

ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE POPULAÇÕES DE *Simulium rubrithorax* Lutz (DIPTERA: SIMULIIDAE)

Barbara Suelen Ferreira de CASTRO¹
Vanderly ANDRADE-SOUZA²
Neusa HAMADA³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientadora INPA/Bolsista DCR
CNPQ/FAPEAM; ³Coorientadora CBIO/INPA

INTRODUÇÃO

A filogeografia tem um papel fundamental no estudo de populações, pois tem como finalidade desvendar a história genealógica dos seres vivos, considerando o espaço e o tempo (Cunha e Solé-Cava 2012; Martins e Domingues 2011). Estudo filogeográfico com *Simulium*, especialmente na Tailândia, indicou que mudanças climáticas ocorridas durante Pleistoceno influenciou a diferenciação geográfica (Pramual *et al.* 2005), no Brasil tais estudos ainda são escassos.

A família Simuliidae está ausente apenas na Antártica, desertos e ilhas onde não há condições favoráveis para que as larvas se desenvolvam (Adler *et al.* 2004). Possui aproximadamente 2.150 espécies, incluindo 12 fósseis, sendo que na Região Neotropical ocorrem 320 espécies, destas, 92 são registradas para o Brasil. Os representantes desta família apresentam alta similaridade morfológica e é mundialmente conhecida por apresentar diversos casos de espécies crípticas (Hamada *et al.* 2014). Algumas espécies possuem hábito hematofago, por isso podem ser vetores de agentes etiológicos, tais como vírus, bactérias, protozoários e helmintos. Dentre estes a *Manzonella ozzardi* Manson e a *Onchocerca volvulus* (Leuckart), causadores da mansonelose e oncocercose, respectivamente. Essa última doença ocorre apenas na África, América Central e América do Sul, no entanto há poucos estudos, principalmente na região Neotropical (Shelley *et al.* 1997).

Entre as hematofagas está a espécie *Simulium rubrithorax*, a qual segundo Pepinelli (2008) é uma espécie zoofílica. Porém, Benchimol *et al.* (2006) relatam que esta espécie foi vista atacando pessoas na altura de 1.500m acima do mar, mas ainda assim afirmam que este borrachudo não apresenta sérios problemas, à vida do homem, contudo causam prejuízos econômicos quando em alta densidade, pois atacam rebanho e trabalhadores rurais provocando grande incômodo, resultando em redução na produtividade agropastoril. Áreas de turismo também podem ser afetadas quando espécies antropofílicas dessa família se encontram em alta densidade, tornando essas áreas inacessíveis (Shelley *et al.* 1997; Campos e Andrade 2002).

Esta espécie ocorre na Argentina, Bolívia, Colômbia, Venezuela e no Brasil, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Roraima, Santa Catarina (Adler e Crosskey, 2014).

Portanto o objetivo deste estudo foi analisar a relação filogeográfica e a variação intraespecífica em diferentes populações de *S. rubrithorax*, utilizando um fragmento da subunidade I do gene da Citocromo Oxidase (COI), bem como avaliar se esta espécie faz parte de um complexo de espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram analisadas 11 populações de *S. rubrithorax* oriundas de oito estados: Bahia, Ceará, Mato Grosso, Minas Gerais, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Roraima e São Paulo. Para a extração de DNA foi utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). As extrações foram feitas pelo método não destrutivo, diferindo de acordo com o estágio dos imaturos, mantendo a estrutura externa como *voucher*. As sequências parciais do gene COI das populações foram amplificadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* desenvolvidos por Folmer *et al.* (1994).

Em seguida, as amplificações com resultado positivo foram purificadas com as enzimas Exonuclease (EXO I) e Fosfatase Alcalina Termossensível (FastAP). Os produtos purificados foram enviados ao Centro de Estudos do

Genoma Humano (USP-SP) ou para Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO – UNESP/Jaboticabal), onde foram sequenciados com os respectivos *primers* que foram usados para amplificação. As seqüências foram alinhadas e editadas no programa BioEdit v. 5.0.6 (Hall, 1999). No programa *Arlequin* (Schneider *et al.* 2000) foram calculados para cada população: número médio de diferenças nucleotídicas, diversidades haplotípica e nucleotídica, frequências e compartilhamento de haplótipos. Neste programa também foram feitas análises *Mismatch* e AMOVA e teste de Mantel. A matriz de distância genética foi construída no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) utilizando o modelo de substituição de bases nucleotídicas Kimura-2-Parâmetros (K2P). As relações entre os haplótipos foram inferidas por meio de *Median Joining* no programa *Network* (Bandlet *et al.* 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das populações de *S. rubrithorax* analisadas foram obtidas 109 seqüências contendo 665 pares de base (pb), dos quais 119 são sítios polimórficos, destes 86 são sítios informativos para parcimônia. Como esperado para DNA mitocondrial de insetos, a maior porcentagem foi de T + A (67,0%). A análise mostrou que houve maior número de transições ($\Gamma_s=77$) do que transversões ($\Gamma_v=43,0$) (Tabela 1).

Tabela 1. Medidas de diversidade genética para cada população incluída no estudo

População	Ts/Tv	NS	K	h±SD	π ±SD	HP/e
1. 09BA	7/2	16	3,927	0,855±0,085	0,0059±0,0036	7/7
2. 17CE	7/0	7	1,167	0,455±0,170	0,0018±0,0014	4/4
3. 17MT	8/1	15	5,333	0,944±0,070	0,0080±0,0049	9/9
4. 01MG	11/1	14	5,429	0,952±0,096	0,0082±0,0051	6/5
5. 27MG	19/5	26	5,879	0,970±0,044	0,0088±0,0051	10/5
6. 08MG	7/0	9	2,205	0,782±0,105	0,0033±0,0022	6/4
7. 22PE	7/2	16	2,374	0,857±0,108	0,0035±0,0023	8/7
8. 31RS	4/4	14	6,400	0,900±0,161	0,0097±0,0064	5/5
9. 03RR	8/2	11	3,667	0,933±0,122	0,0055±0,0037	5/5
10. 01SP	8/5	14	3,418	0,927±0,066	0,0051±0,0032	9/5
11. 30SP	14/3	17	3,543	0,933±0,054	0,0053±0,0032	11/8

Ts/Tv, transição/transversão; NS, número de sítios polimórficos; K, número médio de diferenças nucleotídicas; h±SD e π ±SD, diversidades haplotípicas e nucleotídicas, respectivamente, com respectivos desvios padrão; HP/e, N° de haplótipos/haplótipos exclusivos.

Como medida da diferenciação genética foram avaliadas as diversidades haplotípica e nucleotídica. A primeira variou de 0,455 a 0,970, nas populações 17CE e 27MG, respectivamente. As diversidades nucleotídicas de modo geral foram baixas, variando de 0,008 na população 27MG a 0,0069 na população de 01MG, diferente dos dados obtidos em outros trabalho com simulídeo (Pramual *et al.* 2005). Quanto ao número médio de diferenças nucleotídica foi maior na população do Rio Grande do Sul (K=6,4) (Tabela 1). A AMOVA indicou que 82,49% da variação genética foi obtida entre as populações.

A distância genética média intrapopulacional foi de 0,50%, variando de 0,18% a 0,80%, nas populações 17CE e 27MG, índices esperados neste tipo de análise em simulídeos. A distância interpopulacional variou de 0,47%, entre 01SP e 08MG a 10,88% entre 31RS e 03RR. Considerando a população 03RR em relação às demais a média foi de 10,37%, indicando que esta população pode representar outra espécie ou uma espécie críptica. Análises morfológicas deverão ser feitas para comparar os espécimes. Levando em consideração as análises feitas sem a população 03RR a maior distância interpopulacional foi de 4,2%, entre a 31RS e 22PE (Tabela 2). Em um estudo com outra espécie de *Simulium* a distância entre populações localizadas em lados opostos do rio Amazonas, a

distância intraespecífica foi de 5,9%, maior que a distância interespecífica, mais próximas geograficamente (dados não publicados). De acordo Rivera e Currrie (2009) a distância de 4,8-6,5% indicou a presença de diversidade críptica. Já nos estudos de Hernandez-Triana *et al.* (2012, 2015), o limite está acima de 3,2%. Os dados aqui obtidos apontam que as populações 22PE e 17CE, podem representar uma espécie críptica de *S. rubrithorax*, uma vez que a média da distância genética em relação às demais foi de 3,65% (Tabela 2).

Tabela 2. Distância genética (%) intrapopulacional (diagonal e em negrito) e interpopulacional (abaixo da diagonal) estimada usando o modelo K2P.

	09BA	17CE	17MT	01MG	27MG	08MG	22PE	01RS	03RR	01SP	30SP
09BA	0,36										
17CE	3,92	0,18									
17MT	0,67	3,58	0,54								
01MG	0,64	4,00	0,79	0,69							
27MG	0,67	3,91	0,81	0,74	0,80						
08MG	0,47	3,62	0,56	0,59	0,61	0,29					
22PE	4,01	1,05	3,64	4,11	4,00	3,73	0,57				
01RS	0,69	4,16	0,82	0,77	0,77	0,58	4,24	0,52			
03RR	10,28	10,11	10,40	10,44	10,45	10,29	10,08	10,88	0,51		
01SP	0,50	3,76	0,69	0,65	0,66	0,47	3,85	0,67	10,38	0,49	
30SP	0,51	3,94	0,71	0,67	0,68	0,49	4,03	0,69	10,32	0,52	0,54

Os testes Tajima's D e Fu's são usados para testar o equilíbrio das populações. O primeiro indicou que somente as populações 17CE (-1.94368, p=0,004) e 27MG (-1.49581, p=0,004) foram negativas e significativas, portanto são populações que estão em processo de expansão populacional. Por outro lado o teste Fu's que é mais sensível para detectar expansão populacional (Pramual e Nanork, 2012; Scarpassa e Alencar, 2012) revelou que somente a população de

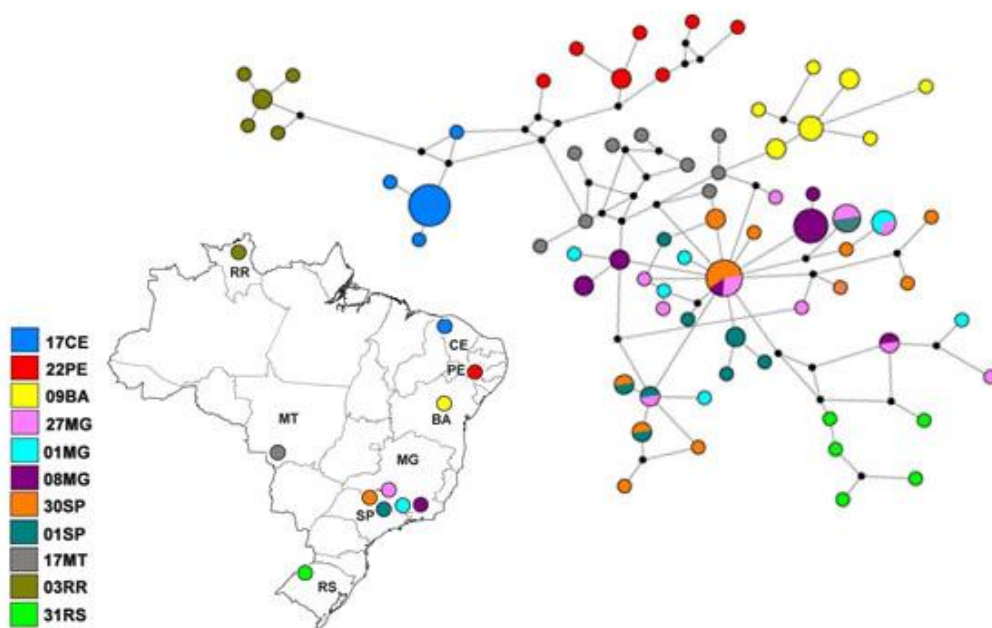


Figura 1. Rede de haplótipos feita no programa Network. Círculos pretos são vetores medianos, que indicam os haplótipos intermediários que não foram amostrados ou que estão extintos. O tamanho dos círculos é proporcional a frequência do haplótipos. As cores dos pontos no mapa indicam a origem dos haplótipos.

Na análise de distribuição *Mismatch* as populações 22PE, 01MG, 31RS e 03RR apresentaram uma distribuição multimodal, o que indica que estão em equilíbrio populacional. O baixo número de indivíduos analisados nas três últimas pode ter influenciado esta análise, pois a maior amostragem pode ser mais eficiente para representar a distribuição das diferenças, que é avaliada nesta análise.

Na rede de haplótipos formou três haplogrupos: 1) 01RR; 2) 17CE e 22PE e 3) incluem as demais populações, as quais compartilham haplótipos. Este último grupo está coerente com a baixa distância genética e proximidade genética entre estas populações.

CONCLUSÃO

As análises apontam a ocorrência de um complexo de espécie, uma vez que as populações 17CE, 22PE e, principalmente, 03RR apresentaram alta diferenciação genética. Análises morfológicas deverão ser feitas com a população 03RR para melhor elucidação. Os resultados deste estudo também apontam que a diferenciação genética interpopulacional está relacionada à distância geográfica, pois populações que estão mais próximas apresentaram baixa diferenciação genética, além disso, compartilharam haplótipos. Observou-se também que a maioria das populações está em processo de expansão populacional.

REFERÊNCIAS

- Adler, P.H.; Currie, D.C.; Wood, D.M. 2004. *The Black Flies (Diptera:Simuliidae) of North America*. Cornell University Press, United States of America. 941p.
- Adler, P.H.; Crosskey, R.H. 2014. *World Blackflies (Diptera: Simuliidae): A Comprehensive Revision Of The Taxonomic And Geographical Inventory*. Clemson University Press, South Carolina, USA.
- Benchimol, J.L.; SÁ, MR., eds. and orgs. Adolpho Lutz : Entomologia = *Entomology* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2006. 1056 p. Adolpho Lutz Obra Completa, v.2, book 4. ISBN: 85-7541-097-0. Available from SciELO Books < <http://books.scielo.org>>.
- Bandlet, H., Forster, P., Rohl, A. 1999. Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. v. 16, p 37–48.
- Campos, J.; Andrade, C.F.S. 2002. Resistência a inseticidas em populações de *Simulium* (Diptera, Simuliidae). *Cad. Saúde Pública*. v. 18, n. 3.
- Cunha, H.A.; Solé-Cava, A.M. 2012. Análise filogeográfica. In: Fernandes, F.M.C; Matioli, S.R. (eds). *Biologia Molecular e Evolução*. Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Universidade Federal: Sociedade Brasileira de Genética., p.197-215.
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294-299.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hamada, N.; Silva, J.O.; Pepinelli, M.; Trindade, L.R.R. 2014. Ordem Diptera - Família Simuliidae. In: Hamada, N. Nessimian, J.L.; Querino, R.B. (ED.). *Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia* Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas. p.683-710.
- Hernandez-Triana, L.M.; CRAINEY, J.L.; Hall, A., Fatih, F.; Mackenzie-Dodds, J.; Shelley, A.; Zhou, X.; Post, R.J.; Gregory, T.R.; Hebert, P.D.N. DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and related taxa in the New World. *Zootaxa*. 3514: 43-69. 2012.
- Martins, F.D.M; Domingues, M.V. 2001. filogeografia. *revista da biologia*. vol. esp. biogeografia. p. 26-30.
- Pepinelli, M. 2008. *Simuliidae (Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo*. Tese de doutorado, Universidade de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 144p.
- Pramual, P.; Kuvangkadilok, C.; Baimai, V.; Walton. C. 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology*, 14: 3989-4001.

- Pramual, P.; Nanork, P. 2012. Phylogenetic analysis based on multiple gene sequences revealing cryptic biodiversity in *Simulium multistriatum* group (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Entomological Science*. v. 15, p 202–213.
- Rivera, J.; Currie, D.C. 2009. Identification of Nearctic Black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology*, 9 (Suppl. 1): 224-236.
- Schneider, S.; Roessli, S.; Excoffier, L. Arlequin: A software for population genetic data analysis, version 2.000. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland. 2000.
- Scarpassa, V.M.; Alencar, R.B. 2012. *Lutzomyia umbratilis*, the Main Vector of *Leishmania guyanensis*, Represents a Novel Species Complex PLoS ONE, p. 7: 5.
- Shelley, A.J.; Lowry, C. A.; Maia-Herzog, M.; Luna Dias, A. P. A.; Moraes, M. A. P. 1997. Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia onchocerciasis focus of Brazil. *Bulletin of the Natural History Museum of London (Entomol)*, 66: 1-18.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731–2739.