

CAPÍTULO 3

**Genética da conservação:  
diversidade e estrutura genética  
como estratégias de conservação**

Adelson Lemes da Silva Júnior

Marciane da Silva Oliveira

Wellington Ronildo Clarindo

## Introdução

A perda da biodiversidade é uma crise silenciosa, que, além da iminente extinção de espécies, tem afetado toda uma cadeia de serviços ecossistêmicos, como conservação da água e do solo, regulação climática, dispersão de sementes de plantas, controle de pragas e doenças, bem como obtenção de bens e insumos para produção alimentícia, farmacêutica, civil, entre outros (SOL, 2020). Em busca de soluções, acordos mundiais foram realizados visando, em tese, à manutenção da biodiversidade global. Porém, as ações tomadas ainda têm sido incipientes frente às contínuas mudanças climáticas e aos diversos fatores antrópicos (HOFFMANN; SGRÒ; KRISTENSEN, 2017).

O clássico exemplo é o das florestas tropicais, que ocupavam grandes extensões contínuas e, atualmente, limitam-se a pequenos e espaçados fragmentos, demonstrando o quão agressiva tem sido a exploração ao longo dos anos (RIBEIRO et al., 2016). Entre os fatores para essa perda e degradação de habitats, estão as expansões agrícola e urbana e as grandes instalações de empreendimentos, como hidrelétricas, portos e mineração, que têm representado grandes riscos a uma gama de espécies (BRASIL, 2022).

O maior impacto da fragmentação é a redução da diversidade genética. A diminuição do número total de indivíduos – que resulta na redução do tamanho da população – e o isolamento espacial dos remanescentes florestais têm tornado as espécies suscetíveis, limitando-as evolutivamente (STOWELL; PINZONE; MARTIN, 2017). A redução drástica do número de

indivíduos e do tamanho populacional favorece a ocorrência da deriva genética, que, por sua vez, é mais contundente em populações reduzidas. Esse processo evolutivo altera aleatoriamente as frequências alélicas, promovendo a fixação ou não de alelos e, conseqüentemente, a redução da variabilidade genética.

Soma-se a isso o fato de que, com a fragmentação, a migração de indivíduos entre as populações é dificultada ou mesmo impedida. Com a impossibilidade do fluxo gênico, há uma maior diferenciação entre as populações, resultando no isolamento. O fluxo gênico entre as populações atua em sentido contrário ao da deriva genética, e a sua ocorrência diminui a probabilidade de fixação ou de perda de alelos e pode levar à introgressão de genes e alelos de uma população para outra. Por isso, a migração contribui para o aumento da variabilidade genética. No entanto, com a ocorrência da deriva genética e a não ocorrência do fluxo gênico entre as populações da espécie, seus indivíduos tenderão à homogeneidade dentro das populações e à heterogeneidade entre elas (SANTOS; OLIVEIRA, 2020; TEMPLETON, 2011).

Com a perda da variabilidade genética e a ocorrência da seleção natural, como pragas, doenças e mudanças climáticas, as espécies e suas populações estarão ainda mais vulneráveis a eventos que podem levar à perda da capacidade de manutenção e reprodução, pois os genótipos que seriam mais adaptados às novas condições podem ter sido eliminados por deriva genética em gerações anteriores. O impacto dessa erosão genética poderá alterar todo o funcionamento presente e futuro da vida na Terra (CARVALHO et al., 2009).

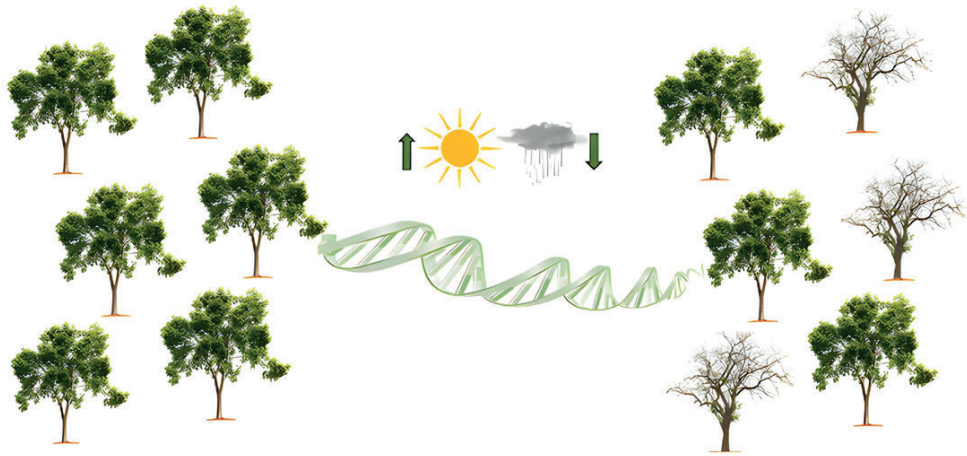
Alguns estudos realizados com populações naturais têm demonstrado a importância de espécies-chave para o funcionamento ecossistêmico (DÍAZ-GARCÍA et al., 2017; WOODCOCK et al., 2019). Além disso, as populações naturais são fonte de variabilidade genética, permitindo, via melhoramento genético, a obtenção de novas combinações de interesse para o homem, como variedades mais produtivas, resistentes e adaptadas (FALEIRO, 2011).

Assim, esforços voltados à conservação das espécies e de suas populações naturais devem ser direcionados à proteção da diversidade genética em escala global (LAIKRE, 2010), uma vez que a variação genotípica é a grande responsável pela variação fenotípica dos indivíduos, manifestando-se em características de importância ecológica e econômica.

### **O conhecimento da diversidade e estrutura genética como estratégias de conservação**

A conservação de espécies está intimamente associada às diferenças entre os seus indivíduos. Essas diferenças podem se dar através das variações fenotípicas, tornando necessário o conhecimento de como a variação dos genes (alelos) está envolvida na expressão de um determinado caráter (KAGEYAMA; GANDARA, 2004). Entretanto, a variação genética entre os indivíduos e/ou populações de uma mesma espécie está relacionada à composição alélica dos genótipos individuais e às diferenças de frequências desses alelos entre as populações. O somatório das variações hereditárias acumuladas durante o processo evolutivo de uma espécie é conhecido como diversidade genética (SANTOS et al., 2015).

Essas variações contidas no DNA genômico são essenciais para a manutenção das espécies nos ecossistemas ou habitats naturais. Por outro lado, a perda dessas variações poderá acarretar diminuição da capacidade adaptativa das populações de uma determinada espécie diante de fatores estressantes (EL-ESAWI, 2019). Por exemplo, em ambientes com déficit hídrico, a presença ou a falta de variantes genéticas entre os indivíduos de espécies vegetais está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência e manutenção (Figura 1).



**Figura 1:** Representação da ocorrência de diversidade genética, favorecendo a manutenção de uma espécie florestal em condição de déficit hídrico

Fonte: elaborado pelos autores.

A distribuição dessa diversidade genética dentro e entre populações da espécie é denominada estrutura genética, moldada por fatores como histórico de vida, tamanho populacional, barreiras geográficas, gargalos, fluxo de genes, seleção natural e acúmulo de mutações. Portanto, permite

inferir a dispersão e delimitação de espécies e seus indivíduos, comportamentos de acasalamento e limites populacionais (JANES; BATISTA, 2016). Além disso, a diversidade e estrutura genética têm sido estrategicamente utilizadas na caracterização do *status* de conservação e na determinação da vulnerabilidade das espécies para que sejam implementadas medidas eficazes de manejo (LAIKRE, 2010).

Em estudo com a espécie arbórea *Plathymenia reticulata*, realizado em um fragmento de Floresta Atlântica, a diversidade e estrutura genética foram avaliadas e demonstraram que, apesar do histórico de vulnerabilidade e o corte seletivo de madeira ocorrente no local, não foi observada erosão genética, confirmando a capacidade de manutenção da espécie (SOUZA et al., 2017). A diversidade e estrutura genética também foram avaliadas para a espécie de mamagava (*Bombus pauloensis*), investigada ao longo do tempo por meio de espécimes de coleções datadas de 1933 a 2016 e comparadas com populações naturais ocorrentes na região Sul do Brasil. Os resultados evidenciaram a perda da diversidade genética da espécie ao longo dos anos e a necessidade urgente de políticas de conservação (MAEBE et al., 2019). Tal conhecimento só foi possível com o avanço das técnicas biotecnológicas, o advento da manipulação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e a capacidade de acessar geneticamente regiões específicas e variáveis conhecidas como marcadores moleculares (GUIMARÃES et al., 2009).

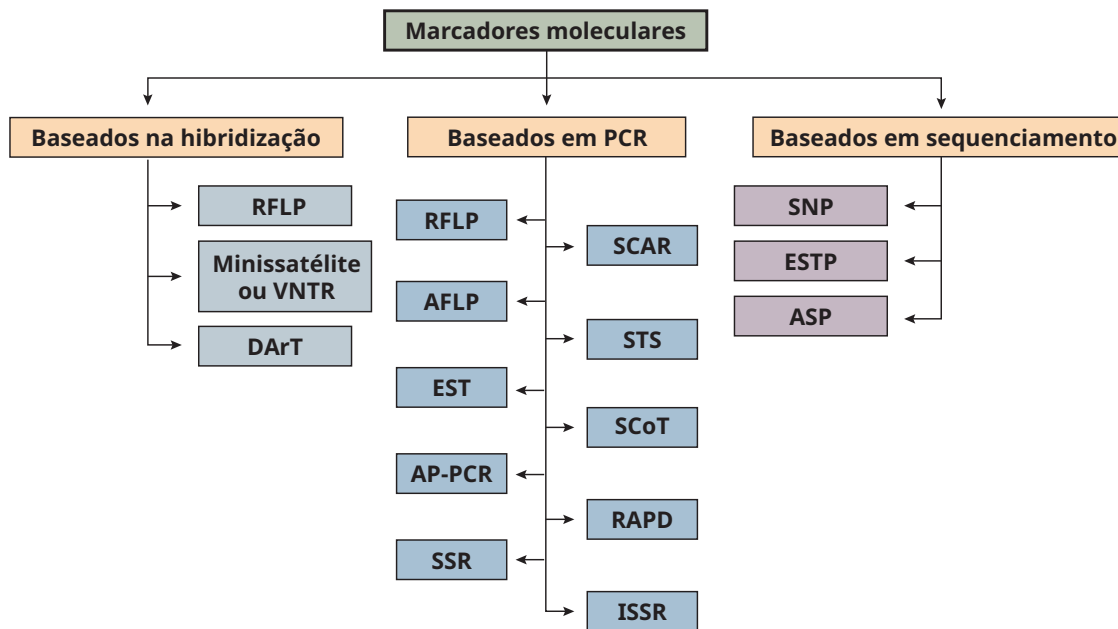
## **Uso dos marcadores moleculares como ferramenta para estudos em genética da conservação**

Os marcadores moleculares têm se mostrado uma ferramenta muito eficiente para captar as diferenças genéticas entre indivíduos e/ou a diversidade genética entre populações, diretamente do DNA. Os marcadores moleculares surgiram por volta de 1980 com a manipulação do DNA, por meio de técnicas de biologia molecular. Esses marcadores apresentaram vantagens sobre os morfológicos, ao fornecerem um número praticamente ilimitado de polimorfismos distribuídos ao longo do genoma (GUIMARÃES et al., 2009).

De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998), os marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma. Para fins de conservação, são utilizados em análises da distribuição geográfica da variabilidade, estudos de diversidade e estruturação genética, identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, acessos duplicados, auxílio em trabalhos de classificação botânica e filogenia, seleção de genitores, construção de mapas genéticos, entre outros (FALEIRO, 2011).

Diferentes marcadores moleculares foram identificados a partir da manipulação do DNA e estão divididos quanto à tecnologia utilizada para seu desenvolvimento, ao objetivo de uso e à qualidade da informação gerada. Em relação à tecnologia para desenvolvimento, os marcadores podem ser baseados na hibridação com sondas específicas, pela

amplificação do DNA via reação em cadeia da polimerase (PCR) e em sequenciamento (Figura 2) (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).



**Figura 2:** Marcadores moleculares separados de acordo com a tecnologia utilizada para seu desenvolvimento. RFLP: *Restriction Fragment length polymorphisms*; VNTR: *Variable number of tandem repeats*; DArT: *Diversity array technology*; SCAR: *Sequence characterized amplified region*; AFLP: *Amplified fragment length polymorphism*; STS: *Sequence tagged sites*; EST: *Expressed sequence tag*; SCoT: *Start codon targeted*; AP-PCR: *Amplified polymorphism – Polymerase chain reaction*; RAPD: *Random amplified polymorphic DNA*; SSR: *Simple sequence repeats*; ISSR: *Inter simple sequence repeats*; SNP: *Single nucleotide polymorphisms*; ESTP: *Expressed sequence tag polymorphism e*; ASP: *Allele specific polymorphism*

Fonte: elaborado pelos autores.

Para o objetivo de uso e qualidade da informação gerada, os marcadores podem ser classificados como dominantes e codominantes. A classe de marcadores dominantes não permite a diferenciação entre homozigotos e heterozigotos, no entanto, são considerados universais, capazes de



produzir múltiplos fragmentos de DNA em qualquer espécie (cada um dos quais é considerado um *loci*), sem a necessidade de conhecer previamente as sequências de DNA da região genômica (NG; TAN, 2015). A utilização desses marcadores está descrita em uma série de estudos (SILVA JÚNIOR et al., 2017; SOUZA et al., 2017; VIEIRA et al., 2022), e possui grande importância quando não há informações prévias sobre a espécie.

O uso de um tipo de marcador dominante, denominado Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), está evidenciado em um estudo com variedades da cochonilha (*Kerria lacca*). Essa é uma espécie de inseto intensamente explorada devido à capacidade de produzir Lac, um componente comercialmente importante na produção de resina, corante e cera. Além disso, as atuais condições ambientais e a domesticação da espécie têm extinguido algumas de suas variedades. Os resultados demonstraram que a espécie ainda possui variabilidade genética significativa e que pode ser utilizada no melhoramento genético. Porém, assim como nos bancos de germoplasma, as condições de armazenamento são necessárias para conservar a variabilidade genética da espécie (SAHA et al., 2011).

Os marcadores codominantes, por outro lado, são aqueles em que duas ou mais formas podem ser discriminadas, ou seja, dividem-se em bialélicos ou multialélicos, ambos diferenciando indivíduos homozigotos e heterozigotos. Essa classe de marcadores é considerada específica para a espécie de interesse, com possibilidade limitada de transferência a outras espécies e alto grau de informatividade. Essa especificidade e capacidade de diferenciação dos genótipos têm favorecido a utilização desses marcadores, resultando em informações mais robustas

em estudos em que já se tenha ou não o conhecimento sobre a caracterização genética e o *status* de conservação das espécies (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2020).

Em estudo com a borboleta *Lycaena helle*, foram utilizados marcadores codominantes multialélicos, denominados microssatélites ou Simple Sequence Repeat (SSR), para avaliar a perda da diversidade genética em populações afetadas pelo aquecimento global. O uso dessa ferramenta revelou que os cenários previstos acerca desse fenômeno continuarão a reduzir a conectividade entre as populações. Contudo, medidas como a delimitação de áreas prioritárias e a criação de Unidades de Conservação são capazes de manter e restaurar gradualmente a diversidade da espécie (HABEL et al., 2011).

Atualmente, técnicas avançadas de identificação de marcadores moleculares estão disponíveis. São as Next-Generation Sequencing (NGS), traduzidas para o português brasileiro como o sequenciamento de nova geração. As novas tecnologias têm incorporado técnicas anteriormente descritas, como o método de Sanger, que utiliza a terminação de cadeia com dideoxinucleotídeos. Contudo, possuem capacidade expressivamente maior para gerar informação, com uma substancial economia de tempo e menor custo por base para o sequenciamento (CARVALHO; SILVA, 2010).

O método de Sanger foi descrito em 1977 pelo pesquisador Frederick Sanger e atua sobre fragmentos de DNA, determinando a ordem em que estão dispostas as bases nitrogenadas ao longo do material genômico dos organismos. Portanto, anteriormente ao próprio processo de sequenciamento, é

necessário que as longas sequências de DNA sejam extraídas, isoladas e posteriormente clivadas com enzimas de restrição. Em seguida, são realizadas etapas de multiplicação do DNA utilizando bactérias, clivagem com número de pares de bases (pb) específico e desnaturação da molécula nativa (CARVALHO; SILVA, 2010).

Dessa forma, o método de Sanger é realizado a partir de uma cadeia simples do DNA e se baseia na utilização de dideoxynucleotídeos (ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP) como análogos aos deoxinucleotídeos padrões (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), os quais, ao serem inseridos, interrompem a síntese da nova fita de DNA devido à ausência da hidroxila (OH), necessária para que o próximo nucleotídeo seja incorporado. Por fim, são utilizadas técnicas de eletroforese em gel para separação e visualização dos fragmentos, correspondentes às bases nitrogenadas (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Como mencionado anteriormente, as técnicas de NGS permitem o sequenciamento amplo do genoma em um curto espaço de tempo, graças à adoção da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, dispensando o intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis (CARVALHO; SILVA, 2010). Essa capacidade de maior abrangência, inclusive de genomas inteiros, simplificou o processo de isolamento de microssatélites, facilitando o desenvolvimento de alto rendimento de marcadores pela maior quantidade de regiões avaliadas. Além disso, espécies não modelos, pouco estudadas e com risco eminente de extinção podem ser

avaliadas de forma ampla, incluindo análises de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNPs), caracterizados como polimorfismos específicos a diferenças em uma única posição no genoma, um único nucleotídeo (substituição, deleção ou inserção) (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Os SNPs são caracterizados como marcadores codominantes bialélicos, pois, tratando-se da avaliação em um único nucleotídeo, podem ser reconhecidos até dois alelos distintos (MORIN; LUIKART; WAYNE, 2004). Apesar do número reduzido de alelos identificados por *loco*, pesquisadores têm reconhecido esses marcadores, juntamente com o SSR, como sendo os mais eficientes atualmente para a realização de análises de diversidade genética e, principalmente, de estudos demográficos e evolutivos (HODEL et al., 2016). Em estudo com quatro populações da espécie *Rhododendron cyanocarpum*, uma pequena arbórea ameaçada de extinção, endêmica das montanhas Cangshan em Dali, província de Yunnan, sudoeste da China, a utilização de uma grande quantidade de marcadores SNPs foi capaz de gerar informações sobre a diversidade e estrutura genética das populações, além de informações históricas, como a detecção de mudanças no tamanho efetivo dessas populações ( $N_e$ ) 150.000 anos atrás, incluindo um evento de gargalo há 60.000 anos (LIU et al., 2020).

Diante das características e funções aqui listadas, o uso dos marcadores moleculares como ferramenta para estudos em genética da conservação tem se destacado há décadas, fornecendo informações úteis na tomada de decisões, sem as quais um número sem precedentes de espécies estaria em estado de vulnerabilidade ou até mesmo extinta.

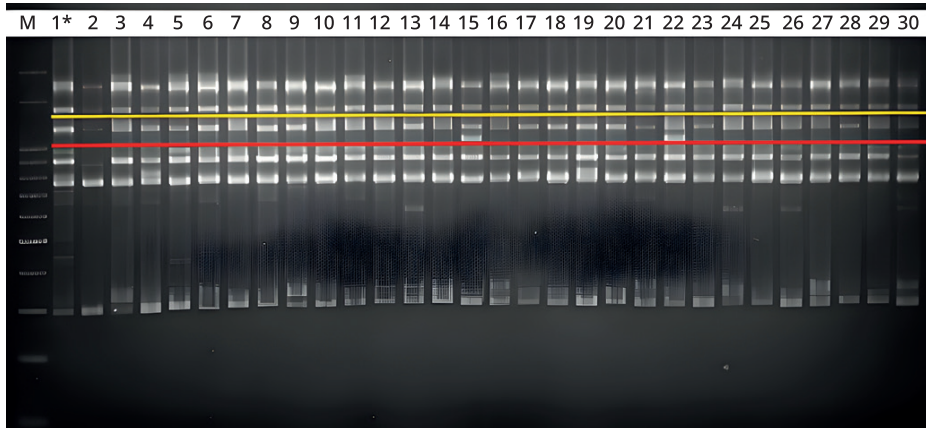
## **Informações obtidas a partir do emprego de marcadores moleculares no estudo da diversidade genética**

A diversidade genética é definida como a mensuração que quantifica a magnitude da variabilidade genética presente numa população ou espécie. Ela é considerada um importante fator para a avaliação da conservação e o melhoramento genético. No entanto, para avaliar a diversidade genética, é necessário acessá-la e, para isso, são utilizados os marcadores genéticos, que têm sido amplamente empregados em estudos da ictiofauna, dada a importância econômica e ecológica desses animais.

Conforme apresentado no item anterior, existem marcadores moleculares dominantes e codominantes, sendo o acesso às informações dos genótipos inerentes aos marcadores. Dito isso, aqueles que são dominantes não apresentam sensibilidade para diferenciar o genótipo heterozigoto do homozigoto dominante, e esses dois genótipos são considerados uma só classe, ao passo que o genótipo homozigoto “recessivo” (aa) é identificado pela ausência da banda no gel (fenótipo nulo) (Figura 3). Ao analisar o gel, é feita a codificação binária de "1" e "0" para presença e ausência da banda, respectivamente.

A Figura 3 apresenta gel fotodocumentado para 30 indivíduos da espécie *Dalbergia nigra*, árvore conhecida popularmente como jacarandá da Bahia, empregando *primer* ISSR e marcador de peso molecular de 100 pb (M). A banda sobre a linha amarela é monomórfica, pois está presente em todos os indivíduos. Já a banda sobre a linha vermelha é polimórfica,

estando presente apenas nos indivíduos 15 e 22 e recebendo o código 1, enquanto os demais indivíduos receberam o código 0.



**Figura 3:** Gel fotodocumentado para 30 indivíduos da espécie *Dalbergia nigra*

Fonte: Adelson Lemes da Silva Júnior, em 21/04/2020.

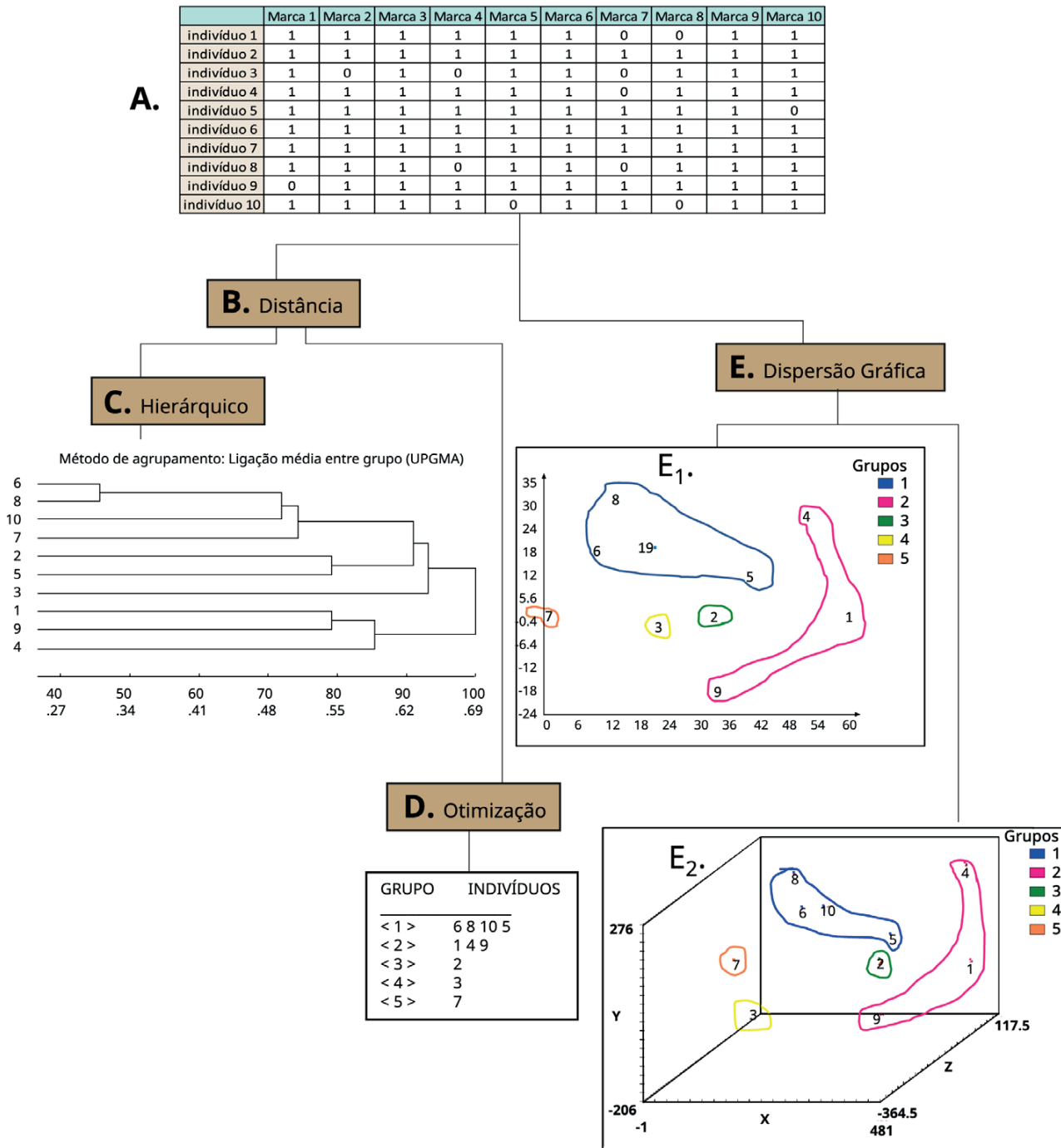
Dessa forma, com o uso dos marcadores dominantes, torna-se possível realizar o estudo da diversidade entre os indivíduos dentro da população. Na maioria das vezes, as populações avaliadas não estão estruturadas hierarquicamente, e as amostras são representações aleatórias da população. A partir desses marcadores, também é possível realizar estudos que buscam entender como os fatores evolutivos alteram a frequência gênica nas populações, uma vez que pode ser evidenciada pela variabilidade genotípica, e esta, por sua vez, pode ser predita por meio da diversidade genética avaliada numa população.

O professor Cosme Damião Cruz discute, em suas aulas de Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento

da Universidade Federal de Viçosa (UFV), o esquema apresentado na Figura 4. Nesse esquema, são representadas as etapas a serem adotadas para o estudo da diversidade genética a partir de marcadores dominantes. Após a análise das bandas polimórficas nos géis (Figura 4), é compilada a planilha da Figura 4. Nessa planilha, a presença da banda foi identificada com o numeral "1" e a ausência como "0". Entre os softwares apropriados para análises de diversidade genética, entre acessos a partir de marcas binárias, tem-se o Portal Genes (CRUZ, 2016) usado para a elaboração da Figura 4. Nele, pôde-se processar os dados para construir uma matriz de distância genética, com as dissimilaridades entre pares de indivíduos. Para o cálculo dessas dissimilaridades, devem-se escolher os índices apropriados de acordo com a importância da correspondência entre as bandas de diferentes indivíduos.

A análise da diversidade genética entre indivíduos dentro de uma mesma população é realizada por meio de estimativas de dissimilaridades genéticas oriundas de análises multivariadas, utilizando-se diferentes índices de similaridade e, findada essa etapa, podem-se adotar técnicas de agrupamento ou de projeção de medidas de dissimilaridade. Cruz, Ferreira e Pessoni (2020) trazem uma série de coeficientes de similaridades que foram descritos na literatura e recomendam que, para as análises de agrupamento, sejam empregados os índices de dissimilaridades. Os autores indicam, ainda, as fórmulas mais recomendadas para converter a similaridade à dissimilaridade. A escolha de qual índice de similaridade deve ser empregado fica a critério do pesquisador, uma vez que cada um apresenta características específicas.

## Como estudar a Diversidade Genética?



**Figura 4:** Diagrama de representação de “Como estudar a Diversidade Genética?”

Fonte: Aulas de Biometria aplicada ao estudo da Diversidade Genética (Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV)



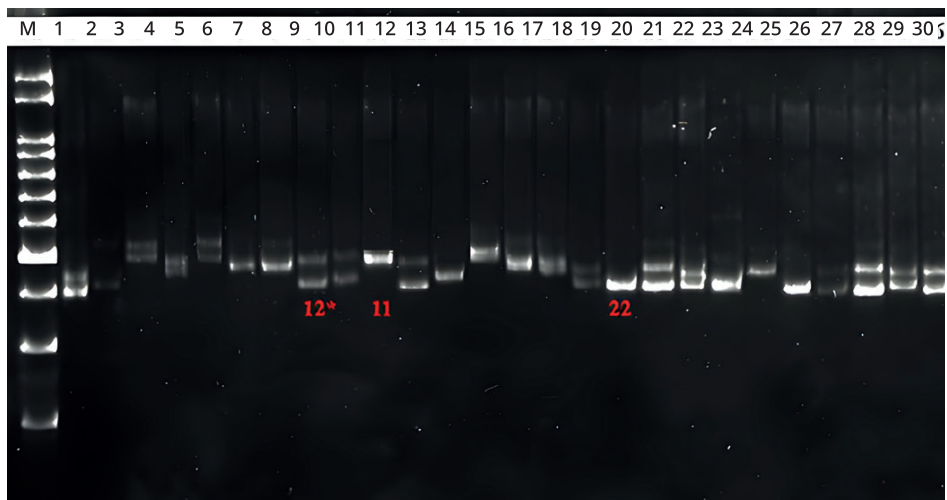
Para uma melhor visualização das medidas de distância entre os indivíduos, é possível empregar técnicas de agrupamento, também utilizadas para a elaboração da Figura 4 (CRUZ, 2016). Existem inúmeras técnicas de agrupamentos na literatura, e Cruz, Ferreira e Pessoni (2020) trazem uma explanação completa a respeito desses métodos. Aqui, serão abordadas três técnicas de agrupamentos que, apesar de poderem ser empregadas isoladamente, fornecem mais informações e permitem a testagem de hipóteses mais robustas através do uso conjunto.

Para a visualização de dendrogramas (porção C da Figura 4), devem-se escolher métodos hierárquicos, como o UPGMA. No dendrograma, as ramificações correspondem às distâncias entre os acessos. No dendrograma gerado na parte C, os indivíduos 6 e 8 apresentam maior similaridade, enquanto os indivíduos 1, 4 e 9, são os mais distantes dos demais. Entretanto, a visualização de grupos é mais clara perante a aplicação de métodos de agrupamentos de otimização (porção D). Nessa etapa, destaca-se o método de Tocher (RAO, 1952). A aplicação desse método na parte D gerou cinco grupos, sendo os indivíduos 5, 6, 8 e 10 alocados no primeiro grupo, os indivíduos 1, 4 e 9, no segundo e os indivíduos 2, 3 e 7 ficaram em grupos isolados, formando os grupos três, quatro e cinco, respectivamente. Vale destacar que a média das distâncias entre os indivíduos do mesmo grupo deve ser menor que a distância entre os grupos.

Uma forma que auxilia a visualizar a diversidade é a dispersão gráfica (porção E da Figura 4), podendo ser realizada de forma bidimensional (2D) (porção E1 da Figura 4) ou tridimensional

(3D) (porção E2 da Figura 4). O uso dessa metodologia associada às metodologias de agrupamento possibilita a alocação dos indivíduos, identificando a qual grupo pertencem. Dessa forma, é possível visualizar a dispersão dos grupos nos gráficos.

Em contrapartida, os marcadores codominantes, por serem capazes de discriminar o homocigoto dominante do heterocigoto, fornecem mais informações genéticas. Para codificação a partir do gel desses marcadores, o genótipo homocigoto dominante é codificado por 11, o heterocigoto por 12 e o homocigoto recessivo por 22 (Figura 5). Caso o marcador seja multialélico, basta acrescentar os números correspondentes ao número de cada alelo.



**Figura 5:** Gel fotodocumentado para 30 indivíduos da espécie *Dalbergia nigra*, expondo o genótipo dos indivíduos amostrados  
Fonte: Adelson Lemes da Silva Júnior, em 11/08/2020.

Vale ressaltar que as tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitam a genotipagem e a diferenciação de fragmentos que se divergem em apenas 1pb (par de base),

determinando o tamanho de cada alelo. Essa metodologia permite a obtenção de *loci* microssatélites com maior grau de polimorfismo e, também, a identificação dos homozigotos (por exemplo, alelos 0101 e 0202 ou 200/200 e 202/202 pb) e dos heterozigotos (por exemplo, alelos 0102 ou 200/202 pb).

Após a codificação dos géis ou via sequenciamento de marcadores codominantes, é possível obter a matriz de dissimilaridade e empregar técnicas de agrupamento ou de projeção de medidas de dissimilaridade, como orientado por Cruz, Ferreira e Pessoni (2020). Assim, pode-se estudar a diversidade genética dentro da população seguindo, basicamente, os passos da Figura 4, alterando os índices de similaridade e dissimilaridades para os parâmetros adequados. Entretanto, as informações obtidas por esses marcadores também podem ser empregadas para estimar a distância genética entre as populações. Cruz, Ferreira e Pessoni (2020) trazem diversos métodos para estimar a variação genética e conhecer a estrutura populacional, com aplicações variadas em níveis individual, intrapopulacional e interpopulacional.

Zanella e demais autores (2017) descrevem os procedimentos para geração, organização, análise e emprego desses marcadores microssatélites genotipados. Entre as análises que podem ser realizadas, esses autores descrevem as análises de diversidade genética, que possibilitam estimar parâmetros entre indivíduos de uma população, entre populações e entre espécies ou grupos espécies. Os marcadores microssatélites são rotineiramente usados para estudos da genética de populações naturais e filogeografia (MANGARAVITE et al., 2016; TÓTH et al., 2017), constituindo ferramentas importantes em

estratégias de conservação, bem como na biologia reprodutiva e na ecologia das espécies.

As estimativas da estrutura populacional dentro de uma espécie possibilitam estimar os níveis de fluxo gênico e dispersão entre populações, fornecem dados sobre a diferenciação genética dessas populações ao longo da distribuição geográfica do organismo e possibilitam a identificação de barreiras genéticas, migrantes, taxa de migração por geração, indivíduos miscigenados e zonas híbridas.

A partir do conhecimento dos genótipos dos indivíduos da população via marcadores codominantes, podem-se calcular as frequências alélicas. Entretanto, com a aplicação dos marcadores dominantes, só é possível calcular as frequências alélicas se for constatado que a população amostral se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Outras informações a respeito desses cálculos serão abordadas no próximo tópico.

### **Como conhecer a estrutura genética das populações**

Nos estudos de genética da conservação, é necessário entender a estrutura genética das populações em análise. Nesse sentido, a genética de populações traz medidas interessantes a serem empregadas na aplicação das leis da hereditariedade, como as de Mendel, e outros princípios da genética. Nessas análises, todos os genótipos individuais de uma população são considerados, e a probabilidade de cruzamentos entre eles corresponde à ocorrência desses genótipos na população. Assim, são estimados os descritores

genéticos básicos de uma população, permitindo entender a sua estruturação.

Além da estrutura genética, nos estudos da genética de populações, busca-se conhecer a dinâmica da variação genética dentro e entre populações, a fim de descobrir e entender os processos (migração, mutação, seleção, deriva genética, entre outros) que podem afetar a frequência dos alelos e os genótipos na população. Nesse sentido, a estrutura genética de uma população pode ser estudada a partir da aferição dos seus descritores básicos, que são as frequências alélicas ( $p$  e  $q$ ) e genotípicas ( $D$ ,  $H$  e  $R$ ) e seus comportamentos ao longo das gerações. Esses descritores genéticos básicos da população são variáveis bastante conectadas e fornecem uma medida matemática que quantifica a variação genética, possibilitando o estudo dos diferentes genótipos nas diferentes populações.

Por exemplo, a partir das análises do gel da Figura 5 e considerando que o marcador representa um gene ( $A$ ) (*loco*  $A$ ) com duas formas alélicas ( $A/a$ ), " $p$ " e " $q$ " e as frequências genotípicas observadas por " $D$ ", " $H$ ", e " $R$ ", obtém-se a Tabela 1:

Codificação	Genótipo correspondente	Número de indivíduos observados	Frequência genotípica	Frequência genotípica
11	AA	10	$D = N_{11}/N$	$D = 10/30 = 0,33$
12	Aa	13	$H = N_{12}/N$	$H = 13/30 = 0,44$
22	aa	7	$R = N_{22}/N$	$R = 7/30 = 0,23$
		30		1

**Tabela 1:** Frequência genotípica e alélica na população estudada pelo marcador do gel da Figura 5

Assim, obtêm-se as frequências alélicas:

$$f(A)=p=D+(1/2)H=0,33+(1/2)\times 0,44=0,55$$

$$f(a)=q=R+(1/2)H=0,23+(1/2)\times 0,44=0,45$$

$$p+q=1 \longrightarrow 0,55+0,45=1$$

Fonte: elaborado pelos autores.

Árvores filogenéticas de um grupo, seja populações ou espécies de parentesco próximo, podem ser construídas a partir das distâncias genéticas quantificadas por meio das frequências alélicas ou genotípicas obtidas a partir de diferentes marcadores moleculares (*locus*). Fatores genéticos e ambientais podem provocar o distanciamento genético ou aumentar a similaridade entre populações. Esse grau de diversidade pode ser avaliado também por medidas, como a heterozigosidade, grau de fixação e correlação intergenotípica.

Quando calculadas a partir de diferenças das frequências alélicas, as diferenças genéticas são pequenas entre as populações. Considerando apenas um *loco*, vale ressaltar que duas populações seriam mais distantes geneticamente quando uma população tiver as frequências alélicas de  $p=1$  e  $q=0$  e a outra população tiver  $p=0$  e  $q=1$ . Essa situação representa a fixação gênica, ou seja, indica que, para a primeira população, ocorreu a fixação do alelo A, e, para a segunda, do alelo a. Entretanto, o que encontramos na natureza são variações de  $p$  ( $0 \leq p \leq 1$ ) e  $q$  ( $0 \leq q \leq 1$ ).

A base da genética de populações é o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), o qual considera que, em uma população suficientemente grande e na ausência de seleção,

migração e mutação, o equilíbrio é atingido após uma geração de acasalamento ao acaso (“aaa”), de maneira que a relação genotípica se torna igual ao quadrado da frequência gênica e, com as sucessivas gerações de acasalamento ao acaso, permanece inalterada. No entanto, as populações naturais não atendem a esses pressupostos, pois o EHW é uma condição hipotética. Entretanto, esse conhecimento preditivo permite aos pesquisadores observar quais desvios estão ocorrendo e propor os possíveis fatores evolutivos envolvidos, reconhecendo, assim, a dinâmica evolutiva da espécie em determinadas regiões.

Para ilustrar o EHW, será considerada como população inicial a mesma da Tabela 1, com genótipos AA, Aa e aa, nas frequências D, H e R, respectivamente. As frequências alélicas são p e q para A e a, respectivamente. Considerando que ocorre acasalamento ao acaso entre os indivíduos dessa população, pode-se prever a descendência, conforme ilustrado na Tabela 2.

Para determinar se a população está ou não em equilíbrio de Hardy-Weinberg, é necessário aplicar testes estatísticos, como o clássico teste de qui-quadrado, o teste de razão de verossimilhança e o teste exato de Fisher (PONTES et al., 2020). Esses testes são aplicados comparando os valores genotípicos observados e esperados para testar a hipótese de nulidade.

Genótipo	Frequência genotípica observada	Frequência genotípica esperada	
AA	D = 0,33	$p^2 = (0,55)^2 = 0,30$	$p^2 + 2pq + q^2 = 1$
Aa	H = 0,24	$2pq = 2 \times 0,55 \times 0,25 = 0,50$	
aa	R = 0,23	$q^2 = (0,45)^2 = 0,20$	
		$f(A) = p_1 = p = 0,55$ $f(a) = q_1 = q = 0,45$	$p + q = 1$

**Tabela 2:** Frequência genotípica e alélica numa população em Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Fonte: elaborado pelos autores.

Se a hipótese de nulidade não for aceita, pode-se deduzir que os pressupostos de Hardy-Weinberg não estão sendo satisfeitos e que ocorrem desvios das expectativas. Todavia, dependendo de qual pressuposto não for satisfeito, esses desvios podem ou não ser estatisticamente detectáveis. São causas desses desvios: efeito Wahlund, fluxo gênico, mutações, acasalamento não aleatório, seleção ou deriva genética. Nesse sentido, as alterações das frequências alélicas e genotípicas e sua posterior quantificação auxiliam o entendimento dos possíveis fatores evolutivos atuantes. A ocorrência de acasalamento preferencial, por exemplo, altera apenas as frequências genotípicas relativas aos genes especificamente envolvidos, ao passo que a deriva genética é particularmente efetiva – e mais facilmente diagnosticada – em populações pequenas, e suas alterações não podem ser previstas.

Muitas vezes, desvios causados por seleção, fluxo gênico e mutações de qualquer natureza precisam de valores significativamente altos para serem detectados, o que enfraquece



o teste de desvios das proporções de Hardy-Weinberg para avaliação das mudanças em uma população. Oliveira, Santos e Cruz (2020) utilizaram os mapas auto-organizáveis de Kohonen (SOM), um tipo de rede neural, para perceber as variações que os fatores evolutivos causavam nas populações. Esses autores verificaram que o SOM é capaz de organizar as populações sob seleção, deriva genética, migração ou seleção divergente em grades, e que essa organização pode ser explicada pelas particularidades de cada fator evolutivo envolvido. Assim, esses autores verificaram que a metodologia foi eficiente para detectar essas alterações em 100 *loci* das populações avaliadas.

O número de *loci* abordados no trabalho de Oliveira, Santos e Cruz (2020) é oportuno, pois, quando se consideram as informações de vários *loci*, é possível obter informações de maior credibilidade sobre as reais condições da população em análise. Entretanto, ao avaliar um número maior de *loci*, outros efeitos devem ser levados em consideração: desequilíbrio de ligação, desequilíbrio de fase gamética e associação alélica (FLINT-GARCIA; THORNSBERRY; BUCKLER, 2003), que concernem à associação não aleatória de alelos de diferentes *loci* nos gametas. Esse fator se torna interessante ao observarmos que o conhecimento do desequilíbrio permite elucidar fenômenos genéticos e evolutivos ocorridos ao longo de gerações nas populações ou espécies (SANTOS; OLIVEIRA; SILVA, 2020).

Segundo Cruz, Ferreira e Pessoni (2020), a presença do desequilíbrio de ligação pode indicar que, apesar de a população ser panmítica, uma estratificação pode persistir dentro da

população, de forma que ainda permanece um conjunto gênico preferencial, derivado dos ancestrais, que subdivide a população e só gradualmente se homogeneizará. Essa homogeneização dependerá, principalmente, da taxa de recombinação entre os dois *loci*, podendo ser extremamente lenta, sobretudo entre os *loci* estreitamente ligados, mas não somente nessa condição. Assim, o equilíbrio de ligação, quando constatado, será indicativo de que a população já passou por sucessivos ciclos de acasalamentos ao acaso e se encontra livre de forças evolutivas.

Apesar de ser conhecida a existência de acasalamentos ao acaso, se o desequilíbrio de ligação é detectado, postula-se a hipótese de que alguns fatores evolutivos devem ter atuado e constituem elementos perturbadores em relação ao modelo de Hardy-Weinberg. Ainda que a quebra do isolamento ou que processos seletivos abranjam apenas uma geração, eles geram novos desequilíbrios gaméticos, que, por sua vez, podem, se entre *loci* próximos, persistir durante muitas gerações. Por isso, o grande interesse na avaliação dos desequilíbrios de ligação reside no fato de eles assinalarem retrospectivamente eventos de introdução de alelos e alteração nas suas frequências no passado da população (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2020).

Várias metodologias para estimar o desequilíbrio de ligação têm sido amplamente descritas em revisões, ao passo que mais explicações e exemplos sobre o desequilíbrio de ligação podem ser encontradas nos trabalhos de Santos, Oliveira e Silva (2020) e de Cruz, Ferreira e Pessoni (2020).

## **Desafios e perspectivas do uso da genética para a conservação**

A genética da conservação reúne informações das diferentes áreas da genética para identificar a diversidade e compreender a sua mudança ao longo da evolução. Assim, este capítulo abordou metodologias para acessar a variabilidade genética por meio do emprego de marcadores moleculares e, a partir deles, propor análises sobre a diversidade genética entre e dentro das populações. Entender a diversidade genética das populações torna-se importante na medida que permite supor os eventos evolutivos que ocorrem nessas populações e viabilizar o entendimento de como essas mudanças genéticas contribuem para a diferenciação das populações ao longo da distribuição temporal e geográfica.

Os estudos da genética de populações buscam conhecer a dinâmica da variação genética dentro e entre populações, a fim de descobrir e entender os processos (migração, mutação, seleção, deriva genética, entre outros) que podem afetar a frequência dos alelos e genótipos nas populações. O conhecimento gerado por esses estudos oportuniza delinear estratégias para a manutenção e sobrevivência da(s) espécie(s). Sem esse conhecimento, é possível afirmar que um número sem precedentes de espécies estaria em estado de vulnerabilidade ou até mesmo extinta.

Os mapas auto-organizáveis de Kohonen (SOM), um tipo de rede neural, vêm se destacando como uma ferramenta de análise que visa perceber as variações que os fatores evolutivos causavam nas populações. Oliveira, Santos e Cruz (2020)

verificaram que o SOM é capaz de organizar as populações sob seleção, deriva genética, migração ou seleção divergente em grades, e que essa organização pode ser explicada pelas particularidades de cada fator evolutivo envolvido. Entretanto, esses estudos foram realizados considerando marcadores codominantes.

Com relação aos marcadores dominantes, apesar de gerarem menos informações, ainda estão sendo empregados devido a seu baixo custo e generalidade, principalmente em espécies pouco exploradas e/ou com baixo interesse econômico. Assim, espera-se que o uso de marcadores codominantes se torne cada vez mais acessível, e as perspectivas são de que as tecnologias atuais e futuras de sequenciamento amplo do genoma permitirão o acesso cada vez mais rápido e abrangente das informações genéticas.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Atualização da lista oficial das espécies ameaçadas de extinção**. Itajaí, SC: CEPsul; ICMBIO/MMA, 2022. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/destaques-e-eventos/704-atualizacao-da-lista-oficial-das-especies-ameacadas-de-extincao.html>. Acesso em: 12 jan. 2023.
- CARVALHO, Ana Carla C. S. *et al.* Evidence of the mechanism of action of *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 374-378, mar. 2009.
- CRUZ, Cosme D.; FERREIRA, Fábio M.; PESSONI, Luiz A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 2. ed. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2020.
- DÍAZ-GARCÍA, Juan M. *et al.* Amphibian species and functional diversity as indicators of restoration success in tropical montane forest. **Biodivers. Conserv.**, v. 26, p. 2569-2589, 2017.
- EL-ESAWI, Mohamed A. Introductory Chapter: Assessment and Conservation of Genetic Diversity in Plant Species. *In*: EL-ESAWI, Mohamed A. **Genetic diversity in plant species: characterization and conservation**. London, UK: IntechOpen, 2019, p. 1-7. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/66748>. Acesso em: 27 set. 2022.
- FALEIRO, Fábio Gelape. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. *In*: FALEIRO Fábio G.; ANDRADE, Solange Rocha M.; JUNIOR, Fábio B. dos Reis. (ed.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011, p. 55-118.
- FERREIRA, Márcio E.; GRATTAPAGLIA, Dario. **Introducción al uso de marcadores moleculares em el análisis genético**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.

- FLINT-GARCIA, Sherry A.; THORNSBERRY, Jeffrey M.; BUCKLER IV Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Califórnia, v. 54, n. 1, p. 357-374, jun. 2003.
- GUIMARÃES, Cláudia T. *et al.* Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 24-33, nov./dez. 2009.
- HABEL, Jan C. *et al.* Global warming will affect the genetic diversity and uniqueness of *Lycaena helle* populations. **Global Change Biology**, v. 17, n. 1, p. 194-205, dez. 2011.
- HOFFMAN, Ary A.; SGRÒ, Carla M.; KRISTENSEN, Torsten N. Revisiting adaptive potential, population size, and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 32, n. 7, p. 506-517, jul. 2017.
- JANES, Jasmine K.; BATISTA, Philip D. The role of population genetic structure in understanding and managing pine beetles. **Advances in Insect Physiology**, v. 50, p. 76-100, dez. 2016.
- KAGEYAMA, Paulo Y.; GANDARA, Flávio B. Recuperação de áreas ciliares. *In*: RODRIGUES, Ricardo R.; LEITÃO-FILHO, Hermógenes F. (ed.). **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo: EDUSP, 2004, p. 249-269.
- LAIKRE, Linda. Genetic diversity is overlooked in international conservation policy implementation. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 349-354, fev. 2010.
- MAEBE, Kevin *et al.* Temporal drop of genetic diversity in *Bombus pauloensis*. **Apidologie**, v. 50, p. 526-537, jul. 2019.
- NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. **ASM Science Journal**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.
- OLIVEIRA, Marciane S.; SANTOS, Iara G.; CRUZ, Cosme D. Self-Organizing Maps: a powerful tool for capturing genetic diversity patterns of populations. **Euphytica**, v. 216, n. 49, p. 1-9, fev. 2020.

- PONTES, D. S. *et al.* Verificação das condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg. *In: OLIVEIRA, Marciane S.; CRUZ, Cosme D. (org.). **Genética de Populações com o Aplicativo GPOP.*** Curitiba, PR: Brazil Publishing, 2020. p. 119.
- RIBEIRO, Nathalia P. *et al.* Biodiversidade e conservação de recursos genéticos de espécies arbóreas. **Multitemas**, v. 21, n. 50, p. 31-49, jul./dez. 2016.
- SAHA, Dipnarayan *et al.* Genetic diversity in lac resin-secreting insects belonging to *Kerria* spp., as revealed through ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 2, p. 112-120, abr. 2011.
- SANTOS, Fabrício R. *et al.* Diversidade Genética. *In: Drumond GM; Martins CS; Greco MB, Vieira F. (org.). **Biota Minas: diagnóstico do conhecimento sobre a biodiversidade no estado de Minas Gerais** subsídio para o programa Biota Minas. 1 ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2009, v. 1, p. 389-410.*
- SANTOS, Iara G.; OLIVEIRA, Marciane S.; SILVA, M. J. Ligação e desequilíbrio de ligação. *In: OLIVEIRA, Marciane S.; CRUZ, Cosme D. (org.). **Genética de Populações com o Aplicativo GPOP.*** Curitiba, PR: Brazil Publishing, 2020. p. 141-168.
- SILVA JÚNIOR, Adelson L. *et al.* Genetic diversity of *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex. Ducke) Barneby, in a forest area in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1-10, set. 2017.
- SOL, Daniel. The future of biodiversity on Earth. **Mètode Science Studies Journal**, v. 10, p. 175-181, 2020.
- SOUZA, Lucimara C. *et al.* Genetic diversity of *Plathymentia reticulata* Benth. in fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1-13, set. 2017.
- STOWELL, Sierra M. L.; PINZONE, Cheryl A.; MARTIN, Andrew P. Overcoming barriers to active interventions for genetic diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, n. 8, p. 1753-1765, jul. 2017.

- TEMPLETON, Alan R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. Tradução de Reinaldo Alves de Brito. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2011.
- TÓTH, Endre G. *et al.* Evolutionary history and phylogeography of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Europe based on molecular markers. **Journal of Forestry Research**, v. 28, n. 4, p. 637-651, abr. 2017.
- TURCHETTO-ZOLET, Andreia C. *et al.* (org.). **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.
- VIEIRA, Alessandra A. Rodrigues *et al.* Diversity and genetic structure of *Astronium concinnum* Schott ex Spreng. in conservation units. **Plant Genetic Resources**, v. 16, n. 6, p. 530-537, dez. 2022.
- ZANELLA, Camila M. *et al.* Microssatélites: Metodologias de identificação e análise. *In*: TURCHETTO-ZOLET, Andreia C. *et al.* **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2017, p. 94-117.
- WOODCOCK, Ben A. *et al.* Meta-analysis reveals that pollinator functional diversity and abundance enhance crop pollination and yield. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-10, mar. 2019.