISSR.

População (Código)	Número de indivíduos	Número de <i>loci</i> polimórficos	% de polimorfismo	$I$	$H$
BEL	20	68	83,9	0,34	0,48
GUA	18	56	69,1	0,28	0,40
TAP	17	29	35,8	0,15	0,22
CAT	18	51	63,0	0,24	0,35
CAP	17	53	65,4	0,23	0,35
Total	90	82			
Média			63,4	0,24	0,36

$h$  índice de diversidade de Nei (1978), assumido o equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $I$ , índice de diversidade genética de Shannon & Weaver (1949). BEL = Município de Belém; GUA = Reserva Biológica de Guaribas; TAP = Estação Ecológica do Tapacurá; CAT = Parque Nacional do Catimbau; CAP = Parque Nacional Serra da Capivara.

### Análise da estrutura populacional

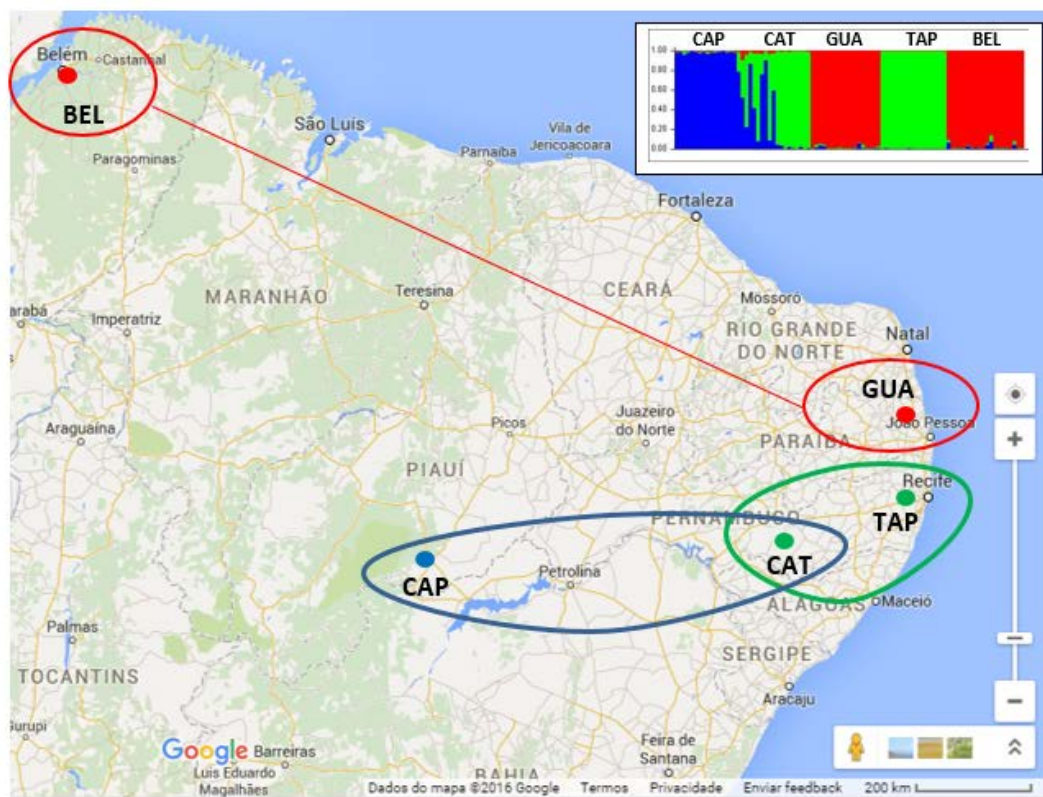
As populações analisadas mostraram uma elevada estruturação populacional, com valor médio do índice de diferenciação  $F_{ST} = 0,3341$ . A análise do AMOVA mostrou que a maior parte da variação dos indivíduos está retida dentro das populações (66,5%). A análise de mistura apontou três grupos genéticos ( $K=3$ ) entre as cinco populações naturais de *D. nebulosa* estabelecidas *a priori*. Este número de grupos foi dado pelo maior valor do Delta K como mostrado na Figura 1. Um segundo pico também pode ser observado na figura, ( $K=5$ ), em conformidade com o número de populações estabelecidas *a priori*.



**Figura 1.** Valores de Delta K obtidos para cada valor de K (1 a 10) em *Drosophila nebulosa* a partir de bandas ISSR.

A análise da ancestralidade das subpopulações de *D. nebulosa* indicou três agrupamentos genéticos diferenciados, conforme apresentado na Figura 2. Um deles foi formado pela população CAP e CAT (em azul na figura), outro por CAT e TAP (em verde), e outro por GUA e BEL (em vermelho). Chama atenção na imagem que a população CAT, compartilhou ancestralidade com TAP, proveniente da Floresta Atlântica, com a qual é mais próxima geograficamente (244 km), mas também compartilhou com CAP, com a qual compartilha o mesmo bioma, a Caatinga. Por outro lado, as duas populações da Floresta Atlântica (TAP e GUA), as mais próximas geograficamente, não se agruparam, enquanto que GUA e BEL, distantes 1.598 km, se agruparam no mesmo *pool* genético.

Uma matriz de identidade genética gerada com os dados ISSR, par a par entre as populações, está apresentada na Tabela 2. O teste de Mantel indicou que a diferenciação genética observada não pode ser explicada pela distância geográfica entre as populações.



**Figura 2.** Mapa parcial da região Nordeste do Brasil, e localização das amostras de *D. nebulosa*. BEL=Belém (Pará), GUA=Guaribas (Paraíba), TAP=Tapacurá (Pernambuco), CAT=Catimbau (Pernambuco), CAP=Cativara (Piauí). No alto e à direita da figura está apresentado o agrupamento das amostras, a partir de dados ISSR, sendo em vermelho o agrupamento entre BEL e GUA, em verde entre TAP e parte de da amostra de CAT, e em azul CAP e parte de CAT. Fonte: Elaborada pelos autores.

Uma matriz de identidade genética gerada com os dados ISSR, par a par entre as populações, está apresentada na Tabela 2. O teste de Mantel indicou que a diferenciação genética observada não pode ser explicada pela distância geográfica entre as populações.

**Tabela 2.** Matriz de distância par a par de valores  $F_{ST}$  para dados de ISSR em populações de *Drosophila nebulosa*. Em amarelo destacam-se os valores de  $F_{ST}$  mais elevados.

População	CAP	CAT	GUA	TAP	BEL
CAP	*****				
CAT	0,1000	*****			
GUA	0,1293	0,1353	*****		
TAP	0,2215	0,1170	0,2492	*****	
BEL	0,1031	0,1394	0,0530	0,2567	*****
Média	<b>0,3341</b>				
(desvio padrão)	<b>0,0229</b>				

Na matriz acima, os três maiores valores de distância genética (0,2567, 0,2492 e 0,2215) se referem sempre às comparações da população TAP (Tapacurá) com as demais BEL, GUA e CAP, respectivamente.

Os resultados aqui apresentados indicam que os quatro *primers* ISSR escolhidos foram satisfatórios para a detecção de polimorfismo e estruturação entre as cinco populações geográficas de *D. nebulosa*, de três distintas fitofisionomias.

De acordo com os índices de diversidade de Nei e de Shannon a população com maior diversidade genética foi BEL (Belém), representando a Floresta Amazônica brasileira, que em termos de área é o maior bioma do Brasil. Já as análises de distância genética indicam TAP (Tapacurá) como a população com maiores índices de diferenciação nas comparações com BEL, GUA e CAP, nesta ordem. Este resultado também foi reportado recentemente por Coutinho-Silva (2016), na comparação feita para resultados ISSR de outra espécie também coletada em TAP, a *Drosophila sturtevanti*. Assim, TAP parece ser um interessante local, aparentemente bastante distinto de outros ambientes naturais já estudados para o marcador.

Da mesma forma, CAT (Parque do Catimbau) chama atenção pela aparente semelhança genética de seus indivíduos tanto com CAP (Parque da Capivara), situada na Caatinga do estado do Piauí, quanto com TAP, situada em plena Floresta Atlântica. Evidências palinológicas relatadas por Nascimento et al. (2009) sugerem que a região do Catimbau já foi mais úmida do que é hoje, e que na região haviam importantes espécies vegetais como, por exemplo o babaçu, fonte de alimento de grupos humanos primitivos. Isso sugere, portanto, que o Catimbau possa ter sido mais úmido no passado o que explicaria, em parte, a semelhança genética encontrada neste trabalho, com o marcador ISSR, de parte da população de *D. nebulosa* de CAT com TAP.

Esta e outras questões serão melhor estudadas com a continua melhoria da aplicação e análise da metodologia ISSR e inclusão de um número cada vez maior de novas populações e espécies de drosofilídeos da região Nordeste do Brasil.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que o número de migrantes foi considerado baixo e as populações de *D. nebulosa* analisadas mostraram uma elevada estruturação populacional. A maior parte da variação, cerca de 65%, está retida dentro das populações. Entre as cinco populações estabelecidas, a análise apontou três grupos de *pool* genéticos, sendo esses formados por CAP e CAT, CAT e TAP e outro por GUA e BEL. Logo, os agrupamentos formados, e que se basearam na similaridade genética, não podem ser explicados pelo distanciamento geográfico entre as populações.

Para melhor entender os processos envolvidos na diferenciação genética da espécie *D. nebulosa* entre a Caatinga e Florestas, sugere-se a continuidade deste estudo, com a inclusão de novas populações, localizadas, por exemplo, entre as regiões geográficas de BEL e GUA, e também entre CAP, CAT e TAP.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências financiadoras Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

## REFERÊNCIAS

COUTINHO-SILVA, R. D. **Efeitos da sazonalidade em parâmetros ecológicos e genéticos de drosofilídeos (Insecta, Diptera) no Norte da Floresta Atlântica**. Recife: Universidade de Pernambuco, 2016 (Dissertação de mestrado).

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Mol. Ecol.**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L., LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol. Ecol. Res.**, v. 10, p. 564-567. 2010.

NASCIMENTO, L. R. L. S.; OLIVEIRA, P. E.; BARRETO, A. M. F. Evidências palinológicas do processo de ocupação humana na região do Parque Nacional do Catimbau, Buíque, PE. **CLIO, Série Arqueológica (UFPE)**, v. 1, p. 1-10, 2009.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949.

TIDON, R.; SENE, F. M. A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. **Dros. Inf. Serv.**, v. 67, p. 90, 1988