

Curso de Biologia da Conservação
Professor: [Fabrício R. Santos](#), UFMG
Bibliografia: Fundamentos de Genética da Conservação [Frankham et al. 2008] e artigos científicos

<http://www.icb.ufmg.br/lbem/aulas/grad/biolcons>



Aula 1 – Introdução, diversidade genética e conservação
Capítulos 1 e 2

Introdução

Genética da conservação é a aplicação da genética para a preservação das espécies como entidades dinâmicas capazes de lidar com mudanças ambientais (Frankham, 2004).

Engloba: diagnóstico genético do *status* de conservação de uma espécie, análise de estruturação populacional e níveis de fluxo gênico, manejo genético de populações naturais, resolução de incertezas taxonômicas (sistemática), definição de unidades de manejo dentro de espécies e o uso de análises de genética molecular em estudos de cativeiro (aconselhamento reprodutivo), análises forenses e no entendimento da biologia das espécies...

A crise ambiental é séria

- Extinções crescem em ritmo alarmante;
- Destruição do ambiente por exploração predatória;
- Mudanças climáticas abruptas;
- Manutenção de níveis de consumo incompatíveis com a sustentabilidade da Natureza;
- Crescimento populacional e econômico estão intimamente relacionados, e em oposição à preservação do meio ambiente natural.

Extinção e necessidade de Conservação

Em média, uma espécie se extingue na Terra a cada 20 minutos – esta já é considerada a 6ª grande extinção em massa na Terra .

80% dos corais do Caribe se perderam nos últimos 50 anos.

A maior parte dos ambientes naturais habitáveis, terrestres ou costeiros do mundo já está destruída (95% da Mata Atlântica, por exemplo).

“Talvez esta seja a última geração de pessoas que trabalham em conservação para poder prevenir a extinção de números enormes de espécies e a destruição em grande escala dos ecossistemas” (Clarck 1993).

Animais extintos na natureza



Ararinha azul
extinta na natureza em 2001

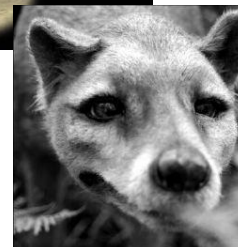
Golfinho chinês branco
extinto na natureza em 2007



Foca monge
extinta na natureza no início do século XX



Thylacinus



Exemplos:

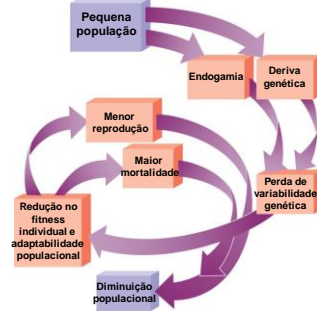
Wombats: aprox. 75 adultos na Austrália (ameaçado)



Silversword: 20 no Haváí (criticamente ameaçada)

O Vórtex de Extinção

Uma população pequena está sujeita a diferentes fatores que levam a população em direção a um vórtex de extinção.



Espécies ameaçadas de extinção

Mais de 50% das espécies de vertebrados;

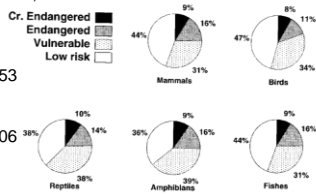
Aprox. 12,5% das espécies de plantas vasculares sendo, 32% das gimnospermas e 9% das angiospermas;

• Animais:

– Espécies extintas registradas – 753

• Plantas:

– Espécies extintas registradas – 106



A maior parte das extinções ocorre com espécies desconhecidas da ciência. Estima-se que conhecemos menos de 10% das espécies de toda biodiversidade.

O que é uma espécie ameaçada?

Categorias de ameaça da IUCN:

Criticamente ameaçada, Ameaçada e Vulnerável

Categoria	Probabilidade de extinção	Tempo
Criticamente ameaçada	50%	10 anos ou 3 gerações
Ameaçada	20%	20 anos ou 5 gerações
Vulnerável	10%	100 anos

Alguns exemplos (Red List IUCN 2007)

Criticamente ameaçadas



Plano de ação do Ibama

Ameaçadas



Vulneráveis



Causas das extinções:

Fatores associados à ocupação humana:

Crescimento populacional => destruição dos habitats

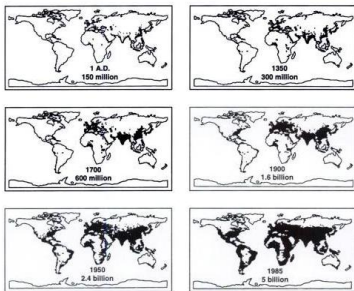
Caça ilegal, tráfico de animais silvestres

Pesca comercial => morte de animais não alvo (tartarugas, golfinhos, tubarões....)

Alimentação => ovos e carne de tartarugas, carne de baleia....

Poliuição

Causas das extinções



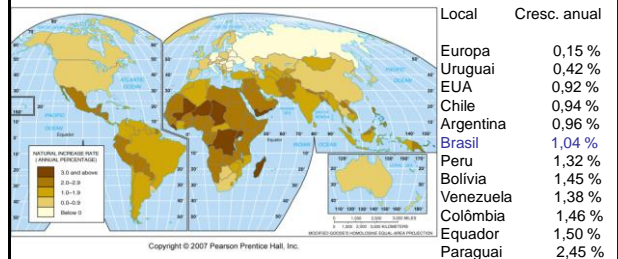
2000 => 6,1 bilhões de humanos na Terra (população já consumia 20% a mais do que é considerado sustentável no planeta)

Em 2059 => 8,9 bilhões

Fig. 13.3 Visual representation of human population growth in different parts of the world (from Tanton 1994).

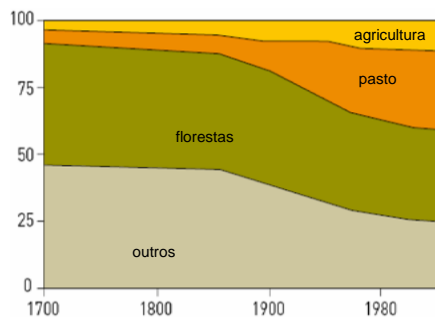
The total human population is projected to climax at 10-11 billion around 2070 and then begin to decline (Pearce 1999). Even the lower projection of a peak population size of 7.7 billion in 2040 represents a 28%

A população mundial cresce a uma taxa média de 1% ao ano



E países como China e Índia estão se tornando mais urbanos e vorazes consumidores

Mudanças no uso da terra desde o ano 1700



Fatores Estocásticos (naturais)

Ambientais (secas, El Niño, glaciações, etc)

Catástrofes (furacões, vulcões, tsunamis etc)

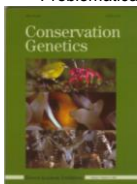
Demográficos (oscilações naturais no número populacional e razão macho/fêmea ao longo das gerações)

Genéticos (perda de diversidade genética e depressão endogâmica)

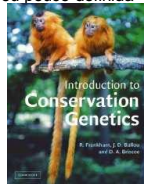
Um pequeno histórico da Genética aplicada à Conservação

A genética aplicada à Conservação teve alguns problemas no seu começo há menos de duas décadas:

- Marcadores pouco variáveis e de base molecular desconhecida
 - Bases teóricas limitadas à Genética de Populações
 - Capacidade computacional analítica limitada
- Arrogância dos geneticistas/incompreensão dos não-geneticistas
 - Problemática mal ou pouco definida



1ª revista



1º livro texto

Como a genética pode ajudar?

- 1 Detectar o efeito deletério da endogamia na reprodução e na sobrevivência (depressão endogâmica) ⇒ e propor estratégias para redução da endogamia;
- 2 Detectar a perda de diversidade genética e da habilidade de evoluir em resposta as mudanças ambientais ⇒ e indicar formas adequadas de aumentar esta diversidade ou evitar ainda mais a perda;
- 3 Identificar a fragmentação de populações e redução do fluxo gênico ⇒ e propor soluções mitigatórias se as causas são antropogênicas;
- 4 Monitorar a ação de processos aleatórios (deriva genética) que podem levar à perda de diversidade;
- 5 Quantificar o acúmulo de mutações deletérias em determinadas populações ou espécies;
- 6 Identificar as causas e conseqüências da hibridização;

- 7 Identificar a adaptação genética ao cativeiro e seus efeitos no sucesso da reintrodução ⇒ e auxiliar na conservação *ex-situ*;
- 8 Resolver algumas incertezas taxonômicas ⇒ e implementar estratégias de conservação mais adequadas;
- 9 Definir unidades prioritárias para conservação e unidades de manejo dentro de espécies ⇒ e auxiliar no processo de translocação de indivíduos;
- 10 Usar marcadores genéticos em estudos forenses para proteção de espécies ameaçadas;
- 11 Usar marcadores moleculares para entender os aspectos da biologia das espécies, que são importantes para a conservação;
- 12 Entender o efeitos deletérios no valor adaptativo que, às vezes, ocorrem como resultado da exogamia (depressão exogâmica) ⇒ e auxiliar no processo de translocação de indivíduos.

Populações pequenas sofrem com a endogamia e a perda de diversidade genética => eleva o risco de extinção

Consequentemente :

Um dos maiores objetivos do manejo genético é o de minimizar a endogamia e a perda de diversidade genética.

Como a genética pode ajudar?

Depressão Endogâmica => Redução da fecundidade e sobrevivência em populações endogâmicas.

Baixa diversidade => Compromete a capacidade de evoluir e lidar com mudanças ambientais. Reduz as chances de persistência a médio e longo prazos nas populações acometidas.



Ex.: Pantera da Florida, EUA

Baixa quantidade e qualidade de esperma.

Anormalidades morfológicas

Solução:

Indivíduos de outra população (Texas) foram introduzidos na Flórida, EUA.

Identificação de populações de interesse

Identificação de populações com baixa diversidade genética => dificuldades para persistência na natureza a médio e longo prazos.



Ex.: Leões asiáticos da Floresta de Gir

Baixa capacidade de evolução, altos riscos demográficos e ambientais

Solução sugerida:

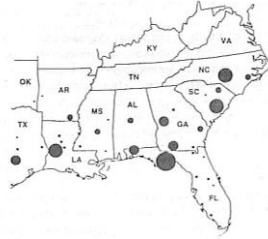
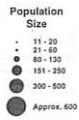
Manter as populações em diferentes regiões, melhorando o hábitat para o crescimento populacional.

Resolvendo a estrutura populacional

Populações fragmentadas e estruturadas



Pica-pau do Sudeste dos EUA



Solução sugerida:

Preservar as populações mantendo sua estruturação geográfica formada historicamente e recuperação de habitats.

Resolvendo incertezas taxonômicas

Status taxonômico desconhecido:

Uma espécie de tartaruga rara era confundida com uma tartaruga comum...



Lepidochelys kempii



Lepidochelys olivacea

Detectando e quantificando a hibridização



Lobo da Etiópia hibridiza com o cão doméstico

Definindo unidades de manejo dentro de espécies

Populações distintas geograficamente merecem manejo diferenciado



Ex.: Salmão Coho

Adaptação a diferentes condições:

morfologia,
habilidade para nadar,
estágio de maturação sexual, etc.

A definição de unidades de manejo separadas visa manter a diferenciação genética acumulada e evitar depressão exogâmica.

Amostragem não invasiva para análises genéticas

Muitas espécies são difíceis de capturar e/ou se estressam muito no momento da captura.

DNA pode ser coletado de:

- Fezes
- Pêlos
- Penas
- Restos de pele, etc

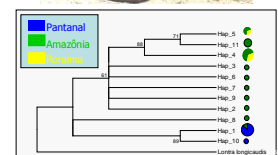
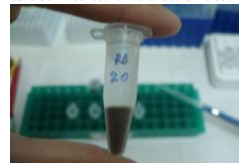


Wombat

De acordo com a CDB, novas legislações ambientais em vários países estão sendo elaboradas, levando em conta que abordagens não invasivas e menos estressantes de amostragem biológica possam ser priorizadas.

Uso de fezes de ariranhas

Amostra de muco fecal armazenado em álcool 70%



Estudos forenses

Consumo de carne de espécies de baleias ameaçadas no Japão e Coreia do Sul

9% eram de baleias protegidas por lei (Baker & Palumbi).



Balaenoptera acutorostrata

Ferramenta de identificação de Psitacédeos brasileiros

Assunção F., Miyaki C.Y., Santos F.R. (em publicação)

Entender a biologia das espécies

Paternidade em chimpanzés (monogamia, poligamia??)



Padrões de acasalamento (múltipla paternidade em espécies de tartarugas marinhas – ex.: *Caretta caretta*)

Diversidade genética

É necessária para as populações serem capazes de lidar com mudanças ambientais, e a perda da diversidade genética é, muitas vezes, associada com a redução do valor adaptativo reprodutivo.

É a matéria-prima para as mudanças adaptativas evolucionárias.

A manutenção da diversidade genética é o objetivo primário no manejo de espécies ameaçadas, de suas populações naturais e de cativeiro.

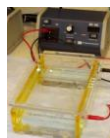
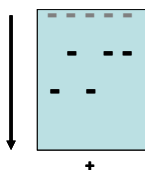
Esta diversidade pode ser medida a partir de diferentes **marcadores moleculares**.

Marcadores protéicos: Alozimas

5 dos 20 aminoácidos são carregados (+ ou -).

Cerca de 30% das mudanças de bases no DNA levam a mudanças nas cargas das proteínas.

O sistema de eletroforese em gel é usado para detectar mudanças na carga das proteínas



Alozimas

Vantagens:

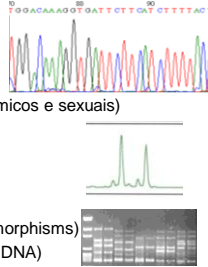
- Grande número de *loci* e alelos para muitas espécies.

Desvantagens:

- Necessita de amostras frescas e grandes quantidades de proteínas.
- Fenótipo molecular muitas vezes difícil de interpretar.
- Possivelmente influenciado por seleção natural.
- Fora de moda.

Marcadores Moleculares de DNA

- Muitos tipos diferentes:
 - Sequências de DNAm (mitocôndria)
 - Sequências de DNAc (cloroplasto)
 - Sequências de DNA nuclear (autossômicos e sexuais)
 - SNPs (polimorfismos de sítios únicos)
 - Indels (inserções e deleções)
 - Microsatélites
 - Minissatélites
 - AFLP (amplified fragment length polymorphisms)
 - RAPD (random amplified polymorphic DNA)
- A escolha do marcador depende da questão a ser respondida.



RAPD (Randomly Amplified Polymorphism DNA)

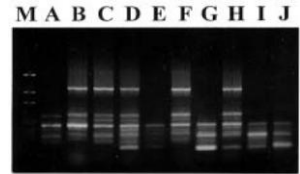
- 1) Comprar kit de primers – região aleatória
- 2) Otimizar PCR, escolher primers
- 3) Análise populacional (presença/ausência de bandas em géis de agarose)

Vantagens:

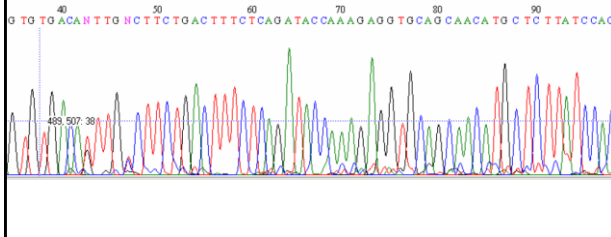
- Custo muito reduzido

Desvantagens:

- Dominância, fenótipo não mendeliano, difícil de reproduzir, interpretar e publicar estes dados atualmente.



Dados de seqüências



Seqüenciamento de DNA

Custo médio:

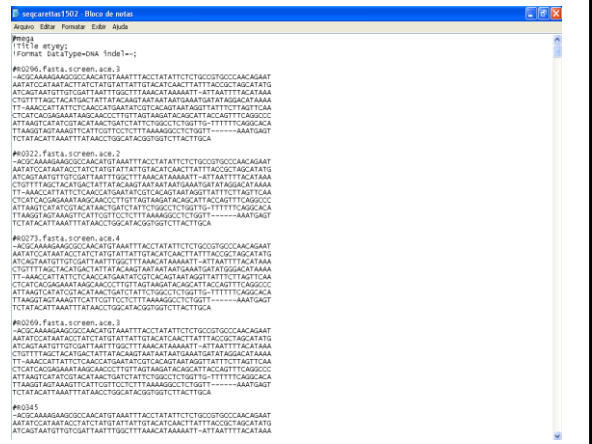
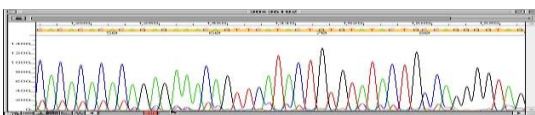
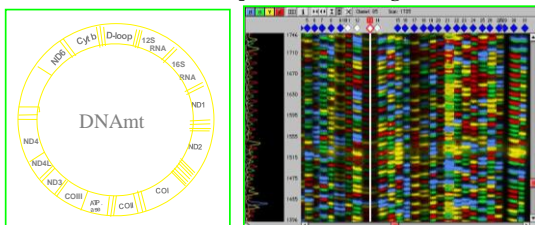
- PCR = R\$ 3 por indivíduo
- Purificação = R\$ 4 por indivíduo
- Seqüenciamento = R\$ 30 por seqüência de 800 bp
- Total = R\$ 37/seqüência (+R\$ 2 gel)

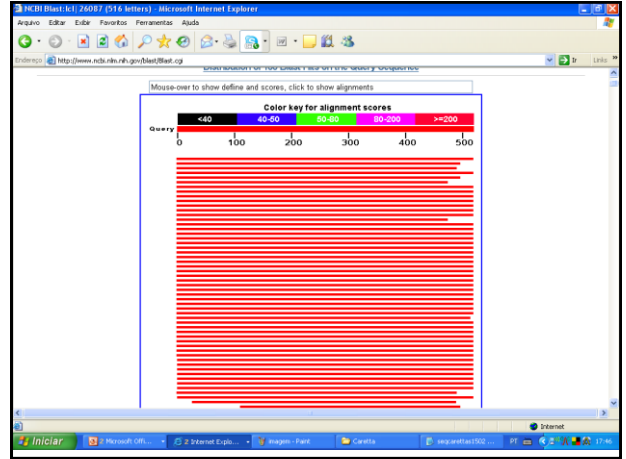
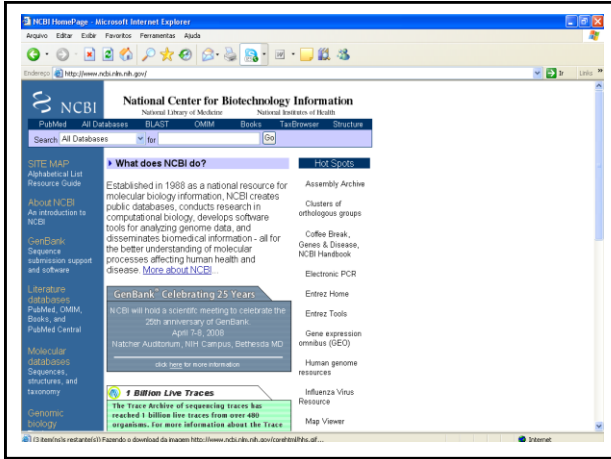


Alinhamento de um gene do DNA mitocondrial

DNA Mitocondrial

Dois rRNAs, 22 tRNAs, 13 proteínas, uma região controle





Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AB023323.1	Carreia carretta mitochondrial genes for 9SNA-Thy, 9SNA-Pro, D-loop, 1	920	920	100%	0.0	98%	
AB020209.1	Carreia carretta mitochondrial genes for 9SNA-Thy, 9SNA-Pro, complete	883	883	99%	0.0	98%	
U08035.1	Carreia carretta mitochondrial control region DNA	872	872	94%	0.0	98%	
EU173453.1	Carreia carretta haplotype C1A21.1 9SNA-Pro gene and D-loop, partial	870	870	100%	0.0	97%	
AB020209.1	Carreia carretta mitochondrial genes for 9SNA-Thy, 9SNA-Pro, complete	867	867	95%	0.0	98%	
EF031313.1	Carreia carretta haplotype CCPS intrachromosome b gene, partial cdi: 9SNA	867	867	91%	0.0	99%	
EU045364.1	Carreia carretta isolate CC-A4 UER3100 9SNA-Pro gene and control r	865	865	100%	0.0	96%	
EU173453.1	Carreia carretta haplotype C1A4.3 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	865	865	100%	0.0	96%	
EU173461.1	Carreia carretta haplotype C1A11.1 9SNA-Pro gene and D-loop, partial	865	865	100%	0.0	96%	
EU173437.1	Carreia carretta haplotype C1A1.2 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	865	865	100%	0.0	96%	
EU173459.1	Carreia carretta haplotype C1A1.3 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	865	865	100%	0.0	96%	
DQ477327.4	Eretmochelys imbricata x Carreia carretta haplotype BR4 D-loop, part	865	865	100%	0.0	96%	
EU033444.4	Carreia carretta haplotype CCPS intrachromosome b gene, partial cdi: 9SNA	861	861	91%	0.0	99%	
EU035973.1	Carreia carretta isolate CC-A24 UER3205 9SNA-Pro gene and control r	859	859	100%	0.0	96%	
EU035974.1	Carreia carretta isolate CC-A1 UER304 9SNA-Pro gene and control r	859	859	100%	0.0	96%	
EU173458.1	Carreia carretta haplotype C1A2.1 9SNA-Pro gene and D-loop, partial	859	859	100%	0.0	96%	
EU173454.1	Carreia carretta haplotype C1A27.1 9SNA-Pro gene and D-loop, partial	859	859	100%	0.0	96%	
EU173464.1	Carreia carretta haplotype C1A15.1 9SNA-Pro gene and D-loop, partial	859	859	100%	0.0	96%	
EU173432.1	Carreia carretta haplotype C1A4.1 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	859	859	100%	0.0	96%	
EU173433.1	Carreia carretta haplotype C1A1.1 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	859	859	100%	0.0	96%	
U08035.1	Carreia carretta (Gisolate EWFA) mitochondrial transfer RNA-Thy (tRNA ^{Thy})	854	854	100%	0.0	96%	
EU045364.1	Carreia carretta isolate CC-A17 UER300 9SNA-Pro gene and control r	854	854	100%	0.0	96%	
EU173463.1	Carreia carretta haplotype C1A4.4 9SNA-Pro gene and D-loop, partial	854	854	100%	0.0	96%	
EU173452.1	Carreia carretta haplotype C1A8.3 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	804	804	100%	0.0	94%	
EU173451.1	Carreia carretta haplotype C1A8.3 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	804	804	100%	0.0	94%	
EU173450.1	Carreia carretta haplotype C1A9.3 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	804	804	100%	0.0	94%	
EU173455.1	Carreia carretta haplotype C1A3.3 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	804	804	100%	0.0	94%	
EU173454.1	Carreia carretta haplotype C1A20.1 9SNA-Pro gene and D-loop, partial	804	804	100%	0.0	94%	
EU173460.1	Carreia carretta haplotype C1A8.2 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	799	799	100%	0.0	94%	
EU045364.1	Carreia carretta haplotype C1A2.3 9SNA-Pro gene and D-loop, partial 1	799	799	100%	0.0	94%	

Sequências de DNA

Vantagens

- Alto nível de informação e quantidade de dados.
- Disponibilidade de máquinas automatizadas.
- Capacidade analítica atual muito sofisticada (AMOVA, Genética de populações, Filogeografia)

Desvantagens

- Baixo número de loci analisados/projeto/artigo
- Alto custo e tempo para análise (mas está reduzindo)

SNPs

- **SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) Polimorfismos de sítios únicos.**

GTGGACGTGCTT[G/C]TCGATTACCTAG

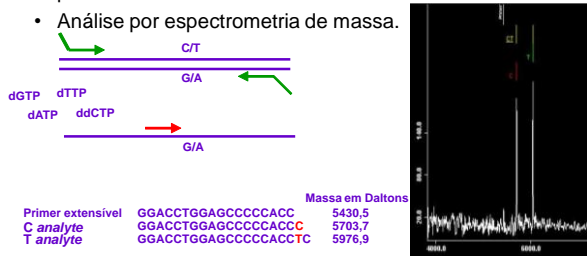
- O tipo mais simples e comum de polimorfismo.
- Abundantes, 1 a cada 1000 bases no genoma humano.

Genotipagem de SNPs

- PCR: RFLPs, TaqMan, ASA, Taq Ligation Assay
- Sequenciamento, minissequenciamento
- Chips de DNA
- Espectrometria de massa (MaldiToF etc)

Genotipagem de SNPs com MassARRAY (MALDI-TOF)

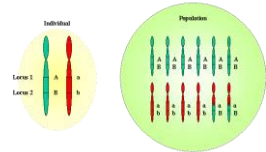
- Reação de extensão de primer projetada para gerar produtos de diferentes tamanhos.
- Análise por espectrometria de massa.



SNPs ligados podem ser utilizados para reconstruir haplótipos.

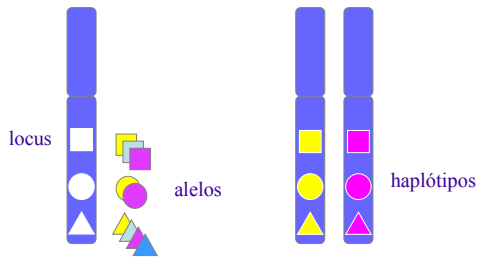
Desequilíbrio de ligação (LD)

- Alelos estão em LD, se são encontrados juntos além do esperado.
- Dois loci podem ser geralmente herdados juntos quando a recombinação raramente os separa.

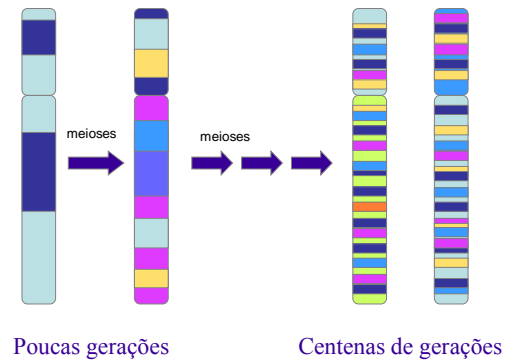


Haplótipo

- Múltiplos loci no mesmo cromossomo cujos alelos são herdados juntos;
- Geralmente é um conjunto de SNPs ligados

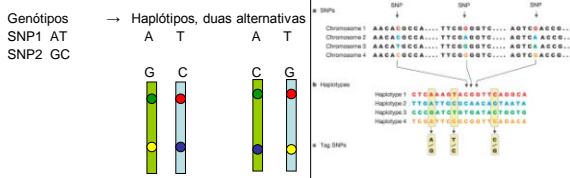


Formação de blocos haplóticos



Construção de haplótipos a partir de dados genotípicos (autossômicos)

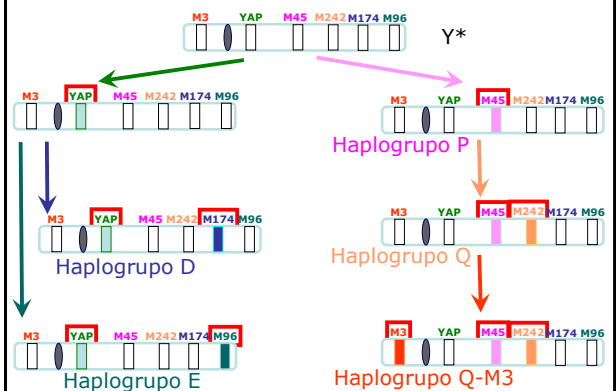
- Não há bons métodos moleculares para caracterização de haplótipos, exceto se toda a variação se encontra em um único produto sequenciado.



→ Métodos computacionais são usados para reconstruir haplótipos de dados de múltiplos genótipos:

Baseados em *pedigrees*: Simwalk, Merlin, Genehunter, Allegro...
Baseados em populações: Phase, EM, SNP-Hap

Geração de haplótipos do cromossomo Y



Microssatélites

Marker	Well ID	SampleID	Allele1	Allele2	Size1	Size2
D7S13	H01	OA.11616	26	28	190.93	195.02
D7S17	C07	DYS.5020	26	26	262.19	262.19
D7S640	B02	DYS.3819	26	29	133.41	139.41
D7S640	G12	OA.1528	26	29	133.59	139.46
D7S669	E05	OA.11615	26	29	190.37	196.61
D8S258	B06	DYS.5001	26	27	159.38	161.38
D8S260	C02	DYS.3931	26	26	215.57	215.57
D8S264	H01	OA.11616	26	26	158.86	158.86

Vantagens

- **Alto nível de polimorfismo** significa que é possível até mesmo discriminar indivíduos.
- **Fragmentos pequenos de DNA** que permitem amplificação por PCR a partir de pequenas quantidades de DNA genômico, facilitando, por exemplo, usar amostragens não-invasivas (ex. pêlos, fezes etc), ou espécimes de museu.
- **Vários loci** se distribuem por todo genoma, permitindo gerar diferentes dados de loci variáveis independentes. Isto aumenta o poder em determinar relacionamentos.

Desvantagens

- **Geralmente cada espécie têm seus próprios microssatélites** e faz-se necessário desenhar novos iniciadores (primers) usados na amplificação por PCR para cada espécie. (isto leva entre 1-6 meses de trabalho e custa ao redor de US\$10.000 por espécie).
- **Existe uma grande quantidade de homoplasias**, dificultando algumas análises.

Primers heterólogos para microssatélites

Primers isolados para uma espécie usado para analisar outra espécie correlacionada.

• Vantagens:

- Diminui significativamente custo da análise
- Acelera o estudo

• Desvantagens:

- Heterozigosidade reduzida (viés de averiguação)

Table 1. Microsatellite data from studies that used both primers designed for the study species and primers transferred from other species.

Species	Primers from study species			Primers from other species			Reference
	no. loci	H _e	no. alleles	no. loci	H _e	no. alleles	
<i>Calobanus rostratus</i>	6	0.758	7.00	3	0.515	4.25	Anderson et al. 1998
<i>Lasiobinus breffini</i>	12	0.418	2.67	8	0.486	2.50	Behereganay et al. 2000
<i>Lasiobinus latifrons</i>	11	0.716	6.27	16	0.691	4.94	Behereganay et al. 2000
<i>Phoca vitulina</i>	3	0.516	7.02	4	0.459	3.63	Goodman 1998
<i>Ctenomys baigi</i>	7	0.708	8.43	8	0.692	6.63	Lacey 2001
<i>Ursus arctos</i>	8	0.695	6.05	11	0.638	5.52	Watts et al. 2000
<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	4	0.551	4.12	4	0.449	3.33	Garner 2004

Heterozigosidade com primers heterólogos foi 10% menor do que com primers autólogos (P<0,05)

Que tipo de perguntas podemos responder?



Dispersão/estrutura



Origem de organismos / rotas de colonização



Hibridização/
introgressão



Parentesco/ sistemas de acasalamento



Níveis de diversidade



Impacto da mudança de habitat

Etapas de um trabalho em Genética da Conservação

1) Definir o problema

- a) Formular hipótese
- b) Definir conclusões alternativas dependentes dos resultados

2) Definir metodologia de análise;

3) Definir plano de amostragem geográfica e taxonômica;

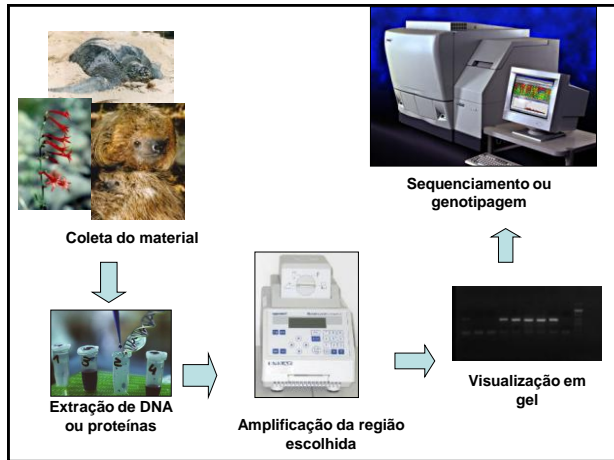
4) Coletar, armazenar adequadamente, transportar;

5) Extrair DNA ou proteína;

6) Usar marcador molecular adequado para as análises;

7) Analisar os dados;

8) Fazer recomendações a partir da análise.



Metodologia de análise Genética da Conservação

Extração do DNA ou proteínas das amostras

Equipamentos e Infra-estrutura:

Centrífugas
Reagentes
Tubos com marcações
Pipetas
Protocolo organizado.



Etapas de um trabalho de Genética da Conservação

A escolha do Marcador

A matéria prima dos trabalhos em Genética aplicada à Conservação são dados de **polimorfismos de DNA**

Para que um marcador molecular seja útil no estudo de genética de populações, ele deve:

- Ser ortólogo/homólogo entre indivíduos e táxons (garantindo que o mesmo locus será usado nas comparações).
- Ter diferenças (garantindo informação útil para análises).
- Ter nível de variação e taxa de mutação compatível com a profundidade histórica que queira investigar.

Etapas de um trabalho de Genética da Conservação

A escolha do Marcador

Equipamentos:

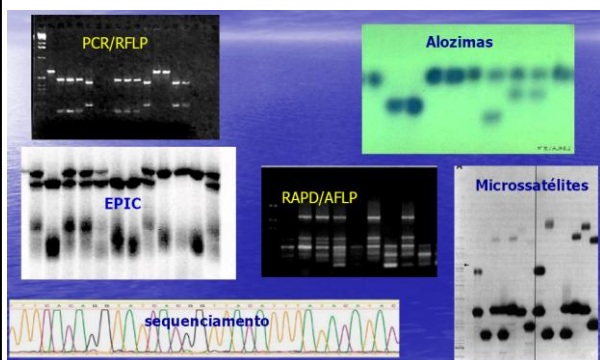
Termociclador (PCR)

Cubas para géis (agarose ou acrilamida)

Sequenciador automático (para sequenciamento e genotipagem)



Marcadores moleculares



Medindo a Diversidade Genética

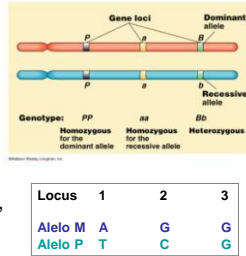
Populações naturais podem ter sua diversidade genética medida de diferentes formas a partir dos marcadores moleculares:

- Número de alelos ou haplótipos,
- Número de sítios ou *loci* polimórficos ou segregantes,
- Nível de polimorfismo,
 - Heterozigozidade,
- F_{st} ou equivalentes (G_{st} , R_{st} , ϕ_{st}),
- Variância,
- Diversidade haplotípica,
- Diversidade nucleotídica,
- Valores θ etc.

Termos importantes

Alelos

- Formas alternativas de um gene ou sequência qualquer do DNA em uma posição cromossômica específica (*locus*)
- Em cada *locus* diplóide um indivíduo possui dois alelos (de cada parental), e isto constitui um genótipo.
- À combinação de alelos ligados em uma região sem recombinação, chamamos haplótipo.



Os níveis hierárquicos da variação

- Indivíduo: quantos alelos possui e quantos *loci* são polimórficos?
- Família: quem contribuiu quais alelos para os genótipos do filho na geração seguinte? (estudos de parentesco)
- População: quais as frequências alélicas dos *loci* polimórficos e o número médio e efetivo de alelos por *locus*?
- Espécie: como a variação gênica total da espécie está repartida entre suas populações?

Número de alelos

Média do número de alelos ou número efetivo por locus é usada para caracterizar a extensão da diversidade genética.

Número médio de alelos (A)

$$A = \sum \text{alelos} / \text{NL} \leftarrow \text{Número de loci}$$

Número efetivo de alelos (A_e):

$$A_e = 1 / \sum x_i^2$$

Frequência de cada alelo

Locus de microssatélite em Chimpanzés

Locus com 5 alelos, mas...



- A=0,026
- B=0,316
- C=0,026
- D=0,079
- E=0,553

$$A_e = 1 / (0,026^2 + 0,316^2 + 0,026^2 + 0,079^2 + 0,553^2) = 2,42$$

A diversidade gênica ou alélica

É a variedade de alelos e genótipos presentes em populações, espécies ou grupos de espécies

- Pode ser medida de várias maneiras:

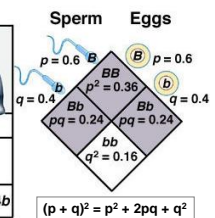
– Quantos heterocigotos a população tem (H_o)/deveria ter (H_e), em função das frequências gênicas?

(heterozigosidade/diversidade haplotípica)

– Se levarmos em conta também a diferença molecular entre os haplótipos chamamos de diversidade nucleotídica (π).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

Phenotypes			
Genotypes	BB	Bb	bb
Frequency of genotype in population	0.36	0.48	0.16
Frequency of gametes	0.36 + 0.24 = 0.6B 0.24 + 0.16 = 0.4b		



$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Populações estão em EHW quando:

- tamanho populacional é muito grande;
- acasalamento é ao acaso;
- não há fluxo gênico;
- não há novas mutações;
- não há seleção natural.

Populações saem do EHW ou evoluem quando algum fator evolutivo está presente: **seleção natural, deriva, mutação, fluxo gênico etc.**

Caracterização da diversidade genética

A composição genética de uma população é representada em termos de frequências alélicas, número de alelos e heteroziguidades.

Heteroziguidade observada x esperada:

A diversidade genética em um locus é caracterizada pela heteroziguidade observada H_o , esperada H_e e a diversidade alélica

H_o = freq. heterozigotos

$$H_e = 2pq \text{ ou } 1 - \sum_{i=1} p_i^2$$

- A medida mais comum para a variabilidade de frequência é a heteroziguidade (H), ou diversidade haplotípica (h) em casos de regiões ligadas ou haplóides.

- A variabilidade de seqüências pode ser medida pelo número de sítios polimórficos (NP) e pela distância molecular entre seqüência (p).

- A diversidade nucleotídica (p) entre seqüências incorpora além da frequência de cada seqüência também a diferença molecular entre elas.

Diversidade medida com DNA e Proteínas

Alozimas, RFLP, RAPD, AFLP, Microssatélites : Como se mede o polimorfismo?

Proporção de loci polimórficos

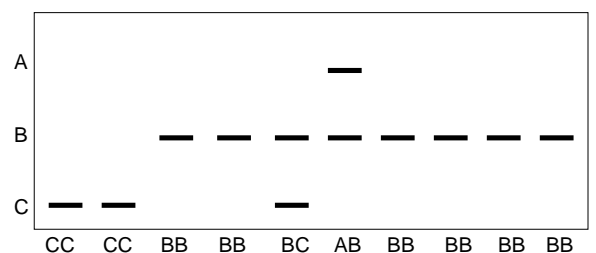
$$P = LP / (LP + LM)$$

onde LP = número de loci polimórficos e LM = número de loci monomórficos

Heteroziguidade

$$H = \sum (1 - \sum f_{xi}^2) / NL$$

onde f_{xi} = frequência do alelo i no loco x , e NL = número de loci



Genótipos: AB=1

BB=6

BC=1

CC=2

De genótipos a frequências gênicas

$$fA = (2 \cdot AA + AB + AC) / 2N$$

$$fA = (2 \cdot 0 + 1 + 0) / (2 \cdot 10)$$

$$fA = 1/20 = 0,05$$

$$fB = (2 \cdot 6 + 1 + 1) / 20$$

$$fB = 14/20 = 0,70$$

$$fC = (2 \cdot 2 + 1) / 20 = 5/20 = 0,25$$

$$fA + fB + fC = 1,00$$

Genótipos: AB=1

BB=6

BC=1

CC=2

Das frequências gênicas à heteroziguidade

$$fA = 0,05$$

$$fB = 0,70$$

$$fC = 0,25$$

$$H = 1 - \sum f_x^2$$

$$H = 1 - (0,05^2 + 0,70^2 + 0,25^2)$$

$$H = 1 - 0,555 = 0,445$$

Alozimas

Diversidade genética em leões Africanos

26 loci (número de loci, NL)
20 monomórficos
6 polimórficos

Proporção de loci polimórficos
 $P=6/26=0,23$



Alozimas

Diversidade genética em leões Africanos

Número médio de alelos (A):

ADA= 3 alelos

DIAB= 2 alelos

ESI= 2 alelos

GPI= 2 alelos

GPT= 2 alelos

MPI= 2 alelos

+ 20 loci = 1 alelo

$$A=[1*3+5*2+(20*1)]/26= 1,27$$

Locus	Alelo			H
	1	2	3	
ADA	0,56	0,33	0,11	0,56
DIAB	0,61	0,39		0,47
ESI	0,88	0,12		0,21
GPI	0,85	0,15		0,26
GPT	0,89	0,11		0,20
MPI	0,92	0,08		0,15

Alozimas

Heterozigosidade média

$H = \sum \text{heterozigosidades de cada locus} / NL$

$$H=(0,56+0,47+0,21+0,26+0,20+0,15+(20*0))/26=0,071$$



Loci	Alelos			H
	1	2	3	
ADA	0,56	0,33	0,11	0,56
DIAB	0,61	0,39		0,47
ESI	0,88	0,12		0,21
GPI	0,85	0,15		0,26
GPT	0,89	0,11		0,20
MPI	0,92	0,08		0,15

Leões Asiáticos da Floresta de Gir

< 250 indivíduos

Bottleneck < 20 indivíduos em 1900

50 loci

	H
Gir (Índia)	0
Africanos	0,015-0,078



Sequências: Como se mede o Polimorfismo?

Número de sítios polimórficos: NP

Diversidade haplotípica

$$H = 1 - \sum f_x^2$$

onde f_x = frequência do haplótipo x

Diversidade nucleotídica

$$\pi = (\sum f_x f_y p_{xy}) / N_{\text{hapl}}$$

onde f_x e f_y são as frequências dos haplótipos "x" e "y";

p_{xy} é a distância p (número de diferenças) entre os dois haplótipos, e N_{hapl} = número de haplótipos

1	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
2	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
3	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
4	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
5	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
6	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	Hap 1 (3)
7	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
8	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
9	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	Hap 2 (3)
10	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
11	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
12	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	Hap 3 (4)
13	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
14	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
15	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	Hap 4 (2)
16	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
17	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
18	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
19	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	Hap 5 (9)
20	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	
21	ACTTGGCCGGAATTCCTCAATTTTAAAGTCTATGAATTCATAACTACTATTATAAATA	

↑ ↑ ↑ ↑ Sítios polimórficos

Diferença entre os haplótipos (p)

	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5
Hap1	-	0,04	0,06 (3/50)	0,04	0,02
Hap2	-	-	0,06	0,04	0,02
Hap3	-	-	-	0,02	0,04
Hap4	-	-	-	-	0,02
Hap5	-	-	-	-	-

Diversidade genética em lobos da Etiópia



Canídeos com maior risco de extinção

6 populações isoladas na Etiópia

População total < 500 indivíduos

Declínio: destruição do hábitat devido ao avanço da agricultura e ao crescimento da ocupação humana.

Diversidade genética em lobos da Etiópia



Dados obtidos de 9 loci de microssatélites.

	A	Ho	He	Ae	N amostral
Lobo da Etiópia					
Sanetti Plateu	2,0	0,150	0,138	0,121	16
Web Valley	2,8	0,313	0,271	1,37	23
Cão	6,4	0,516	0,679	3,11	35
Lobo cinza	4,5		0,620	2,63	18
Coioote	5,9		0,675	3,08	17

Diversidade genética em lobos da Etiópia



	A	Ho	He	Ae	N amostral
Lobo da Etiópia					
Sanetti Plateu	2,0	0,150	0,138	0,121	16
Web Valley	2,8	0,313	0,271	1,37	23
Cão	6,4	0,516	0,679	3,11	35
Lobo cinza	4,5		0,620	2,63	18
Coioote	5,9		0,675	3,08	17

Resultados:

- A, He e Ae menores que das espécies não-ameaçadas => menor potencial evolutivo.

- A He de Sanetti foi menor que a de Web => hibridização com cães em Web (presença de alelos de cães)

Diversidade genética em lobos da Etiópia



Medidas recomendadas:

- População de cães domésticos controlada para evitar a hibridização e o aparecimento de doenças,

- Programa de reprodução em cativeiro de animais da população "pura",

- O reconhecimento do Lobo da Etiópia como uma espécie distinta que merece ser conservada.

Softwares para análise de diversidade genética

- Arlequin v. 3.11
- Genetix v. 4
- GenePop v. 2 e outras
- DNAsp
- Mega

Evolução e Biodiversidade

Unidades Evolutivas para manejo de fauna e flora

O Valor da Biodiversidade

• Antropocêntrico

– Valor para a espécie humana baseada na sua provisão de bens, serviços ao ecossistema e informação (científica, cultural).

• Biológico

– Valor intrínseco que é dado aos organismos vivos, espécies e comunidades bióticas separadas dos interesses humanos.
– Não é mutuamente exclusivo em relação ao valor antropocêntrico.

Unidades da Biodiversidade



• Variabilidade genética

• Espécies

• Ecossistemas

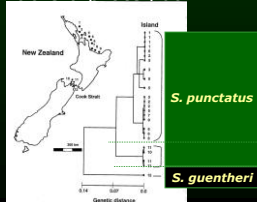
Problemas com o Conceito de espécie

- i. Vago
- ii. Não abrangente
- iii. Diferentes grupos de organismos possuem diferentes:
 - a. Tempos de geração
 - b. Mecanismos de reprodução
 - c. Diferentes ploidias
- iv. A especiação é um processo dinâmico e não existe um limite exato de diferenciação que possa ser apontado como o marco zero do início de uma espécie.

Tuataras

Únicos membros de Rhynchocephalia

- *Sphenodon guentheri* é muito similar morfológicamente à Tuatara comum *Sphenodon punctatus*, considerada anteriormente como uma sub-espécie.
- *S. guentheri* é única mas não era protegida.



Espécies como Unidades de evolução

- Para se estudar a biodiversidade e propor métodos de manejo e preservação é necessário garantir que esta continue a evoluir rumo à especiação ou à extinção, com o mínimo de impacto antrópico.

Alternativa ao conceito de espécie para Conservação

- salvar as espécies não é o bastante
- é preciso preservar o máximo (muitas populações variáveis) para que a espécie possa continuar a evoluir em um ambiente em constante mudança.

ESU

Evolutionary Significant Units

Unidades Evolucionárias Significativas

Podem ser definidas como unidades evolutivamente "independentes" de uma espécie com importância na conservação

Ex: subespécie, grupo de populações, populações específicas, a espécie como um todo, etc...

ESU e prática conservacionista

- **OCUs: OPERATIONAL CONSERVATION UNITS.** Estimativa do número de populações distintas, dentro das **ESU** definidas, que se pode manejar com os recursos disponíveis.
- Desenvolver um plano de conservação com objetivos concretos segundo o estado de conservação das unidades definidas:



Leontopithecus rosalia - Mico-leão-dourado

Restrito ao Sul do Rio de Janeiro, matas de Silva Jardim e Casimiro de Abreu, Reserva Biológica de Poço-das-Antas e montanhas de Cácia do Rio São João.



Leontopithecus chrysomelas - Mico-leão-de-cara-dourada

Distribuído do sul da Bahia, entre Rios Belmonte e Pardo no sul, e Rio Contas no norte.



Leontopithecus chrysopygus - Mico-leão-preto

Era encontrado ao norte do Rio Paranapanema, leste do Rio Paraná, Sul do Rio Tietê e Serra de Paranapiacaba. Hoje está restrito à Reserva Estadual de Morro Grande em Teodoro Sampaio, Reserva Biológica de Caeteteus em Gallatão, estado de São Paulo. Recentemente foi descoberto na Estação Ecológica de Angatuba



Leontopithecus caissara - Mico-leão-de-cara-preta

Existe apenas na Ilha de Superagui, costa norte do Paraná.



Mata Atlântica

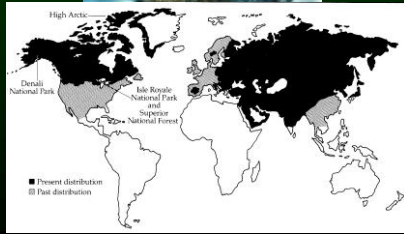


De acordo com o C.B.E. e dados genéticos, estas poderiam formar uma única espécie



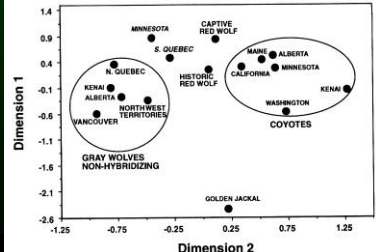
Estes três grupos de organismos são classificados como espécies mas funcionam na verdade como 3 **E.S.U.s**, isoladas umas das outras e com independência evolutiva - medida importante para a sua conservação.

Lobo cinza



Lobo vermelho

funciona como uma ESU?



O lobo vermelho é um híbrido entre o lobo e o coioote



Conservação e Evolução

Depressão Exogâmica

Depressão Endogâmica

Fragmentação de ambientes - subdivisão de populações

Riscos de Extinção

População mínima viável

Depressão exogâmica

Redução no sucesso reprodutivo ou viabilidade dos indivíduos observados na prole da F1 ou gerações subsequentes, entre indivíduos da mesma espécie, de distintas populações.

Ex: Reintrodução do Íbex nas montanhas Tatra (Rep. Tcheca)

Após extinção local, foram translocados indivíduos da mesma subespécie, vindos da Áustria. Subsequente introdução de animais da Turquia e do Sinai, adaptados ao deserto, levou esta população à extinção. Causa: o ciclo reprodutivo foi rompido já que os híbridos mal-adaptados tinham cio no outono e fatalmente iriam ter os filhotes em fevereiro, o mês mais frio.



Obs: não deve ser confundida com problemas relacionados com a formação de híbridos inter-específicos

Causas da depressão exogâmica

Adaptação local - interações genótipos x ambiente conjunto de adaptações restritas de determinadas populações em seus ambientes.

Híbridos podem ter combinações alélicas que não sejam adaptadas ao ambiente onde estes se encontram. Ex: Íbex da Rep. Tcheca

Coadaptação gênica - interações epistáticas

combinações de estruturas cromossômicas ou de genes e alelos em uma população que produzem efeitos favoráveis (coadaptados).

Híbridos podem ter combinações cromossômicas e alélicas não favoráveis (deletérias). Ex: Peromyscus polionotes (roedor da Califórnia nos E.U.A.)

Depressão endogâmica

Redução no sucesso reprodutivo ou viabilidade populacional devido à endogamia ou acasalamentos consangüíneos (relacionados por ancestralidade recente).

Geralmente os caracteres deletérios se expressam devido ao maior aparecimento de genótipos homozigotos por indivíduo. Esta é uma consequência inevitável do pequeno tamanho populacional mantido ao longo de algumas gerações.

Endogamia no cavalo de Przewalski

Extinto na natureza, foi reintroduzido na Mongólia através de espécimes de cativeiro.



Todos cavalos de Przewalski atuais na Mongólia derivam de apenas 13 indivíduos fundadores (um destes era uma fêmea de uma raça doméstica).

Fragmentação de ambientes e de populações

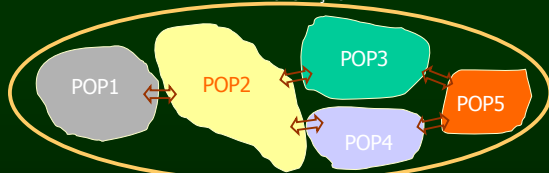
Espécies possuem distribuição geralmente subdividida em populações, onde o conjunto de todas se chama Metapopulações

Diferentes espécies apresentam uma distribuição espacial das populações no ambiente que pode refletir:

- mobilidade e dispersão dos indivíduos da espécie
- dispersão associada a outra espécie (insetos-plantas)
- generalidade e flexibilidade adaptativa da espécie
- especialidade a um determinado microambiente ou nicho
- etc

A fragmentação dos ambientes leva ao rompimento do padrão de dispersão e fluxo gênico entre as populações.

METAPOPOPULAÇÃO



CONSEQUÊNCIAS NEGATIVAS DAS DISTRIBUIÇÕES DESCONTÍNUAS:

Aumento da probabilidade de extinção e de efeitos demográficos e genéticos deletéreos. Atuam sobretudo em circunstâncias de fragmentação artificial.

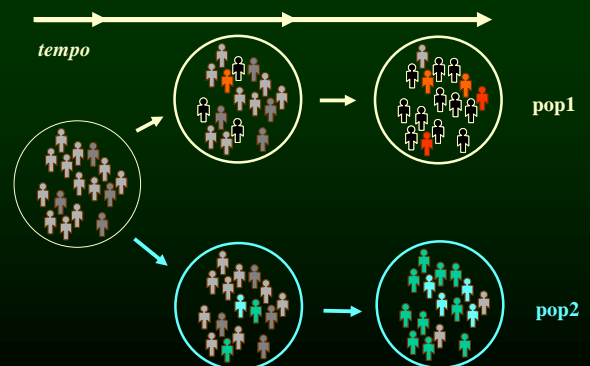
CONSEQUÊNCIAS DA FRAGMENTAÇÃO 'NATURAL':

Distribuições naturais estáveis (heterogeneidade e/ou carácter isolado do hábitat). Adaptação local ou coadaptação gênica por interrupção do fluxo gênico.

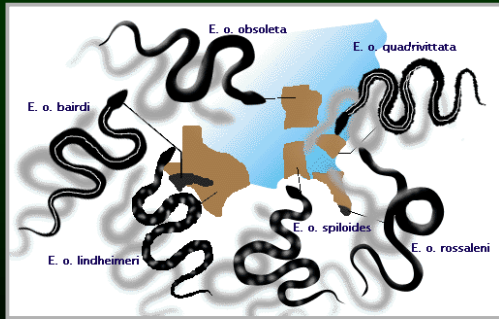
Aumento da diversidade genética e ecológica = ESPECIAÇÃO INCIPIENTE.

Fissão de populações

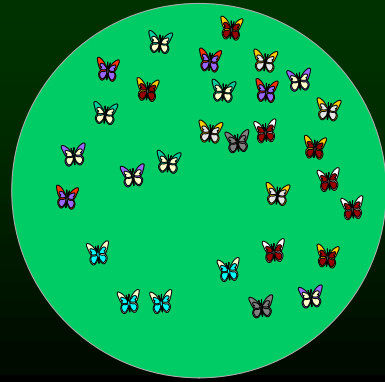
mutações, deriva, seleção, diferentes níveis de fluxo gênico



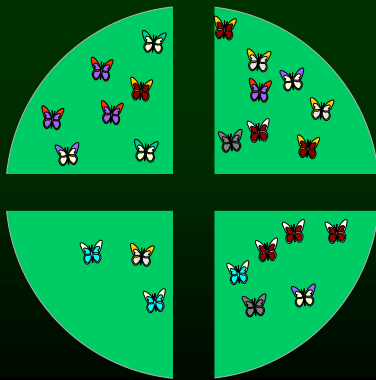
Distribuição espacial de *Elaphe obsoleta*
 Variação acumulada por processos de deriva e/ou seleção natural



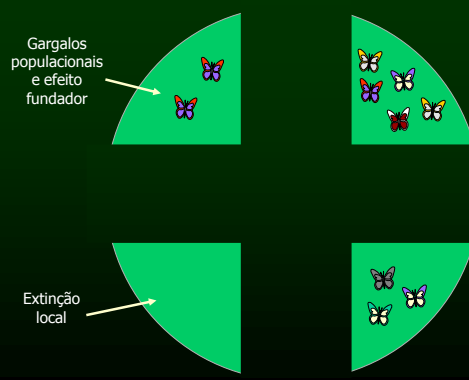
Fragmentação artificial de ecossistemas



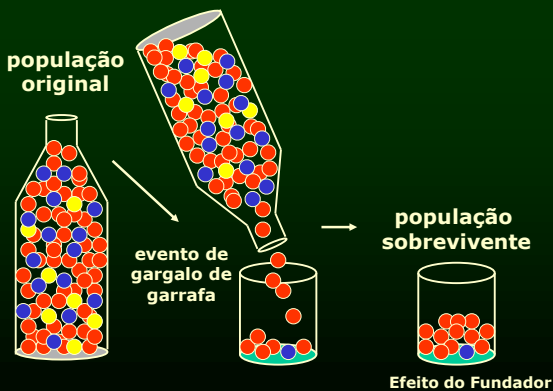
Fragmentação artificial de ecossistemas



Fragmentação artificial de ecossistemas



"Gargalo de garrafa" Genético

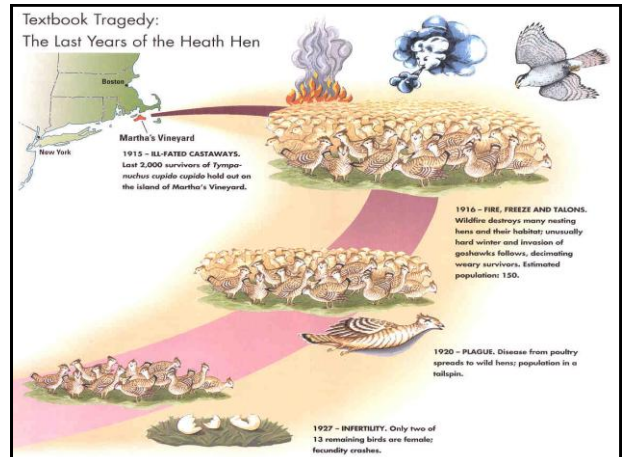


Extinção devido ao acaso

1. **Estocasticidade Demográfica** (extinção devida à variação ao acaso nas taxas de morte e nascimento)
2. **Estocasticidade Genética** (extinção devido à endogamia e perda de variabilidade genética)
3. **Estocasticidade Ambiental** (variação em condições abióticas e climáticas que direcionam populações à extinção em larga escala)
4. **Catástrofes Naturais** (eventos locais tais como inundações, fogo e erupções vulcânicas que eliminam populações em áreas restritas)

Extinção devido ao homem

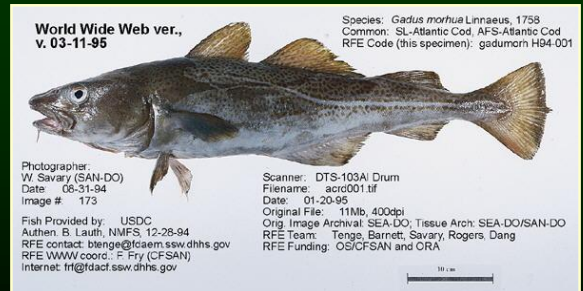
- Superpopulação => destruição dos habitats, urbanização, industrialização, necessidades econômicas e energéticas;
- Caça ilegal, tráfico de animais silvestres para serem usados como mascotes;
- Pesca comercial => morte de animais não alvo (tartarugas, golfinhos, tubarões....);
- Alimentação => ovos e carne de tartarugas, carne de baleia....;
- Poluição em nível local e global.



Eventos recentes e documentados de Extinção

- 1680 **Dodó** - caçado pela carne. Ilhas Maurício.
- 1741 **Vaca Marinha de Steller** - caçada até sua extinção, apenas 27 anos após sua descoberta. Pacífico norte.
- 1883 **Quagga** - caçada por esporte, couro e carne. África do Sul.
- 1914 **Pombo passageiro** - foi caçado aos milhões com redes e tiros.
- 1933 **Tilacino** - envenenado. Austrália e Tasmânia.
- 1937 **Tigre do Cáspio** - raça extinta. Quanto tempo resta para as demais raças?
- 1957 **Rã pintada da Palestina** - vítima da drenagem de pântanos. Palestina.
- 1970-98 **300 espécies de ciclídeos do Lago Vitória** - introdução de peixes e plantas exóticas. África central.
- 2001 **Ararinha azul** - último exemplar desapareceu na natureza. Brasil - Estão tentando reintroduzir animais de cativeiro.

Bacalhau do Atlântico



REINTRODUÇÃO: Retornando animais para a natureza



Por quê reintroduzir?

Meta: restabelecer uma população viável e auto-sustentável por longo tempo de uma espécie selvagem.

- manejar pequenas populações (i.e., aumentar a variação genética)
- promover a consciência conservacionista
- aumentar a proteção de habitats
- restabelecer algumas espécies "chave"

Tipos de Reintrodução

Para propósitos de conservação	Reintrodução
	Suplementação
	Introdução-Conservação
	Translocação
Para outros propósitos	Resgate/assistência

Reintrodução de uma espécie em uma área onde não existe mais

Oryx arábico

Extinto em 1972 (Arábia Saudita, Oman, Jordânia)

Causas: caça

Reintrodução: animais de cativeiro dos EUA e Oriente-Médio, começou em 1980



situação: população reintroduzida apresenta depressão endo e exogâmica

Adição de indivíduos em uma área onde a população daquela espécie ainda existe

Mico-Leão-Dourado

População caiu para ~200 (1970)

Causas: Perda de hábitat

Suplementação: começou em 1983, a partir de animais de 140 zôos em vários países.



situação: adição de animais de cativeiro diminuiu a endogamia sendo atualmente em torno de 1,9%.

Introdução de uma espécie em uma área onde esta nunca existiu

Rato da Ilha Thevenard

População entrou em extinção devido à introdução de roedores exóticos

Causas: Envenenamento, etc

Introdução: para Ilha Serrurier, Austrália, em 1986



Movimento de animais selvagens de um hábitat natural para outro

Castor europeu

Extinto há >1.000 anos na Dinamarca

Causas: caça, perda de hábitat

Translocação: em 1999 da Alemanha



Resgate/assistência

Gibão de Lar

Reintrodução: animais órfãos e indivíduos confiscados



Elefante asiático

Translocação: proteger elefantes e prevenir injúrias a agricultores

Reintrodução: Considerações evolutivas, genéticas e ecológicas

Local/habitat de introdução
topografia, vegetação, etc

Ecologia e comportamento da Espécie
necessidades de alimento, habitat, etc

Critérios genéticos
possibilidade de hibridização, depressão exogâmica etc

Critérios evolutivos
persistência a longo prazo, tamanho mínimo viável, ESU

Transmissão de doenças

Monitoramento pós-introdução



Diversidade Genética

- Necessária para a continuidade evolutiva;
- Fundamento de toda Biodiversidade;
- Originada por mutação e intensificada por mecanismos recombinatórios e sexuais;
- Manifestada no nível genotípico e algumas vezes também fenotípico;
- Pode ser neutra (submetida apenas a Deriva) ou adaptativa (submetida à Deriva e Seleção Natural).