

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



Dissertação de Mestrado

Variação temporal da diversidade genética de uma colônia de *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) no sul do Brasil

Kelly Brondani

Pelotas, 2020

Kelly Brondani

Variação temporal da diversidade genética de uma colônia de *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) no sul do Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ricardo Pablos de Souza
Colaboradores: Prof. Dr. Ana Maria Rui
Prof. Dr. Juliana Cordeiro

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B869v Brondani, Kelly

Variação temporal da diversidade genética de uma colônia de *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) no sul do Brasil / Kelly Brondani ; Fábio Ricardo Pablos de Souza, orientador. — Pelotas, 2020.

44 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Genética ecológica. 2. Marcadores moleculares. 3. Morcegos. 4. Sazonalidade. I. Souza, Fábio Ricardo Pablos de, orient. II. Título.

CDD : 599.408

Kelly Brondani

Variação temporal da diversidade genética de uma colônia de *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) no sul do Brasil

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 16 de setembro de 2020

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fábio Ricardo Pablos de Souza (orientador)

Doutor em Genética pela Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Marco Antonio Tonus Marinho

Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Campinas.

Prof. Dr. William Douglas Mustin Carvalho

Doutor em Biologia Animal pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof. Dr. Márcia Raquel Pegoraro de Macedo

Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer aos meus pais, Gilmor e Enides, por todo o incentivo nessa etapa da minha vida, por terem me ajudado financeiramente nesses dois anos, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Quero agradecer a minha irmã Aline, que sempre acreditou no meu potencial e me apoiou nessa jornada. Também quero agradecer a minha tia Elaine e prima Suian, que sempre apoiaram as minhas decisões.

Agradeço imensamente a Profa. Dra. Gabriela Pasqualim, por ter me auxiliado no início do mestrado, tanto na parte de bancada, quanto na escrita da dissertação. Sem você, eu não teria aprendido tanto, afinal, entrei no mestrado sem nunca ter trabalhado na parte prática de biologia molecular e você foi à luz que eu precisava. Obrigada pela paciência, dedicação, puxões de orelha e apoio, você foi essencial na minha formação.

A Prof. Dra. Ana Maria Rui, que todo esse tempo esteve presente e disposta a me ajudar, tanto na coleta dos morcegos, quanto no projeto e na dissertação do mestrado.

A Prof. Dra. Juliana Cordeiro, que me auxiliou muito na prática, análise dos dados e escrita da dissertação, obrigada por todos os ensinamentos, paciência e dedicação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Ricardo Pablos de Souza, obrigada pela oportunidade de aceitar me orientar, pois o mestrado me fez crescer muito como pessoa e profissional.

Aos meus colegas do mestrado, que além de colegas se tornaram meus amigos, me auxiliaram nas minhas piores crises em Pelotas, incentivando a não desistir, por meio de conselhos e apoio. Obrigada Alessandro, Amanda, Giovanna, Jeferson e Guillermo. Em especial, quero agradecer a Letícia e a Daiana, vocês foram as melhores amigas que o mestrado me trouxe, eu agradeço por todo o apoio, incentivo, pelos tragos, conselhos, risadas, fofocas e desabafos, por terem acreditado no meu potencial e feito eu acreditar que sim, eu sou capaz, muito obrigada a vocês, docinho e lindinha.

Ao Roger, meu grande amigo, desde a graduação, me incentivou, aconse-

lhou, me auxiliou em toda a minha trajetória do mestrado, me mostrou que eu era capaz e que no final tudo iria dar certo, Obrigada.

Quero agradecer a Brenda, por ter me auxiliado na parte de bancada e que sofreu muito comigo na “padronização” das PCR’s. Obrigada pelo incentivo, dedicação, compreensão nesse tempo de estágio no laboratório DIVERGE. Obrigada por acreditar no meu potencial, pelos conselhos e apoio, além de colega, você se tornou uma grande amiga.

A Angel, que me auxiliou inicialmente no laboratório DIVERGE, ensinando várias técnicas de bancada, pelo incentivo, paciência, por ter me aconselhado a não desistir, obrigada por tudo, você é realmente um anjo.

Agradeço ao pessoal do DIVERGE, LEGIN e LEMA, laboratórios que me aceitaram desde o início, compartilhamos muitos momentos de alegrias, aprendizados, risadas e desabafos. Agradeço a todos vocês: Thaísa, Laura, Camila, Yasmin, Henrique, Mayara, Diniz, Márcio e Isa.

Agradeço a todos os professores do IB, que me acolheram e me auxiliaram mesmo não me orientando, obrigada pelo incentivo, aprendizados, agradeço em especial ao Marco Antonio Tonus Marinho, Monica Laner Blauth, Marco Silva Gottschalk e Cristiano Agra Iserhard.

Aos funcionários do IB, em especial ao seu Álvaro, pelas conversas e auxílio no laboratório.

Quero imensamente agradecer as minhas colegas de apartamento em Pelotas, Larissa e Caroline, vocês me ajudaram muito a seguir em frente, quando eu tive minhas crises de ansiedade e outros problemas pessoais. Vocês me aconselharam, me incentivaram e acreditaram sempre no meu potencial, além de toda risada, parceria, tragos e desabafos.

Não posso deixar de agradecer a minha psicóloga Marilan, sem você com certeza eu não teria chegado até aqui, obrigada pelos conselhos profissionais e pessoais e por me fazer acreditar mais em mim, você foi crucial para que eu não desistisse.

Também não posso deixar de agradecer a todos meus amigos de Panambi e Palmeira das Missões, obrigada pelas palavras de incentivo, risadas, desabafos, mesmo longe, vocês nunca deixaram de me apoiar e de acreditar em mim.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que participaram de alguma maneira dessa trajetória de forma positiva e também aqueles que participaram de uma forma negativa, que não me incentivaram e não acreditaram em mim, sem saber de toda a minha história de vida. A falta de incentivo de vocês foi essencial para eu me tornar uma pessoa muito mais forte e capaz.

*"Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades.
Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram
conquistas daquilo que parecia impossível."*

— CHARLES CHAPLIN

RESUMO

BRONDANI, Kelly. **Variação temporal da diversidade genética de uma colônia de *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) no sul do Brasil**. Orientador: Fábio Ricardo Pablos de Souza. 2020. 44 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Tadarida brasiliensis (L. GEOFFROY, 1824) é uma espécie insetívora da ordem Chiroptera pertencente à família Molossidae, sendo uma espécie amplamente distribuída no continente americano. Na América do norte, estudos ecológicos, genéticos e morfológicos da espécie são bem estudados. No Brasil, os estudos sobre a espécie são bem mais escassos, com apenas alguns trabalhos ecológicos descritos na literatura. Tendo em vista a falta de estudos sobre essa espécie na América do Sul, buscamos gerar informações a respeito da diversidade genética de uma colônia da espécie *Tadarida brasiliensis* no sul do Brasil, a partir do uso do marcador citocromo oxidase subunidade I (COI). Baseado em dados já observados para as populações de *T. brasiliensis* no sul do Brasil, a hipótese testada é que seriam encontradas diferenças sazonais na diversidade genética entre machos e fêmeas da colônia em estudo. Os 158 indivíduos da espécie foram coletados no município do Capão do Leão, RS, Brasil, por meio de armadilha de harpa. Para as análises genéticas, foram realizadas extrações de DNA, seguidas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram realizados cálculos estatísticos descritivos de diversidade genética de *T. Brasiliensis*, redes de haplótipos e testes de evolução neutra. Os resultados obtidos para o gene COI na colônia analisada, indicaram um alto número de haplótipos, alta diversidade haplotípica, baixa diversidade nucleotídica e baixo número de sítios polimórficos nos indivíduos analisados. Foi observada uma estruturação da população em dois haplogrupos mitocondriais, porém não houve diversidade genética significativa entre machos e fêmeas independente de estações do ano e de estágios reprodutivos. Os resultados obtidos indicaram que machos e fêmeas estão em processo de seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional recente. Apesar dos resultados gerados, é necessário diversificar os estudos de diversidade genética da espécie na América do Sul, ampliando amostra-

gens em outras localidades, além de utilizar outros marcadores moleculares para a confirmação destes resultados.

Palavras-chave: Genética ecológica. Marcadores moleculares. Morcegos. Sazonalidade.

ABSTRACT

BRONDANI, Kelly. **Temporal variation of the genetic diversity of a colony of *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) in southern Brazil.** Advisor: Fábio Ricardo Pablos de Souza. 2020. 44 f. Dissertation (Masters in Animal Biology) – Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Tadarida brasiliensis (L. GEOFFROY, 1824) is an insectivorous species of the order Chiroptera belonging to the family Molossidae, being a species widely distributed in the American continent. In North America, ecological, genetic and morphological studies of the species are well studied. In Brazil, studies on the species are much more scarce, with only a few ecological works described in the literature. In view of the lack of studies on this species in South America, we seek to generate information about the genetic diversity of a colony of the species *Tadarida brasiliensis* in southern Brazil, using the marker cytochrome oxidase subunit I (COI). Based on data already observed for the populations of *T. brasiliensis* in southern Brazil, the hypothesis tested is that seasonal differences would be found in the genetic diversity between males and females of the colony under study. The 158 individuals of the species were collected in the municipality of Capão do Leão, RS, Brazil, using a harp trap. For genetic analysis, DNA extractions were performed, followed by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Descriptive statistical calculations of *T. Brasiliensis* genetic diversity, haplotype networks and neutral evolution tests were performed. The results obtained for the COI gene in the analyzed colony, indicated a high number of haplotypes, high haplotypic diversity, low nucleotide diversity and low number of polymorphic sites in the analyzed individuals. A population structure was observed in two mitochondrial haplogroups, but there was no significant genetic diversity between males and females regardless of seasons and reproductive stages. The results obtained indicated that males and females are in the process of purifying selection, hitchhiking effect or recent population expansion. Despite the results generated, it is necessary to diversify the genetic diversity studies of the species in South America, expanding samples in other locations, in addition to using other molecular markers to confirm these results.

Keywords: Ecological genetics. Molecular markers. Bats. Seasonality.

LISTA DE FIGURAS

1	Imagem da espécie <i>Tadarida brasiliensis</i>	13
2	Distribuição de <i>Tadarida brasiliensis</i> nas Américas.	14
3	Mapa da área de estudo com a localização da colônia de <i>T. brasiliensis</i> no município do Capão do Leão/RS, Brasil.	20
4	Rede de haplótipos do marcador mitocondrial COI da colônia de <i>Tadarida brasiliensis</i> com relação à proporção sexual, períodos reprodutivos/ não reprodutivos e período sazonal, no município do Capão do Leão, RS, Brasil.	27

LISTA DE TABELAS

1	Parâmetros descritivos de diversidade genética do gene COI de <i>T. brasiliensis</i> no município do Capão do Leão, RS, Brasil.	24
2	Teste de neutralidade do marcador COI de machos e fêmeas de <i>Tadarida brasiliensis</i> coletados no Capão do Leão, RS, Brasil. . . .	28
3	Tabela do Haplogrupo 1 da colônia de <i>Tadarida brasiliensis</i>	43
4	Tabela do Haplogrupo 2 da colônia de <i>Tadarida brasiliensis</i>	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Taxonomia e sistemática	14
1.2	Genética molecular	15
1.3	Reprodução	16
1.4	Padrões de migração	16
1.5	Estudos ecológicos	17
1.6	Objetivos	19
1.6.1	Objetivos específicos	19
2	MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1	Área de estudo	20
2.2	Coleta dos indivíduos	20
2.3	Manipulação do DNA	21
2.4	Montagem e alinhamento das sequências consenso	22
2.5	Análises da diversidade genética	22
3	RESULTADOS	24
3.1	Sequências obtidas e teste de diversidade genética do marcador COI	24
4	DISCUSSÃO	29
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34
	APÊNDICE A PURIFICAÇÃO COM PEG 8000	41
	APÊNDICE B TABELAS DOS HAPLOGRUPOS 1 E 2	43

1 INTRODUÇÃO

Tadarida brasiliensis (L. Geoffroy, 1824) é uma espécie da ordem Chiroptera, pertencente à família Molossidae (WILKINS, 1989). Esta espécie (Figura 1) é exclusivamente insetívora, com dieta composta por lepidópteros, coleópteros e dípteros (WILKINS, 1989; FABIÁN; ARIGONY; HARTZ, 1990). Espécies de quirópteros com dieta insetívora possuem um papel fundamental no ecossistema (AGOSTA, 2002), auxiliado no controle de insetos considerados pragas agrícolas (BERNARD; AGUIAR; MACHADO, 2011; LÓPEZ-HOFFMAN et al., 2014). Além disso, estudos apontam que morcegos apresentam uma reposta mais rápida as mudanças climáticas do que outros mamíferos, sendo potenciais indicadores de mudanças ambientais e de qualidade de hábitat (GELUSO, 2007).



Figura 1 – Imagem da espécie *Tadarida brasiliensis*
Fonte: LINCOLINS, 2019.

Na América do Norte (Figura 2), a espécie *T. brasiliensis* ocorre em toda a porção centro-sul dos Estados Unidos até o México (RUSSELL; MCCracken, 2006). Na América Central ela apresenta uma distribuição descontínua, sendo ausente na Nicarágua (BARQUEZ, et, al., 2020). Já na América do Sul, a ocorrência da espécie segue da Venezuela, Colômbia, Peru, Equador, Bolívia, Paraguai, Uruguai, Argentina, Chile, ocorrendo também no Brasil (WILKINS, 1989). No Brasil, a espécie parece

ser mais abundante na região sul e sudeste, sendo que também existem registros isolados de ocorrência para a região do Pantanal brasileiro (WILKINS, 1989; SANTOS; BORDIGNON, 2011).

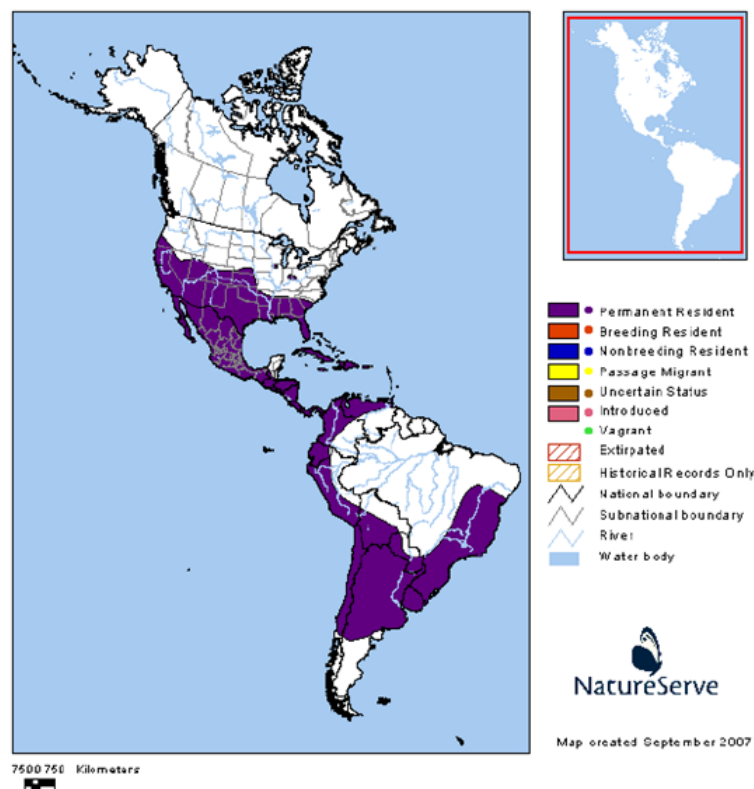


Figura 2 – Distribuição de *Tadarida brasiliensis* nas Américas.
Fonte: Animals and Ecosystems of Latin America [web application, 2007].

Em decorrência da espécie apresentar uma alta capacidade em explorar novos habitats, devido sua alta mobilidade, facilidade em formar colônias, além da tolerância fisiológica ao frio, recentemente, foi detectado que esta espécie expandiu sua distribuição para o norte dos EUA (MCCRACKEN et al., 2018).

As colônias da espécie podem chegar a ter milhares de indivíduos, e geralmente se abrigam em cavernas, grutas ou construções humanas, como, telhados, pontes, viadutos, vigas, e forros (DAVIS; HERREID; SHORT, 1962; VILLA; COCKRUM, 1962; LAVAL, 1973; MARQUES; FABIAN, 1994).

1.1 Taxonomia e sistemática

O gênero *Tadarida* apresenta ampla distribuição mundial (KOOPMAN, 1993), sendo composto por 10 espécies (WILSON; REEDER, 2005). A taxonomia de *Tadarida brasiliensis* é bastante complexa (SHAMEL, 1931). Baseado em estudos morfológicos, ecológicos e moleculares, acredita-se que existam pelo menos quatro subespécies, sendo, *T. b. cynocephala* com ocorrência no sudeste dos Estados Unidos; *T. b. mexicana* com ocorrência no sudoeste e oeste dos Estados Unidos ao México; *T. b.*

intermedia com ocorrência do sul do México ao Panamá; e *T. b. brasiliensis*, com ocorrência em toda a América do Sul (RUSSELL; MCCracken, 2006). Um último estudo publicado com relação à taxonomia da espécie, por meio de técnicas moleculares, sugeriu desconsiderar a classificação de subespécies de *T. brasiliensis* na América do Norte e Central (MORALES et al., 2016). Esses autores apontam que essas populações norte-americanas de *T. brasiliensis* sejam classificadas como migratórias ou não migratórias (MORALES et al., 2016).

1.2 Genética molecular

Em genética de populações, a diversidade genética é a variação que ocorre entre indivíduos da mesma espécie, entre espécies distintas ou entre grupo de espécies, sendo a informação genética transmitida ao longo das gerações e a diversidade a partir dos processos reprodutivos e dinâmicas populacionais das espécies (ZOLET et al., 2013).

O genoma mitocondrial é pequeno e circular, sendo um marcador bastante utilizado em eventos evolutivos recentes na história populacional da espécie (LLOYD et al., 2012), por ser uma molécula com facilidade de amplificação, possuir altas taxas de mutações sinônimas, apresentar herança maternal e não sofrer recombinações (JANSEN, 2000). Dessa forma, os polimorfismos presentes em genes mitocondriais são importantes para investigar a história populacional (ARIAS; FRANCISCO; SILVESTRE, 2003). Os genótipos de mtDNA são conhecidos como haplótipos, diferenciando um dos outros por apresentar mutações acumuladas ao longo do tempo (AVISE et al., 2000).

O marcador molecular citocromo oxidase subunidade I (COI) é considerado um dos genes codificadores de proteínas mais conservados no genoma mitocondrial (BROWN, 1985). Esse gene é responsável pela expressão da subunidade I da enzima citocromo oxidase, que atua no processo de respiração celular (NELSON; COX, 2002). O gene COI é bastante utilizado em estudos populacionais, filogenéticos e em estudos filogeográficos (DERYCKE et al., 2010). Além, disso, quando comparado com o genoma nuclear, o COI apresenta altas taxas evolutivas e variação intraespecífica intensa (AVISE et al., 2000).

Um estudo realizado na América do Norte, por meio de métodos filogenéticos e genéticos populacionais buscou examinar a estruturação genética de grandes populações da espécie *T. brasiliensis* (RUSSELL; MEDELLÍN; MCCracken, 2005). Nesse estudo foram usadas análises de sequência de mtDNA da região do controle mitocondrial D-loop, além de informações existentes de estudos de alozimas e história natural para compreender a relação entre migração e estrutura genética (RUSSELL; MEDELLÍN; MCCracken, 2005). Os resultados desse estudo indicaram que as aná-

lises de variância molecular não revelaram estruturação genética significativa entre grupos migratórios comportamentalmente distintos (RUSSELL; MEDELLÍN; MCCRACKEN, 2005). Já as análises demográficas apontaram para um crescimento populacional, embora o momento dos eventos de expansão populacional seja diferente entre as populações migratórias e não migratórias (RUSSELL; MEDELLÍN; MCCRACKEN, 2005).

Em outro estudo realizado nos Estados Unidos, usando dados publicados de aloenzimas e de sequências de DNA mitocondrial (mtDNA), foi analisado a estruturação genética da espécie *T. brasiliensis* (RUSSELL; MCCRACKEN, 2006). Esse estudo concluiu que existem diferenças significativas entre a subespécie sul-americana e a subespécie norte-americana, sendo que essas diferenças podem ser devidas a uma barreira ao fluxo de genes ou ao isolamento por distância (RUSSELL; MCCRACKEN, 2006).

1.3 Reprodução

Tadarida brasiliensis possui um ciclo reprodutivo sazonal e monoéstrico (KRUTZSCH; FLEMING; CRICHTON, 2002), no qual as fêmeas apresentam apenas um ciclo reprodutivo por ano (NEUWEILER, 2000; BRANCO et al., 2016). Entretanto, a atividade reprodutiva pode variar de acordo com o local de ocorrência (KRUTZSCH; FLEMING; CRICHTON, 2002).

Na América do Norte, o período reprodutivo das fêmeas dá-se entre a primavera e o verão, sendo que os últimos estágios da gravidez ocorrem em maio, o parto geralmente ocorre em junho, já a amamentação e o desmame ocorrem em julho (SCALES; WILKINS, 2007). Nos Estados Unidos, 80% das fêmeas já se encontram grávidas na primavera, e a gestação dura em média 80 dias (REICHARD et al., 2009). As colônias de maternidade ao sul do Texas e norte do México formam as maiores populações durante o verão (WIEDERHOLT et al., 2015).

Na América do Sul, sabe-se que o pico do período reprodutivo da espécie dá-se no final da primavera e início do verão (MARQUES; FABIAN, 1994). Em cada gestação é gerado apenas um filhote, e o parto geralmente ocorre no verão (MARQUES; FABIAN, 1994).

1.4 Padrões de migração

Tadarida brasiliensis, por ser exclusivamente insetívora, necessita da ocorrência e abundância de insetos em seu local de forrageio, assim, em áreas temperadas, onde o inverno é rigoroso, podem realizar movimentos sazonais (STAWSKI; GEISER, 2010). Esses movimentos podem ser considerados dispersão ou movimentos migratórios de longa distância, causando efeitos na estrutura das populações (POPALISSEANU; VOIGT, 2009). Os estudos de marcadores moleculares com populações

de morcegos têm observado que a estruturação genética de uma população tem padrões diferentes se a espécie apresentar comportamento migratório ou não (BURLAND; WILMER, 2001). Geralmente, as espécies migratórias apresentam uma baixa estruturação genética, enquanto que as espécies residentes possuem uma alta estruturação genética (BURLAND; WILMER, 2001).

Espécies migratórias podem exibir diferentes estruturas populacionais em diferentes épocas do ano e em diferentes locais (RUSSELL; MCCRACKEN, 2006). Da mesma forma que espécies migratórias podem apresentar diferentes razões sexuais na estrutura populacional, de uma forma espaço-temporal dependente (RUSSELL; MCCRACKEN, 2006). Assim, machos e fêmeas podem exibir padrões de migração distintos (RUSSELL; MCCRACKEN, 2006).

As populações da espécie na América do Norte são classificadas em residentes ou migratórias (WILKINS, 1989), as quais podem migrar até 1.800km por ano (VILLA; COCKRUM, 1962) realizando escalas em diferentes locais durante a migração (WIEDERHOLT et al., 2015). Além disso, a espécie tem a capacidade de voar até 50 km do seu abrigo em um único voo de forrageio (DAVIS; HERREID; SHORT, 1962). Sabe-se que na América do Norte, machos e fêmeas podem apresentar diferentes padrões de movimento ao longo do ano, sendo que as fêmeas migratórias movem-se a distâncias mais longas, enquanto que a maior parte dos machos realizam movimentos mais locais próximo ao seu abrigo (DAVIS; HERREID; SHORT, 1962; VILLA; COCKRUM, 1962).

Nos Estados Unidos, mais especificamente em New Orleans e na Louisiana, algumas populações da espécie são residentes, podendo permanecer no mesmo local durante todo o ano (PAGELS, 1972). Porém, na maioria das regiões da América do Norte, a espécie é considerada migratória (VILLA; COCKRUM, 1962). Populações ocorrentes no estado de Oklahoma realizam deslocamentos para o sul dos Estados Unidos no início da primavera (GANOW; CAIRE; MATLACK, 2015), formando colônias de maternidade durante o verão e outono em abrigos localizados no Texas (DAVIS; HERREID; SHORT, 1962; FEDERICO et al., 2008; VILLA; COCKRUM, 1962). No México, a espécie permanece a maior parte do ano no sul e no centro do país, sendo que durante a primavera, a população migra em direção ao norte do México e ao sul e sudeste dos Estados Unidos (WIEDERHOLT et al., 2015).

1.5 Estudos ecológicos

Estudos do comportamento da espécie *T. brasiliensis* na América do Norte demonstraram diferenças específicas de gênero sexual em hábitos de poleiro (HERMANSON; WILKINS, 1986). Nesse estudo, encontraram segregação com relação aos machos de uma população de *T. b. cynocephala*, que ocupava um sótão no estado da

Flórida (HERMANSON; WILKINS, 1986). Assim como, em outro estudo da espécie foi observado que a proporção de machos foi mais dominante do que fêmeas em um viaduto no estado do Texas (SGRO; WILKINS, 2003). Além disso, nesse mesmo estudo, após instalar transmissores eletromagnéticos nos indivíduos, pode-se perceber que os machos permaneceram em uma área mais extensa do que as fêmeas (SGRO; WILKINS, 2003). Esses resultados sugerem que os machos da espécie são mais fieis ao poleiro e ocupam uma área geográfica maior do que as fêmeas (SGRO; WILKINS, 2003). Outra pesquisa com *T. brasiliensis*, teve um resultado semelhante (SPENRATH; LAVAL, 1974). Esses autores identificaram uma recaptura maior de machos do que fêmeas em um poleiro localizado em Waco, no estado do Texas, nos Estados Unidos, inferindo também que machos são mais residentes do que as fêmeas (SPENRATH; LAVAL, 1974).

Estudos populacionais da espécie são escassos na América do Sul (MARQUES; FABIAN, 1994). Em um estudo ecológico realizado em Rosário, na Argentina, observou-se que a espécie forma colônias com milhares de indivíduos durante as estações do ano de primavera e verão, enquanto que no outono abandonam os abrigos (ROMANO; MAIDAGAN; F PIRE, 1999).

Em outro estudo, realizado no Uruguai percebeu-se que nas colônias da espécie analisadas, existem uma variação sazonal das proporções sexuais ao longo do ano (BOTTO NUÑEZ et al., 2018), como também foi observado em algumas populações da América do Norte (WILKINS, 1989; MCCRACKEN; GASSEL, 1997; SCALES; WILKINS, 2007; FEDERICO et al., 2008). No Uruguai, durante o outono e inverno, os machos são predominantes nas colônias, enquanto que na primavera e verão há uma troca da razão sexual, quando as fêmeas se tornam predominantes nestas mesmas colônias amostradas (BOTTO NUÑEZ et al., 2018). Esse comportamento da variação sexual nas colônias sugere que os machos permanecem nos abrigos ao longo do ano, sendo as fêmeas o grupo migrante da colônia nos meses mais frios (BOTTO NUÑEZ et al., 2018).

No Brasil, há pouco conhecimento sobre o comportamento da espécie, além de que não há estudos sobre a migração ou deslocamento da espécie (MARQUES, 1996). Em uma colônia localizada no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, foi verificado que no período de inverno todos os indivíduos da espécie dispersam, sugerindo que existe deslocamento sazonal (MARQUES; FABIAN, 1994). Já em outro estudo, realizado no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil, na mesma colônia do presente trabalho, os indivíduos de *T. brasiliensis* ocupam os abrigos durante todo o ano, observando uma maior razão sexual em favor das fêmeas durante a primavera e o verão e um maior número de machos durante os períodos de outono e inverno (FRANCO, 2011).

Considerando os dados de diferença da razão sexual encontrada nas popula-

ções de *T. brasiliensis* do sul do Brasil, buscamos compreender se existem diferenças genéticas significativas ao longo dos anos dos indivíduos presentes na colônia da espécie do sul do Brasil. Baseado nos dados já observados para as populações da espécie, a hipótese testada é que seriam encontradas diferenças sazonais na diversidade genética entre machos e fêmeas da colônia em estudo.

1.6 Objetivos

O objetivo geral desta dissertação é gerar informações de diversidade genética em uma colônia da espécie *Tadarida brasiliensis* do sul do Brasil através do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI).

1.6.1 Objetivos específicos

- a) Identificar a diversidade genética de *T. brasiliensis* em uma colônia do sul do Brasil;
- b) Investigar as diferenças nos níveis de diversidade genética entre machos e fêmeas;
- c) Analisar a diferença do padrão de diversidade genética durante o período reprodutivo e não reprodutivo;
- d) Avaliar a diferença do padrão de diversidade genética em relação às estações do ano;
- e) Verificar a estruturação genética da colônia de *T. brasiliensis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Os indivíduos de *Tadarida brasiliensis* foram capturados no prédio do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS) ($31^{\circ}48'4.04''\text{S}$ $52^{\circ}24'31.36''\text{W}$) situado no Campus Capão do Leão, da Universidade Federal de Pelotas, no município de Capão do Leão (RS), Brasil (Figura 3). O município apresenta um clima do tipo Clima Subtropical Úmido segundo KÖPPEN (1900), caracterizado por estações do ano bem definidas quanto à temperatura, e pluviosidade bem distribuída ao longo do ano (INMET, 2020).



Figura 3 – Mapa da área de estudo com a localização da colônia de *T. brasiliensis* no município do Capão do Leão/RS, Brasil.
Fonte: Google Earth, 2020.

2.2 Coleta dos indivíduos

Foram capturados 158 indivíduos adultos. Dos 158 indivíduos capturados, 53 indivíduos foram capturados nos anos de 2014 e 2015. Os 105 indivíduos restantes

foram capturados nos anos de 2018 e 2019.

Os indivíduos amostrados foram capturados utilizando armadilha de harpa (KUNZ; KURTA, 1998), com dimensões de 3m de altura por 1,50m de largura. Em seguida, os indivíduos foram colocados em sacos de panos e identificados quanto ao sexo, idade, estágio reprodutivo, além de serem realizadas medidas de comprimento do antebraço (mm) e massa corporal (g). Após a identificação, uma amostra do tecido do uropatágio foi coletada com a utilização de alicate perfurador e em seguida os indivíduos foram soltos próximos ao local do abrigo onde foram coletados. O tecido da membrana do uropatágio foi armazenado em microtubos de 1,5mL com etanol 90% à -20°C. As coletas foram autorizadas por meio da licença SISBIO n° 52646-1.

2.3 Manipulação do DNA

Para a extração de DNA das amostras, foi adicionado no microtubo: 250 μ L de tampão de lise (10mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, SDS 2%), e 1,5 μ L de proteinase K (Quiagen®). Essas amostras foram colocadas na estufa incubadora à 56°C por 17 horas (*overnight*). Após essa etapa, foi adicionado 100 μ L de acetato de potássio (5M) e deixado na bancada por 10 min. Posteriormente os microtubos foram centrifugados a 12.000 RPM por 20 min. Em seguida, o sobrenadante foi adicionado em um novo microtubo e adicionado 750 μ L de álcool absoluto gelado, invertendo o tubo para misturar os componentes. As amostras foram centrifugadas a 12.000 RPM por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1000 μ L de etanol 70% gelado ao microtubo. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 RPM. Por fim, o álcool foi evaporado na estufa e em seguida as amostras foram ressuspensas em 52 μ L de TE (10mM Tris, 1mM EDTA).

Os fragmentos de citocromo oxidase subunidade I (COI) foram obtidos, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), amplificando o fragmento da porção 5' do gene utilizando os primers degenerados VF1D: 5' TTC TCA ACC AAC CAC AAR GAY ATY GG 3' e VR1D: 5' TAG ACT TCT GGG TGG CCR AAR AAY CA 3' (IVANOVA; DEWAARD; HEBERT, 2006). Foram realizadas reações de PCR com volume final de 25 μ L e concentração dos reagentes de acordo com o protocolo da enzima GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega®). Foram utilizados entre 25 a 50 ng de DNA. O programa de amplificação utilizado seguiu: 95°C de denaturação inicial por 2 min seguido de 40 ciclos de: 95°C por 30 seg; 56°C de temperatura de anelamento por 30 seg; 72°C de temperatura de extensão por 1 min e 30 seg; sendo que a extensão final foi de 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5% solubilizado em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40mM e EDTA 1mM, pH 8,0) e corado com GelRed®. Também foi utilizado na eletroforese um mar-

cador de peso molecular Ladder 100pb (Ludwig®) para confirmação do tamanho dos fragmentos. Os geis de agarose foram visualizados em um transiluminador de luz UV e fotografados com câmera digital. Os produtos de PCR foram purificados utilizando PEG (PEG 8000 a 20% e NaCl 2,5M), de acordo com o protocolo descrito no Apêndice A. Posteriormente, as amostras foram quantificadas e enviadas para sequenciamento das fitas *forward* e *reverse* realizado pela empresa MacroGen (MacroGen Inc.).

2.4 Montagem e alinhamento das sequências consenso

Após o recebimento das sequências *forward* e *reverse* da empresa MacroGen, as sequências foram montadas e editadas por meio da inspeção dos cromatogramas com o uso dos pacotes Pregap e Gap4 no *software* STADEN v.4.11 (STADEN, 1996). O alinhamento das sequências foi realizado com o auxílio do algoritmo *ClustalW* implementado no programa MEGA v.6.0 (TAMURA et al., 2013), onde sequências obtidas previamente para indivíduos desta mesma localidade (LARROZA, 2019) foram adicionadas à matriz de alinhamento. Todas as sequências foram submetidas ao programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) para confirmação e comparação da região sequenciada com os dados disponíveis no *GenBank*.

2.5 Análises da diversidade genética

O programa DnaSP v.6.0 (LIBRADO; ROZAS, 2009) foi utilizado para calcular os parâmetros estatísticos descritivos de diversidade genética do gene COI de *T. brasiliensis*. Nessas análises foram calculados: número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π) e número de sítios polimórficos (S) dentro do conjunto de haplótipos. Os valores de Hd e π variam de 0 a 1, onde quanto mais próximo de 1 maior é a diversidade entre as sequências analisadas. Para os parâmetros descritivos de diversidade genética foram realizados testes de qui-quadrado (PEARSON, 1900), no programa SPSS (Statistical Package for Social Science) v. 22.0 (IBM Corp. Released, 2013).

A fim de verificar a estrutura de diversidade genética nesta colônia, foi construída uma rede de haplótipos, utilizando o algoritmo *Median-Joining* no programa PopART v.1.7 (LEIGH; BRYANT, 2015). O algoritmo *Median-Joining* é baseado no critério de redes com mínima abrangência (*minimum spanning network*) e usa *median vectors* (mv) para conectar dados de haplótipos, por meio do método de máxima parcimônia (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999). Os *median vectors* se remetem às sequências consenso que podem ser interpretadas como possíveis sequências existentes e não amostradas ou como sequências de um ancestral já extinto (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999). Os *median vectors* são necessários para conectar dois haplótipos na rede através do método de máxima parcimônia (BANDELT; FORSTER;

RÖHL, 1999). A formação dos haplogrupos na rede de haplótipos foi relacionada com as diferenças na proporção sexual, período reprodutivo (verão/primavera) e não reprodutivo (outono/inverno), e com relação às estações do ano. Nesses haplogrupos foram realizados testes de qui-quadrado (PEARSON, 1900), no programa SPSS v. 22.0 (IBM Corp. Released, 2013).

Por fim, foram realizados testes de evolução neutra das sequências por meio dos testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu utilizando o programa DnaSP v.6.0 (LIBRADO; ROZAS, 2009). O teste D de Tajima é baseado nas diferenças entre o número de sítios polimórficos e o número de diferenças nucleotídicas. Valores negativos e significativos para o teste D de Tajima indicam seleção purificadora, expansão populacional ou efeito carona de evolução. Quando os valores do teste D de Tajima são positivos, apontam para uma seleção estabilizadora ou contração populacional (TAJIMA, 1989). Já o teste Fs de Fu é fundamentado na distribuição de frequência dos haplótipos em função de θ ($\theta = 4N\mu$, em que o N representa o tamanho efetivo da população, enquanto que μ corresponde à taxa de mutação por sequência por geração). Valores negativos e significativos para Fs apontam para uma expansão populacional (FU, 1997).

3 RESULTADOS

3.1 Sequências obtidas e teste de diversidade genética do marcador COI

Foram obtidas 158 sequências com fragmentos de aproximadamente 690 pares de bases do gene COI. A Tabela 1 apresenta os parâmetros descritivos de diversidade genética do gene COI de *T. brasiliensis*. Nas sequências de DNA da população analisada foram detectados no total 96 sítios polimórficos e 103 haplótipos. A diversidade haplotípica (Hd) foi de 0,997 e o número médio de diversidade nucleotídica (π) foi de 0,019.

Tabela 1 – Parâmetros descritivos de diversidade genética do gene COI de *T. brasiliensis* no município do Capão do Leão, RS, Brasil.

N: número de sequências; H: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica; π : diversidade nucleotídica; S: número de sítios polimórficos.

	N	H	Hd	π	S
Sexos					
Machos	80	55	0,973	0,0184	72
Fêmeas	78	58	0,982	0,02079	74
Período					
Não reprodutivo	79	56	0,976	0,02153	65
Reprodutivo	79	56	0,979	0,01737	82
Sazonal					
Primavera	39	29	0,977	0,01148	55
Verão	40	31	0,974	0,0223	73
Outono	51	37	0,968	0,02284	52
Inverno	28	25	0,989	0,01812	61
Total	158	103	0,9775	0,01953	96

Os indivíduos que apresentaram o maior número de haplótipos (H) foram as fêmeas (H=58), da mesma forma, que apresentaram os maiores valores de diversidade haplotípica (Hd=0,982); diversidade nucleotídica (π =0,020) e maior número de sítios polimórficos (S=74).

Os valores do qui-quadrado para os parâmetros descritivos de diversidade genética do gene COI com relação ao número de haplótipos (H) identificados entre

machos e fêmeas foram não significativos ($\chi^2=1,06$ gl=1 $p < 0,05$) aceitando-se a hipótese nula, na qual o número de haplótipos para os indivíduos machos amostrados nessa colônia é igual ao número de haplótipos para os indivíduos fêmeas amostrados. Já os valores de qui-quadrado com relação à diversidade haplotípica (H_d) também foram não significativos com relação a machos e fêmeas ($\chi^2=0$ gl=1 $p=0,99$). Com relação aos valores de qui-quadrado obtidos para os parâmetros de diversidade nucleotídica (π) de machos e fêmeas, os resultados foram não significativos ($\chi^2=0$ gl=1 $p=1,00$).

Com relação aos indivíduos coletados no período reprodutivo e não reprodutivo, o número de haplótipos (H) indentificados foi igual para os dois períodos analisados ($H=56$). A diversidade nucleotídica (H_d) foi maior no período reprodutivo ($H_d=0,979$), assim como os sítios polimórficos (S) gerados foram maiores no período reprodutivo ($S=82$). A diversidade nucleotídica (π) foi maior nos indivíduos coletados no período não reprodutivo ($\pi=0,021$).

Os testes de qui-quadrado para os indivíduos capturados no período reprodutivo e não reprodutivo, apresentaram valores não significativos com relação ao número de haplótipos gerados ($\chi^2=0,79$ gl=1 $p<0,05$). Assim, a hipótese nula para esse parâmetro foi aceita, indicando que o número de haplótipos para o período reprodutivo é igual ao período não reprodutivo. Já os valores de qui-quadrado com relação à diversidade haplotípica (H_d) foram não significativos com relação ao período reprodutivo e não reprodutivo ($\chi^2=0$ gl=1 $p=1,00$). Da mesma forma que, os resultados para os parâmetros de diversidade nucleotídica (π) para os indivíduos coletados no período reprodutivo e não reprodutivo, os resultados foram não significativos ($\chi^2=0$ gl=1 $p=1,00$).

Por fim, relacionando com o período sazonal, os indivíduos coletados no outono apresentaram o maior número de haplótipos ($H=37$). A diversidade haplotípica apresentou valores mais altos no inverno ($H_d=0,989$). Em relação à diversidade nucleotídica (π), o valor mais alto obtido foi no outono ($\pi=0,022$) e o valor mais alto de sítios polimórficos foi no verão ($S=73$).

Os valores dos testes de qui-quadrado das amostras coletadas no período sazonal, apresentaram valores significativos com relação ao número de haplótipos gerados ($\chi^2=39,66$ gl=3 $p<0,01$), rejeitando-se a hipótese nula, indicando dessa forma que o número de haplótipos é diferente com relação ao período sazonal da colônia em estudo. Já os valores de qui-quadrado da diversidade haplotípica (H_d) foram não significativos com relação ao período sazonal ($\chi^2=0$ gl=3 $p=1,00$), aceitando-se a hipótese nula, na qual a diversidade haplotípica é igual quando comparado com as estações do ano. Com relação aos valores de qui-quadrado obtidos para os parâmetros de diversidade nucleotídica (π), os resultados foram não significativos para o período sazonal ($\chi^2=0$ gl=3 $p=1,00$). Esses resultados validam a hipótese nula, na qual a diversidade nucleotídica é igual com relação às estações do ano dos indivíduos coletados.

A Figura 4 (A,B,C) representa a rede de haplótipos gerada utilizando as sequências obtidas. A figura aponta para uma estruturação da colônia em dois haplogrupos mitocondriais. O haplogrupo 2 agrupou o maior número de haplótipos ($H=68$), enquanto que o haplogrupo 1 agrupou um número menor de haplótipos ($H=21$). A tabela dos haplogrupos 1 e 2 identificados na rede de haplótipos pode ser visualizada no Apêndice B. Os 14 haplótipos restantes representados na rede haplotípica, são indivíduos com haplótipos intermediários e que foram excluídos das análises dos cálculos de qui-quadrado.

A Figura 4A distingue os haplótipos quanto à identificação sexual dos indivíduos amostrados. Foram coletados nove machos (40,9%), sendo agrupados no haplogrupo 1 e 64 machos (52,5%) que foram agrupados no haplogrupo 2. Com relação às fêmeas, 13 (59,1%) foram agrupadas no haplogrupo 1 e 58 fêmeas (47,5%) no haplogrupo 2. No haplogrupo 1, duas fêmeas compartilharam o mesmo haplótipo. Já no haplogrupo 2, sete haplotipos foram compartilhados entre machos, seis entre fêmeas, e nove entre machos e fêmeas (Apêndice B).

Os valores de qui-quadrado entre machos e fêmeas para os haplogrupos 1 apresentaram valores não significativos ($\chi^2 = 0,84$ gl=1 $p=0,35$), enquanto que no haplogrupo 2, machos e fêmeas também apresentaram valores não significativos ($\chi^2 = 0,15$ gl=1 $p=0,69$). Dessa forma, os resultados apresentados em ambos os haplogrupos foram não significativos, aceitando-se a hipótese nula, na qual machos e fêmeas estão igualmente distribuídos nos dois haplogrupos.

A Figura 4B distingue os haplótipos quanto aos períodos reprodutivos e não reprodutivos. Foram coletados, sete (31,8%) indivíduos no período reprodutivo que foram agrupados no haplogrupo 1 e 65 (53,3%) dos indivíduos coletados no período reprodutivo que foram agrupados no haplogrupo 2. Já em relação ao período não reprodutivo, 15 (68,2%) dos indivíduos foram agregados no haplogrupo 1, enquanto que 57 (46,7%) dos indivíduos coletados nesse período foram agrupados no haplogrupo 2. No haplogrupo 1, o único haplótipo compartilhado pertence a dois indivíduos do período não reprodutivo. Com relação ao haplogrupo 2, oito haplótipos foram compartilhados entre indivíduos coletados no período reprodutivo, seis no período não reprodutivo e nove compartilhados entre indivíduos coletados nos dois períodos.

Os valores de qui-quadrado com relação ao período reprodutivo e não reprodutivo para o haplogrupo 1, apresentaram valores não significativos ($\chi^2 = 2,90$ gl=1 $p=0,08$), já com relação ao haplogrupo 2, os valores também foram não significativos ($\chi^2 = 0,52$ gl=1 $p=0,46$). Os valores de qui-quadrado para o haplogrupo 1 e 2 foram não significativos, aceitando-se a hipótese nula, na qual os indivíduos estão igualmente distribuídos com relação ao período reprodutivo e não reprodutivo, tanto no haplogrupo 1, quanto no haplogrupo 2.

A Figura 4C distingue os haplótipos quanto ao período sazonal, no qual foram

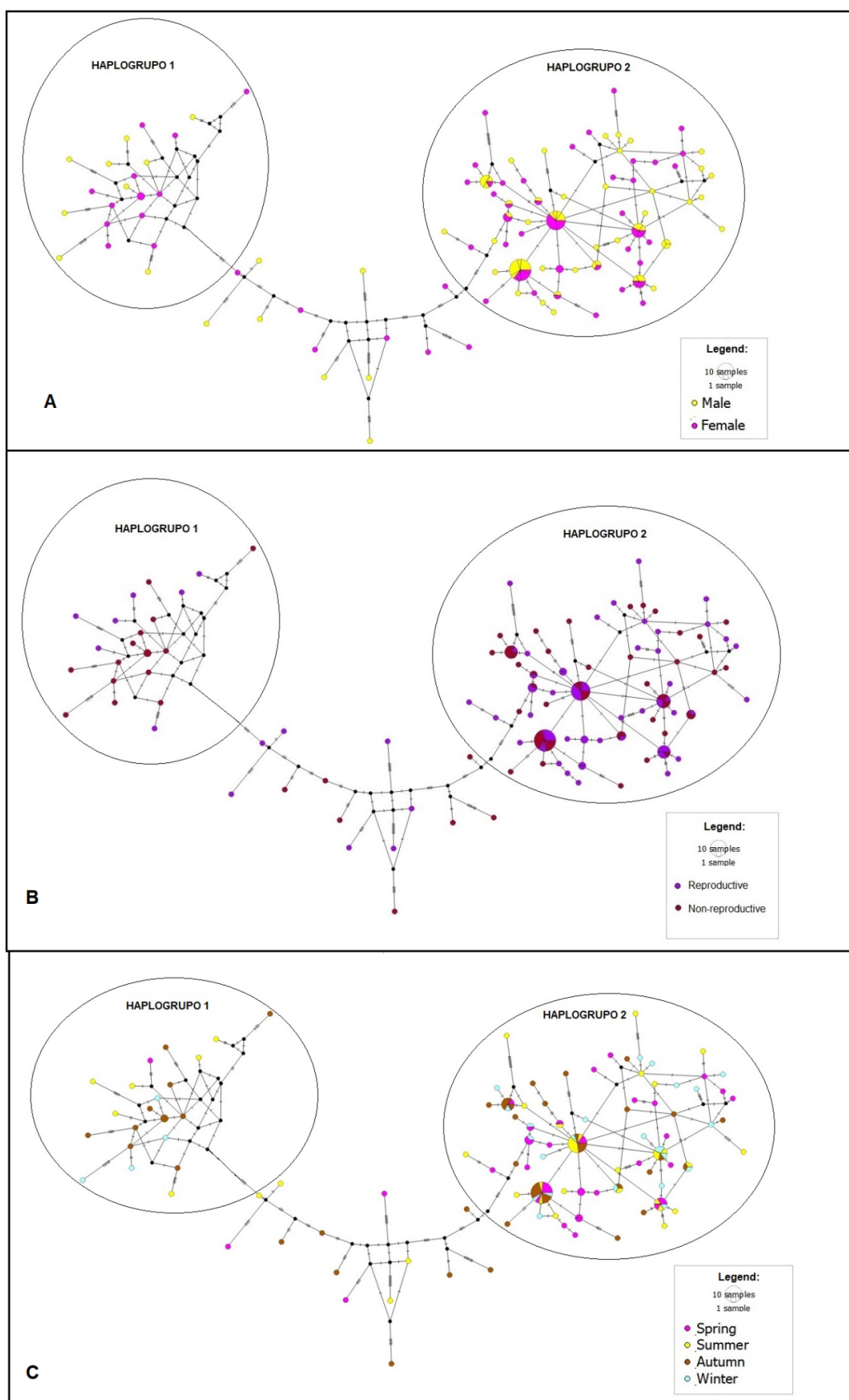


Figura 4 – Rede de haplótipos do marcador mitocondrial COI da colônia de *Tadarida brasiliensis* com relação à proporção sexual, períodos reprodutivos/ não reprodutivos e período sazonal, no município do Capão do Leão, RS, Brasil. O tamanho dos círculos dos haplótipos são proporcionais ao número de indivíduos observados em cada haplótipo. Cada traço nas linhas que conectam os haplótipos representa um passo mutacional entre os haplótipos.

coletados um indivíduo na primavera, destes 4,5% ficaram agrupados no haplogrupo 1 e 35 indivíduos (28,7%), no haplogrupo 2. No verão, seis indivíduos (27,3%) foram agrupados no haplogrupo 1 e 30 indivíduos (24,6%) no haplogrupo 2. No outono, 11 indivíduos (50%) foram agrupados no haplogrupo 1, enquanto que 33 (27%) foram agrupados no haplogrupo 2. Por fim, no inverno, quatro indivíduos (18,2%) foram agrupados no haplogrupo 1 e 24 indivíduos (19,7%) no haplogrupo 2. No haplogrupo 1, o único haplótipo compartilhado pertence a dois indivíduos coletados no outono. Com relação ao haplogrupo 2, seis haplótipos foram compartilhados entre indivíduos coletados na primavera, quatro no verão, três no outono e apenas dois indivíduos coletados no inverno.

Por fim, os valores do qui-quadrado para o período sazonal no haplogrupo 1 foram não significativos ($\chi^2=6,46$ gl=3 $p=0,09$), enquanto que no haplogrupo 2 também foram não significativos ($\chi^2=1,16$ gl=3 $p=0,76$). Portanto, para os dois haplogrupos os resultados foram não significativos, indicando que os indivíduos estão igualmente distribuídos com relação ao período sazonal.

A Tabela 2 apresenta os valores obtidos para os testes D de Tajima e Fs de Fu para os indivíduos machos e fêmeas de *T. brasiliensis*. Ambos apresentaram valores negativos e não significativos para os testes de D de Tajima. Com relação ao Fs de Fu, machos e fêmeas apresentaram valores negativos e significativos.

Tabela 2 – Teste de neutralidade do marcador COI de machos e fêmeas de *Tadarida brasiliensis* coletados no Capão do Leão, RS, Brasil.

****Valores dos testes com significância estatística, $p<0.05$ *valores não significativos, $p>0.05$.**

Sexos	D de Tajima	Fs de Fu
Machos	-0.421*	-24.292**
Fêmeas	-0.150*	-24.216**
Total	-0.657*	-24.016**

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para o gene COI da colônia de *T. brasiliensis*, indicaram um alto número de haplótipos, alta diversidade haplotípica, baixa diversidade nucleotídica e baixo número de sítios polimórficos dos indivíduos analisados. Dessa forma, os resultados gerados para o gene COI, com relação aos machos e fêmeas, período reprodutivo/não reprodutivo e período sazonal sugeriram que apesar da colônia do Capão do Leão possuir uma alta diversidade haplotípica, esta diversidade é correlacionada com a existência de poucas mutações (baixo número de sítios polimórficos). Altos níveis de diversidade haplotípica ($H_d > 0,5$) e altos índices de diversidade nucleotídica ($\pi > 0,5$) podem indicar grandes tamanhos populacionais sustentados ou diminuição populacional, enquanto que altos níveis de diversidade haplotípica ($H_d > 0,5$) e valores baixos de diversidade nucleotídica ($\pi < 0,5$), inferem uma seleção purificadora, efeito carona ou possível crescimento recente da população (KORSTIAN; HALE; WILLIAMS, 2015; GRANT; BOWEN, 1998).

Dessa forma, pode-se inferir que a colônia de *T. brasiliensis* do Capão do Leão possa estar sofrendo uma seleção purificadora, efeito carona ou crescimento recente, tanto para indivíduos machos, quanto para fêmeas, já que os índices de diversidade haplotípica (H_d) foram altos e os índices de diversidade nucleotídica (π) foram baixos. Os valores do qui-quadrado para os parâmetros descritivos de diversidade genética do gene COI apresentaram valores não significativos para a maioria dos testes realizados, que podem ter sido influenciados por vários fatores, como a natureza do marcador molecular COI, que é considerado um dos genes codificadores de proteínas mais conservados no genoma mitocondrial (BROWN, 1985), podendo influenciar nos resultados não significativos para os parâmetros analisados. Outros fatores, como amostragem populacional, hábitos de vida da espécie, podem ter influenciando nesses resultados (ZOLET et al., 2017).

A rede de haplótipos gerada apontou para uma estruturação da população em dois haplogrupos mitocondriais. Os testes de qui-quadrado realizados nos dois haplogrupos indicaram que não há diferenças significativas entre os haplogrupos, dessa forma, concluindo que machos e fêmeas estão igualmente distribuídos nos haplogru-

pos, assim como quando comparados com os indivíduos coletados durante período reprodutivo e não reprodutivo, bem como em relação ao período sazonal. Dessa maneira, analisando todos os dados em conjuntos com relação aos valores obtidos para os testes descritivos estatísticos de diversidade genética e os resultados estatísticos da rede haplotípica, observou-se que não houve diferença significativa da colônia estudada.

Os resultados do teste D de Tajima apresentaram valores negativos e não significativos para machos e fêmeas. Já o F_s de F_u apresentou valores significativos e negativos para machos e fêmeas. Esses resultados negativos nos testes de D de Tajima e F_s de F_u encontrados indicam que a colônia em estudo está sofrendo uma seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional recente.

Os altos índices de diversidade haplotípica não são comuns em quirópteros, sendo que geralmente tendem a apresentar resultados mais baixos de diversidade haplotípica, como por exemplo, cita-se um estudo da espécie *Lonchorhina aurita*, utilizando marcadores moleculares de COI e ISSR (ANDRADE, 2014), além de estudos com Cyt-B com a espécie *Desmodus rotundus* (MARTINS et al., 2007) e *Lonchorhina aurita* (SILVA; ALBERT, 2009). Nesses estudos, as espécies apresentaram baixos índices de diversidade haplotípica.

Os dados de diversidade genética do marcador COI do presente estudo, corroboram com os resultados de diversidade genética obtidos no estudo de Larroza (2019), no qual foram analisadas 37 sequências do marcador COI de seis populações de *T. brasiliensis*, localizados na América do Norte (El progreso, Texas, Georgia, Florida, Carolina e Arizona). Essas sequências foram obtidas através do banco de dados do GenBank e no Barcode of Life Data System (BOLD). Nesse estudo, para as seis populações da América do Norte analisadas, o número de sequências (N) obtidas variou de três a oito (LARROZA, 2019). Já o número de haplótipos (H) variou de dois a sete. O índice de diversidade haplotípica (H_d) para as populações da América do Norte variou de 0,25 a 1 (LARROZA, 2019). Os valores de diversidade nucleotídica (π) variaram de 0,004 a 0,007 (LARROZA, 2019). Por fim, o número de sítios polimórficos (S) variaram de um a 11 (LARROZA, 2019).

No estudo de Larroza (2019), por meio do uso dos marcadores moleculares COI e D-loop concatenados para a mesma colônia da espécie do Capão do Leão, RS, Brasil, os resultados de diversidade genética foram semelhantes com o presente estudo. Os índices de diversidade genética apresentaram valores de alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica (LARROZA, 2019). Assim como, a rede de haplótipos gerada também foi semelhante com os resultados do presente estudo, apontando para a estruturação de dois haplogrupos com os marcadores COI e D-loop concatenados (LARROZA, 2019).

Estudos realizados na América do Norte, também obtiveram resultados de di-

versidade genética semelhante com o presente estudo. Em um estudo realizado nos Estados Unidos com a espécie *T. brasiliensis*, teve como objetivo examinar a estruturação genética de grandes populações da espécie, através da utilização do marcador D-loop e aloenzimas (RUSSELL; MEDELLÍN; MCCRACKEN, 2005). Esse estudo demonstrou níveis de diversidade muito altos para a espécie estudada (RUSSELL; MEDELLÍN; MCCRACKEN, 2005). De um total de 94 indivíduos, foram identificados 86 haplótipos (RUSSELL; MEDELLÍN; MCCRACKEN, 2005). A diversidade haplotípica foi de $H_d=0,998$ e a diversidade nucleotídica $\pi=0,045$ (RUSSELL; MEDELLÍN; MCCRACKEN, 2005).

Korstian et al (2015) também corroboraram com os resultados obtidos para os parâmetros de diversidade genética do presente estudo. No estudo de Korstian et al (2015) foram realizados estudos genéticos com o marcador COI das espécies *Lasiurus borealis* e *Lasiurus cinereus*, que são espécies de quirópteros migratórios (KORSTIAN; HALE; WILLIAMS, 2015). Com relação à espécie *Lasiurus borealis*, foram identificados 177 haplótipos dos 409 analisados (KORSTIAN; HALE; WILLIAMS, 2015). A diversidade haplotípica (H_d) da espécie foi considerada alta ($H_d = 0,9$) e a diversidade nucleotídica foi baixa ($\pi = 0,009$) (KORSTIAN; HALE; WILLIAMS, 2015). Nesse mesmo estudo, para a espécie *Lasiurus cinereus* foram identificados 32 haplótipos para o gene COI dos 217 indivíduos analisados (KORSTIAN; HALE; WILLIAMS, 2015). Nessa espécie, a diversidade haplotípica também foi considerada alta ($H_d = 0,78$) e a diversidade nucleotídica baixa ($\pi = 0,004$). Como conclusão do estudo de Korstian et al (2015), as espécies apresentaram altos níveis de diversidade genética, enquanto que a diversidade nucleotídica foi baixa para ambas as espécies (KORSTIAN; HALE; WILLIAMS, 2015), resultados semelhantes com o presente trabalho.

Em suma, devido aos resultados obtidos nos estudos citados anteriormente, sugere-se que na América do Sul, machos e fêmeas apresentaram diferentes comportamentos de deslocamentos, apresentando uma flutuação sexual e sazonal em favor das fêmeas. Esses padrões de deslocamentos da espécie também são observados em populações desta espécie na América do Norte (WILKINS, 1989; SCALES; WILKINS, 2007).

De uma forma geral, analisando a combinação de todos os resultados obtidos neste trabalho, a colônia o de *T. brasiliensis* do Capão do Leão apresentou altos níveis de diversidade haplotípica ($H_d=0,977$) e baixos níveis de diversidade nucleotídica ($\pi=0,019$) com relação ao marcador utilizado. Esses resultados, bem como os valores encontrados para o teste D de Tajima e F_s de Fu, indicam que possivelmente essa colônia está sofrendo um processo de seleção purificadora, expansão populacional recente ou efeito carona de evolução. Esses resultados encontrados no presente estudo são semelhantes com os padrões das populações da América do Norte, com o mesmo marcador utilizado.

Estudos genéticos da espécie são escassos na América do Sul, sendo necessários mais estudos em outras áreas amostradas, da mesma forma que é imprescindível à utilização de outros marcadores moleculares para poder afirmar com mais clareza como se comporta a ecologia, estrutura genética e padrões de deslocamento da espécie no continente sul americano. Da mesma forma que, devido à espécie apresentar uma alta importância ecológica e impacto econômico é importante o monitoramento de longo prazo da espécie na área de estudo, assim como devem ser realizados planos de manejo e de conservação adequados das populações de *Tadarida brasiliensis* no sul do Brasil.

5 CONCLUSÃO

- Machos e fêmeas apresentaram altos níveis de diversidade haplótípica e baixos níveis de diversidade nucleotídica com relação ao marcador COI;
- Não houve diferenças entre as diversidades genéticas de machos e fêmeas, períodos reprodutivo/não reprodutivo e estações do ano;
- A rede de haplótipos estruturou a colônia em dois haplogrupos principais;
- A colônia está em processo de seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional recente.

REFERÊNCIAS

- AGOSTA, S. J. Habitat use, diet and roost selection by the big brown bat (*Eptesicus fuscus*) in North America: a case for conserving an abundant species. **Mammal Review**, [S.l.], v.32, n.3, p.179–198, 2002.
- ALLEN, L.; RICHARDSON, C.; MCCracken, G.; KUNZ, T. Birth size and postnatal growth in cave-and bridge-roosting Brazilian free-tailed bats. **Journal of Zoology**, [S.l.], v.280, n.1, p.8–16, 2010.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [S.l.], v.215, n.3, p.403–410, 1990.
- ANDRADE, I. S. d. **Caracterização citogenética molecular e estudo da variabilidade genética por marcadores ISSR e COI na espécie *Lonchorhina aurita* (Chiroptera: Phyllostomidae)**. 2014. Dissertação de Mestrado — Universidade Federal de Pernambuco.
- ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. d. O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. **Apoidea Neotropica**. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, [S.l.], p.305–309, 2003.
- AVISE, J. C. et al. **Phylogeography: the history and formation of species**. [S.l.]: Harvard university press, 2000.
- BANDELT, H.-J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, [S.l.], v.16, n.1, p.37–48, 1999.
- BERNARD, E.; AGUIAR, L. M.; MACHADO, R. B. Discovering the Brazilian bat fauna: a task for two centuries? **Mammal Review**, [S.l.], v.41, n.1, p.23–39, 2011.
- BOTTO NUÑEZ, G. et al. Circannual sex distribution of the Brazilian free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae), suggests migration in colonies from Uruguay. **Mastozoología neotropical**, [S.l.], v.25, n.1, p.213–219, 2018.
- BRANCO, A. M. B. d. S. et al. **Comparação do comportamento na época reprodutiva das fêmeas de lince ibérico em cativeiro**. 2016. Dissertação de Mestrado — Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- BROWN, W. M. The mitochondrial genome of animals. In: Molecular Evolutionary Genetics. New York: **Ed. RJ MacIntyre**, 1985, p. 399-411.
- BURLAND, T. M.; WILMER, J. W. Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. **Biological Reviews**, [S.l.], v.76, n.3, p.389–409, 2001.

DAVIS, R. B.; HERREID, C. F.; SHORT, H. L. Mexican free-tailed bats in Texas. **Ecological Monographs**, [S.l.], v.32, n.4, p.311–346, 1962.

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

FABIÁN, E. M.; MARQUES, V. R. Aspectos do comportamento de *Tadarida brasiliensis brasiliensis* (L. Geoffroy, 1824) (Chiroptera; Molossidae) em ambiente urbano.

Biociências, v.4, n.1, p.65-86, 1996.

FEDERICO, P. et al. Brazilian free-tailed bats as insect pest regulators in transgenic and conventional cotton crops. **Ecological Applications**, [S.l.], v.18, n.4, p.826–837, 2008.

FRANCO, A. **Uso de abrigo e composição de colônia de *Tadarida brasiliensis* (L. Geoffroy, 1824) (Chiroptera: Molossidae) no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2011. 33p. Trabalho de Conclusão de Curso — Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FU, Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, [S.l.], v.147, n.2, p.915–925, 1997.

GANOW, K. B.; CAIRE, W.; MATLACK, R. S. Use of thermal imaging to estimate the population sizes of Brazilian free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis*, maternity roosts in Oklahoma. **The Southwestern Naturalist**, [S.l.], v.60, n.1, p.90–96, 2015.

GELUSO, K. Winter activity of bats over water and along flyways in New Mexico. **The Southwestern Naturalist**, [S.l.], v.52, n.4, p.482–492, 2007.

GRANT, W.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of heredity**, [S.l.], v.89, n.5, p.415–426, 1998.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações-4**. [S.l.]: Artmed Editora, 2010.

HERMANSON, J. W.; WILKINS, K. T. Pre-weaning mortality in a Florida maternity roost of *Myotis austroriparius* and *Tadarida brasiliensis*. **Journal of Mammalogy**, [S.l.], v.67, n.4, p.751–754, 1986.

INMET. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em: 01 jan. 2020.

IVANOVA, N. V.; DEWAARD, J. R.; HEBERT, P. D. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. **Molecular Ecology Notes**, [S.l.], v.6, n.4, p.998–1002, 2006.

JANSEN, R. P. Origin and persistence of the mitochondrial genome. **Human Reproduction**, [S.l.], v.15, p.1–10, 2000.

KERTH, G.; MAYER, F.; KÖNIG, B. Mitochondrial DNA (mtDNA) reveals that female Bechstein's bats live in closed societies. **Molecular Ecology**, [S.l.], v.9, n.6, p.793–800, 2000.

KOOPMAN, K. Order Chiroptera. 137–241. **Smithsonian Institution Press. Washington, DC**, [S.I.], 1993.

KOOPMAN, K. F. A synopsis of the families of bats, part VII. **Bat Research News**, [S.I.], v.25, p.25–27, 1984.

KÖPPEN, W. Versuch einer Klassifikation der Klimate, vorzugsweise nach ihren Beziehungen zur Pflanzenwelt. **Geographische Zeitschrift**, [S.I.], v.6, n.11. H, p.593–611, 1900.

KORSTIAN, J. M.; HALE, A. M.; WILLIAMS, D. A. Genetic diversity, historic population size, and population structure in two North American tree bats. **Journal of Mammalogy**, [S.I.], v.96, n.5, p.972–980, 2015.

KRUTZSCH, P. H. Observations on the Mexican free-tailed bat, *Tadarida mexicana*. **Journal of Mammalogy**, [S.I.], v.36, n.2, p.236–242, 1955.

KRUTZSCH, P. H.; FLEMING, T. H.; CRICHTON, E. G. Reproductive biology of male Mexican free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis mexicana*). **Journal of Mammalogy**, [S.I.], v.83, n.2, p.489–500, 2002.

KUNZ, T.; KURTA, A. **Capture methods and holding Devices (Chapter 1)**. [S.I.]: Ecological and Behavioural Methods for the Study of Bats, Washington , 1998.

LARROZA, A. **Diversidade genética de populações da América do Norte e do Sul de *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) baseado nos marcadores mitocondriais COI e D-loop**. 2019. Dissertação de Mestrado — Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LAVAL, R. K. Observations on the biology of *Tadarida brasiliensis cynocephala* in southeastern Louisiana. **American Midland Naturalist**, [S.I.], p.112–120, 1973.

LEE, Y.-F.; MCCracken, G. F. Timing and variation in the emergence and return of Mexican free-tailed bats, *Tadarida brasiliensis mexicana*. **ZOOLOGICAL STUDIES-TAIPEI**, [S.I.], v.40, n.4, p.309–316, 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Princípios de Bioquímica, 3 ed. São Paulo: **Editora Sarvier**, 2002, 975p.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, [S.I.], v.6, n.9, p.1110–1116, 2015.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, [S.I.], v.25, n.11, p.1451–1452, 2009.

LINCOLIN, T. Disponível em:

<<https://aventurasnahistoria.uol.com.br/noticias/almanaque/historia-durante-a-segunda-guerra-morcegos-brasileiros-eram-testados-como-bombas-incendiarias.phtml>> Acesso em: 10 jan. 2020.

LLOYD, R. E.; FOSTER, P. G.; GUILLE, M.; LITTLEWOOD, D. T. J. Next generation sequencing and comparative analyses of *Xenopus mitogenomes*. **BMC genomics**, [S.l.], v.13, n.1, p.496, 2012.

LÓPEZ-HOFFMAN, L. et al. Market forces and technological substitutes cause fluctuations in the value of bat pest-control services for cotton. **PLoS One**, [S.l.], v.9, n.2, 2014.

MARQUES, R. V.; FABIAN, M. E. Ciclo reprodutivo de *Tadarida brasiliensis* (l. Geoffroy, 1824)(Chiroptera, Molossidae) em Porto Alegre, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, [S.l.], v.77, p.45–56, 1994.

MARTINS, F.; DITCHFIELD, A.; MEYER, D.; MORGANTE, J. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, [S.l.], v.45, n.4, p.372–378, 2007.

MCCRACKEN, G. F. et al. Rapid range expansion of the Brazilian free-tailed bat in the southeastern United States, 2008–2016. **Journal of Mammalogy**, [S.l.], v.99, n.2, p.312–320, 2018.

MCCRACKEN, G. F.; GASSEL, M. F. Genetic structure in migratory and nonmigratory populations of Brazilian free-tailed bats. *Journal of Mammalogy*, [S.l.], v.78, n.2, p.348–357, 1997.

MORALES, A. et al. Environmental niche drives genetic and morphometric structure in a widespread bat. *Journal of Biogeography*, [S.l.], v.43, n.5, p.1057–1068, 2016.

MOUSSY, C. et al. Migration and dispersal patterns of bats and their influence on genetic structure. *Mammal Review*, [S.l.], v.43, n.3, p.183–195, 2013.

NATURESERVE: Animals and Ecosystems of Latin America [web application]. Disponível em: < <http://www.natureserve.org/infonatura> >. Acesso em: 14 out. 2020.

NEUWEILER, G. Reproduction and development. In: *The biology of bats*. New York: Oxford University Press, 2000 p. 236–261.

NOWAK, R. M.; WALKER, E. P. *Walker's Mammals of the World*. [S.l.]: JHU press, 1999. v.1.

PAGELS, J. F. The effects of short and prolonged cold exposure on arousal in the free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis cynocephala* (Le Conte). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, [S.l.], v.42, n.2, p.559–567, 1972.

PEARSON, K. X. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. The London, Edinburgh, and Dublin: **Philosophical Magazine and Journal of Science**, [S.l.], v.50, n.302, p.157–175, 1900.

- PETIT, E.; EXCOFFIER, L.; MAYER, F. No evidence of bottleneck in the postglacial recolonization of Europe by the noctule bat (*Nyctalus noctula*). *Evolution*, [S.l.], v.53, n.4, p.1247–1258, 1999.
- POPA-LISSEANU, A. G.; VOIGT, C. C. Bats on the move. **Journal of Mammalogy**, [S.l.], v.90, n.6, p.1283–1289, 2009.
- REGIDOR, H.; MOSA, S.; NÚÑEZ, A. Confinamiento de una colonia de *Tadarida brasiliensis*, una alternativa de manejo compatible con la conservación. **Chiroptera Neotropical**, [S.l.], v.9, n.1-2, p.157–162, 2014.
- REICHARD, J. D. et al. Evening emergence behavior and seasonal dynamics in large colonies of Brazilian free-tailed bats. **Journal of Mammalogy**, [S.l.], v.90, n.6, p.1478–1486, 2009.
- ROMANO, M. C.; MAIDAGAN, J. I.; F PIRE, E. Behavior and demography in an urban colony of *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) in Rosario, Argentina. **Revista de Biología Tropical**, [S.l.], v.47, n.4, p.1121–1127, 1999.
- RUSSELL A .L.; MCCRACKEN G. F. Population genetic structure of very large populations: the Brazilian free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis*. In: Functional and evolutionary ecology of bats. New York: **Zubaid A. McCracken G. F. Kunz T. H**, 2006. p. 227–247
- RUSSELL, A. L.; MEDELLÍN, R. A.; MCCRACKEN, G. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). **Molecular Ecology**, [S.l.], v.14, n.7, p.2207–2222, 2005.
- SANTOS, T. M. R. dos; BORDIGNON, M. O. Primeiro registro de *Tadarida brasiliensis* (L. Geoffroy, 1824) para o Pantanal Brasileiro. **Chiroptera Neotropical**, [S.l.], v.17, n.1, p.832–835, 2011.
- SCALES, J. A.; WILKINS, K. T. Seasonality and fidelity in roost use of the Mexican free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis*, in an urban setting. **Western North American Naturalist**, [S.l.], v.67, n.3, p.402–408, 2007.
- SCHWARTZ, C. Theory of hyperfine structure. **Physical Review**, [S.l.], v.97, n.2, p.380, 1955.
- SGRO, M. P.; WILKINS, K. T. Roosting behavior of the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) in a highway overpass. **Western North American Naturalist**, [S.l.], p.366–373, 2003.
- SHAMEL, H. H. Notes on the American bats of the genus *Tadarida*. **Proceedings of the United States National Museum**, [S.l.], 1931.
- SILVA, R.; ALBERT, D. Phylogeography of *Lonchorhina aurita* (Phyllostomidae) from coastal Brazilian Atlantic forest. **Chiroptera Neotropical**, [S.l.], p.450–455, 2009.

- SPENRATH, C. A.; LAVAL, R. K. **An ecological study of a resident population of *Tadarida brasiliensis* in eastern Texas**. [S.l.]: Museum, Texas Tech University, 1974.
- STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, [S.l.], v.5, n.3, p.233, 1996.
- STAWSKI, C.; GEISER, F. Seasonality of torpor patterns and physiological variables of a free-ranging subtropical bat. **Journal of Experimental Biology**, [S.l.], v.213, n.3, p.393–399, 2010.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, [S.l.], v.123, n.3, p.585–595, 1989.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, [S.l.], v.30, n.12, p.2725–2729, 2013.
- VILLA, B. R.; COCKRUM, E. L. Migration in the guano bat *Tadarida brasiliensis mexicana* (Saussure). **Journal of Mammalogy**, [S.l.], v.43, n.1, p.43–64, 1962.
- WIEDERHOLT, R. et al. Optimizing conservation strategies for Mexican free-tailed bats: a population viability and ecosystem services approach. **Biodiversity and Conservation**, [S.l.], v.24, n.1, p.63–82, 2015.
- WILKINS, K. T. *Tadarida brasiliensis*. **Mammalian species**, [S.l.], n.331, p.1–10, 1989.
- WILKINSON, G.; FLEMING, T. Migration and evolution of lesser long-nosed bats *Lep-tonycteris curasoeae*, inferred from mitochondrial DNA. **Molecular Ecology**, [S.l.], v.5, n.3, p.329–339, 1996.
- WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. [S.l.]: JHU Press, 2005. v.1.
- ZOLET, A. C. T., SEGATTO, A. L. A., TURCHETTO, C., SILVA, C. P., FREITAS, L. B. . Guia prático para estudos filogeográficos. Ribeirão Preto, SP: **SBG**, 2013. p. 1-105.
- ZOLET, A. C.T, TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.

Apêndices

APÊNDICE A – Purificação com PEG 8000

PURIFICAÇÃO DE PCR COM PEG 8000 PARA SEQUENCIAMENTO

1. Verifique a qualidade do produto de PCR em gel de agarose.
2. Transfira o produto de PCR para um tubo de microcentrífuga de 0,2 μ L.
3. Adicione 1 volume de solução de PEG (PEG 8000 20% NaCl 2,5M) ao PCR.
4. Incube a 37°C por 30 minutos.
5. Centrifugue a 13.000 RPM por 20 minutos. Coloque os tubos fechados com a alça da tampa voltada para a parte externa do rotor (assim você saberá onde sedimentará o pellet já que não será possível vê-lo).
6. Retire o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador SUAVEMENTE. Retire o máximo de PEG possível.
7. Adicione 125 μ L de etanol 80% gelado. Espere 1 minuto e centrifugue por 2 minutos a 13000 RPM.
8. Retire o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador SUAVEMENTE. Retire o máximo de álcool possível.
9. Adicione 125 μ L de etanol absoluto gelado suavemente pela parede do tubo no lado onde o pellet está aderido e retire imediatamente o sobrenadante SUAVEMENTE (sem encostar o tip no pellet). Retire o máximo de álcool possível.
10. Deixe evaporar o etanol residual utilizando o banho seco, estufa ou deixe sobre a bancada. Cuidado para não esturricar o pellet, pois se ele secar demais será difícil ressuspendê-lo. Se deixar na bancada, cubra com papel higiênico para que não entre sujeira no tubo.
11. Adicione entre 10 μ L de água de injeção nas amostras e passe por 30 segundos no vortex. Faça muito pumping após o vortex na parede do tubo onde está o pellet.
12. Coloque no banho 37°C por 1 hora.

13. Passe no vortex por 30 segundos. Faça mais um passo de pumping.
14. Quantifique o produto purificado em gel de agarose 1,5%, aplicar 2 μ L. Não esqueça de fazer mais pumping antes de aplicar a amostra no gel.

APÊNDICE B – Tabelas dos Haplogrupos 1 e 2

Tabelas 3 e 4 dos Haplogrupos 1 e 2, respectivamente, da colônia de *Tadarida brasiliensis* no município do Capão do Leão, RS, Brasil.

Tabela 3 – Tabela do Haplogrupo 1 da colônia de *Tadarida brasiliensis*.

Haplótipo	Haplogrupo 1	
	Sexo	
	Machos	Fêmeas
Haplótipo 37	1	0
Haplótipo 52	0	1
Haplótipo 62	1	0
Haplótipo 70	0	1
Haplótipo 72	1	0
Haplótipo 73	0	1
Haplótipo 74	1	0
Haplótipo 75	1	0
Haplótipo 79	0	2
Haplótipo 80	0	1
Haplótipo 81	0	1
Haplótipo 82	0	1
Haplótipo 83	0	1
Haplótipo 84	0	1
Haplótipo 87	1	0
Haplótipo 88	1	0
Haplótipo 92	1	0
Haplótipo 93	0	1
Haplótipo 95	0	1
Haplótipo 96	0	1
Haplótipo 101	1	0
Total	9	13

Tabela 4 – Tabela do Haplogrupo 2 da colônia de *Tadarida brasiliensis*.

Haplogrupo 2					
Haplótipos	Sexo		Haplótipos	Sexo	
	Machos	Fêmeas		Machos	Fêmeas
Haplótipo 2	5	8	Haplótipo 44	0	1
Haplótipo 3	0	1	Haplótipo 48	0	1
Haplótipo 4	1	0	Haplótipo 49	1	0
Haplótipo 6	2	1	Haplótipo 50	0	1
Haplótipo 7	1	0	Haplótipo 53	0	1
Haplótipo 8	1	0	Haplótipo 54	1	0
Haplótipo 9	5	1	Haplótipo 55	0	1
Haplótipo 10	0	1	Haplótipo 56	0	1
Haplótipo 11	1	1	Haplótipo 57	0	1
Haplótipo 12	3	4	Haplótipo 58	0	1
Haplótipo 13	0	1	Haplótipo 59	0	1
Haplótipo 14	1	0	Haplótipo 60	1	0
Haplótipo 15	0	1	Haplótipo 61	1	0
Haplótipo 16	11	6	Haplótipo 63	1	0
Haplótipo 17	3	3	Haplótipo 64	1	0
Haplótipo 18	1	1	Haplótipo 65	0	1
Haplótipo 19	1	2	Haplótipo 66	0	1
Haplótipo 21	1	0	Haplótipo 67	0	1
Haplótipo 22	1	1	Haplótipo 68	0	1
Haplótipo 23	0	1	Haplótipo 69	0	1
Haplótipo 24	1	0	Haplótipo 71	1	0
Haplótipo 26	1	0	Haplótipo 77	1	0
Haplótipo 27	1	0	Haplótipo 78	3	0
Haplótipo 28	0	1	Haplótipo 85	0	1
Haplótipo 29	0	1	Haplótipo 86	1	0
Haplótipo 30	0	2	Haplótipo 89	1	0
Haplótipo 31	0	1	Haplótipo 90	1	0
Haplótipo 33	0	1	Haplótipo 91	1	0
Haplótipo 35	1	0	Haplótipo 94	0	1
Haplótipo 36	1	0	Haplótipo 97	0	1
Haplótipo 38	1	0	Haplótipo 98	1	0
Haplótipo 39	1	0	Haplótipo 99	1	0
Haplótipo 40	1	0	Haplótipo 100	1	0
Haplótipo 42	0	1	Haplótipo 102	0	1
Total	46	40		18	18