

Efeito da paisagem na diversidade e diferenciação genética das populações*

Esta atividade busca auxiliar o ensino de Ecologia Molecular, Genética da Conservação e Genética de Populações avaliando o efeito de características da paisagem sobre a diversidade, endogamia e a diferenciação genética em espécies de animais. A atividade pode ser utilizada em aula prática ou como atividade complementar de aula expositiva para alunos do ensino superior.

FUNÇÃO PEDAGÓGICA

Matriz é a cobertura de fundo numa paisagem, ou seja, todos os elementos de uma paisagem excluindo o habitat da espécie.

Paisagem pode ser caracterizada como uma área espacialmente distinta, formada por fragmentos de habitat, corredores entre fragmentos de habitat e a matriz.

Marcador Molecular é qualquer dado molecular herdável capaz de evidenciar polimorfismo genético entre indivíduos. Pode ser um fragmento de DNA ou uma proteína.

A principal função desta atividade é apresentar aos estudantes de ensino superior a área de genética na escala de paisagem que estuda como as características da paisagem podem influenciar a diversidade e diferenciação genética de populações naturais. Para esta finalidade, os alunos precisarão utilizar **marcadores moleculares** para estimar parâmetros genéticos em populações de duas espécies distintas em

duas diferentes paisagens. Posteriormente, comparando os parâmetros genéticos, poderão determinar como diferentes tipos de **matrizes** afetam as duas espécies. Dessa forma, os discentes terão a oportunidade de relacionar conceitos e metodologias de Genética de Populações e Ecologia. A atividade pode ser utilizada como simulação de aula prática ou como uma atividade complementar à aula expositiva para alunos de ensino superior.

Jacqueline de Souza Lima^{1,2}; Monik Oprea^{1,3}; Rosane Garcia Collevatti¹

¹ Laboratório de Genética & Biodiversidade, ICB, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia.

² Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, ICB, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia.

³ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, ICB, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia.

Autor para correspondência: rosanegc68@hotmail.com

*Material didático desenvolvido na disciplina de Ecologia Molecular, coordenado pela Profa. Rosane Garcia Collevatti, do curso de graduação em Ecologia e Análise Ambiental do Departamento de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, como uma atividade do Estágio Docência (bolsistas CAPES/UFG) da discente do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução.

PROBLEMA PROPOSTO

O processo de ocupação humana fez com que inúmeras áreas de vegetação nativa fossem reduzidas a pequenos fragmentos isolados, isto é, formaram-se pequenas áreas de vegetação nativa embebidas em matriz de plantações, pastagens e áreas urbanas. A perda de habitat e a **fragmentação** reduzem a **conectividade** da paisagem, afetando a mobilidade e a dispersão das espécies animais impedindo o movimento dos organismos (p.e. PUTTKER *et al.*, 2011) e colocando em risco a manutenção da variação genética e persistência das populações (LYNCH *et al.*, 1995). Além disso, diferentes matrizes como as plantações, pastagens e áreas urbanas apresentam propriedades distintas à dispersão dos diferentes organismos, ou seja, diferentes resistências, restringindo de forma diferente o fluxo gênico das espécies. A restrição à dispersão e ao fluxo gênico faz com que populações pequenas e isoladas sejam susceptíveis à perda de variação genética por deriva genética (KEYGHOBADI, 2007). Portanto, o desafio atual é desenvolver estratégias para evitar a perda de uma parcela importante da biodiversidade global devido, principalmente, ao aumento acelerado das atividades humanas. Entender como a paisagem afeta processos microevolutivos, como fluxo gênico e deriva genética é o principal objetivo da genética na escala da paisagem (MANEL *et al.*, 2003).

No problema proposto nesta atividade, consideramos duas paisagens: uma contínua e outra fragmentada, que foi desmatada para plantio de soja (Painel 1). Com o objetivo de verificar como os diferentes tipos de paisagem afetam a diversidade genética, a diferenciação genética e a endogamia entre populações de mamíferos com diferentes capacidades de dispersão, um grupo de pesquisadores estudou duas espécies: um marsupial, *Caluromys philander*, e um morcego, *Artibeus lituratus*. Como as duas espécies possuem diferentes capacidades de dispersão, os diferentes tipos de paisagem apresentam resistências distintas à passagem de indivíduos de cada espécie entre os fragmentos que podem ser medidas pela **resistência de matriz**. Existem diferentes maneiras para calcular a resistência de uma matriz para uma espécie. Neste traba-

lho foi usado o método proposto por Mühlner *et al.* (2010) que consiste em atribuir notas às matrizes por especialistas no grupo taxonômico estudado, baseado na maior ou menor dificuldade da espécie em dispersar através das matrizes. *Caluromys philander* é uma espécie de gambá arborícola que possui capacidade de dispersão limitada, no máximo 1.000 metros e tem maior dificuldade em dispersar em áreas abertas sem florestas. *Artibeus lituratus* é um morcego frugívoro que, por sua grande capacidade de voo, consegue dispersar a distâncias de até 100 km com menor dificuldade em dispersar em áreas abertas.

Na paisagem fragmentada, que possui dois fragmentos de floresta, foi coletada uma população de cada espécie em cada fragmento. Na paisagem contínua foram coletadas duas populações em duas localidades distintas (Painel 1). Em cada população foram coletadas amostras de tecidos de dez indivíduos de cada espécie para extrair DNA e estudar o efeito da matriz sob os parâmetros genéticos: diversidade e diferenciação genética e endogamia. A partir do DNA obtido dos tecidos dos indivíduos, foram obtidos os **genótipos** para uma região **microsatélite** para estimar os parâmetros genéticos das populações para cada paisagem. Estas informações servirão de base para que os pesquisadores verifiquem como os diferentes tipos de paisagem e tipos de dispersão das espécies afetam sua diversidade, diferenciação genética e endogamia, e quais as possíveis consequências para a conservação das espécies. Para isto é preciso:

1. Obter os genótipos dos 10 indivíduos de cada população das duas espécies, nas diferentes paisagens, utilizando um locus microsatélite.
2. Calcular as frequências alélicas para estimar a diversidade genética, utilizando a heterozigosidade esperada (H_e) sob as condições de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e estimar a heterozigosidade observada (H_o).

3. Obter os valores do índice de endogamia (f) de cada população e de diferenciação genética entre populações de cada paisagem (F_{ST}).

Fragmentação é o processo que reduz o habitat a parcelas menores e desconectadas, os fragmentos.

Conectividade é a continuidade espacial de um tipo de vegetação em uma paisagem que permite a dispersão das espécies.

Genótipo é a constituição genética de uma célula ou indivíduo para um ou mais loci.

Microsatélite são sequências de 1 a 4 nucleotídeos de comprimento que são repetidas sequencialmente no genoma. Por exemplo: (GC)₃₀ representa uma sequência de 30 repetições dos nucleotídeos guanina (G) e citosina (C).

Resistência da Matriz é o nível de dificuldade que a matriz impõe à movimentação ou dispersão de um organismo.

4. Comparar os valores estimados com os tipos de paisagem e valores de resistência de matriz das diferentes espécies e interpretar os resultados observados.

INSTRUÇÕES PARA O PROFESSOR

1. Esta atividade poderá ser realizada individualmente, ou em grupos de alunos de no máximo quatro pessoas. Uma possibilidade é dividir os grupos de alunos por espécie de mamífero estudado.
2. Cada grupo deverá receber o problema proposto, uma cópia do procedimento para realizar a atividade, uma cópia de cada painel e das questões para serem discutidas.

É recomendável que o professor aplique esta atividade em turmas que já tiveram contato prévio com os conceitos de ecologia, marcadores moleculares e genética de populações.

PROCEDIMENTO PARA OS ESTUDANTES

1. Ler com atenção o problema proposto.

2. Analisar:
 - ♦ O Painel 1 - Paisagens contínua e fragmentada com matriz de plantação de soja.
 - ♦ A Tabela 1 - Resistências de matriz para as espécies *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus*.
 - ♦ Notar que as diferentes paisagens possuem resistências distintas à dispersão das duas espécies de mamíferos. Quanto maior o valor, maior a resistência da matriz, ou seja, maior o nível de dificuldade para a dispersão da espécie.

3. Analisar o Painel 2 - Representação esquemática dos géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata com os genótipos para um locus microsatélite da espécie *Caluromys philander*. Para obtenção dos genótipos, compare os alelos de cada indivíduo (banda preta) com os da escada alélica (M, bandas vermelhas) e denomine os alelos dos indivíduos de forma que correspondam aos nomes dos alelos da escada alélica. Anotar os genótipos na Tabela 2.

4. Comparar os valores estimados com os tipos de paisagem e valores de resistência de matriz das diferentes espécies e interpretar os resultados observados.

4. Analisar o Painel 3 - Representação esquemática dos géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata com os genótipos para um locus microsatélite da espécie *Artibeus lituratus*. Para obtenção dos genótipos, compare os alelos de cada indivíduo (banda preta) com os da escada alélica (M, bandas vermelhas) e denomine os alelos dos indivíduos de forma que correspondam aos nomes dos alelos da escada alélica. Anotar os genótipos na Tabela 3.
5. A partir dos genótipos obtidos, calcular as frequências alélicas para cada um dos quatro alelos (A1, A2, A3 e A4) presentes no locus microsatélite para *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus*, utilizando a equação:

$$f(A_i) = n_i/nt$$

Sendo:

n_i – número de alelos i presentes nos 10 indivíduos

nt – número total de alelos em todos os 10 indivíduos

Anotar as frequências estimadas das duas espécies na Tabela 4.

6. Estimar a heterozigosidade esperada (H_e) sob as condições de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (diversidade genética), para o locus microsatélite para *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus*, utilizando a equação:

$$H_e = 2pq + 2pr + 2ps + 2qr + 2qs + 2rs$$

Sendo p , q , r e s as frequências de cada um dos quatro alelos (A1, A2, A3 e A4, respectivamente) presentes no locus microsatélite. Anotar os valores de diversidade genética das duas espécies na Tabela 5.

7. Estimar a heterozigosidade observada (H_o), para o locus microsatélite para *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus*, utilizando a equação:

$$H_o = \frac{H_{obs}}{N}$$

sendo:

H_{obs} - número de genótipos heterozigotos observados nos 10 indivíduos

N - número total de genótipos avaliados. Anotar os valores de heterozigosidade observada das duas espécies na Tabela 5.

8. Estimar o coeficiente de endogamia (f) para *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus*, utilizando a equação:

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e}, \text{ onde}$$

H_e : Heterozigosidade esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg;

H_o : Heterozigosidade observada

Anotar os valores do coeficiente de endogamia das duas espécies na Tabela 5.

9. Estimar a diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações de cada paisagem para *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus*, utilizando a equação:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}, \text{ onde}$$

H_T = heterozigosidade total esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada paisagem,

$$H_T = \sum 1 - (p^2 + q^2 + r^2 + s^2)$$

Sendo p, q, r e s as frequências de cada um dos quatro alelos (A1, A2, A3 e A4, respectivamente) presentes no locus microssatélite. Neste caso, as frequências alélicas devem ser calculadas considerando as duas populações de cada paisagem como uma só população.

H_s = heterozigosidade esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg média entre fragmentos,

$$H_s = \frac{H_{e1} \cdot N_1 + H_{e2} \cdot N_2}{2}$$

Onde H_e - Heterozigosidade esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, para cada população em cada paisagem.

Anotar os valores de heterozigosidade (H_T e H_s) e diferenciação genética (F_{ST}) na Tabela 6.

10. Comparar com os valores de diversidade genética e endogamia das populações em cada paisagem (Tabela 6) e a diferenciação genética entre populações com os valores resistência de matriz (Tabela 1) para as duas espécies.

ENTENDENDO A ATIVIDADE

Questão 1. Pode-se afirmar que a resistência de matriz interfere na diversidade genética (H_e), na diferenciação genética (F_{ST}) e na endogamia (f) nas duas espécies? Explique, comparando os valores dos parâmetros genéticos das Tabelas 5 e 6 com os valores de resistência de matriz da Tabela 1.

Questão 2. Comparando o tipo de dispersão das duas espécies, discuta o efeito da paisagem sobre a diversidade genética (H_e), a diferenciação genética (F_{ST}) e a endogamia (f) nas duas espécies. Qual espécie foi mais afetada? Explique.

Questão 3. Qual a vantagem em usar marcadores moleculares microssatélites na avaliação do efeito da fragmentação?

Questão 4. Qual a importância da avaliação da paisagem e dispersão das espécies para as estratégias de manejo e conservação das populações?



TABELAS

Tabela 1.

Resistência de matriz para as espécies *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus*.

Espécie	Paisagem Contínua	Paisagem Fragmentada
<i>Caluromys philander</i>	2	9
<i>Artibeus lituratus</i>	1	4

Tabela 2.

Genótipos dos indivíduos de *Caluromys philander* pertencentes às duas populações nas paisagens contínua e fragmentada.

Contínua				Fragmentada			
Ponto 01		Ponto 02		Fragmento 01		Fragmento 02	
Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo
Ind01		Ind01		Ind01		Ind01	
Ind02		Ind02		Ind02		Ind02	
Ind03		Ind03		Ind03		Ind03	
Ind04		Ind04		Ind04		Ind04	
Ind05		Ind05		Ind05		Ind05	
Ind06		Ind06		Ind06		Ind06	
Ind07		Ind07		Ind07		Ind07	
Ind08		Ind08		Ind08		Ind08	
Ind09		Ind09		Ind09		Ind09	
Ind10		Ind10		Ind10		Ind10	

Tabela 3.

Genótipos dos indivíduos de *Artibeus lituratus* pertencentes às duas populações nas paisagens contínua e fragmentada.

Contínua				Fragmentada			
Ponto 01		Ponto 02		Fragmento 01		Fragmento 02	
Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo
Ind01		Ind01		Ind01		Ind01	
Ind02		Ind02		Ind02		Ind02	
Ind03		Ind03		Ind03		Ind03	
Ind04		Ind04		Ind04		Ind04	
Ind05		Ind05		Ind05		Ind05	
Ind06		Ind06		Ind06		Ind06	
Ind07		Ind07		Ind07		Ind07	
Ind08		Ind08		Ind08		Ind08	
Ind09		Ind09		Ind09		Ind09	
Ind10		Ind10		Ind10		Ind10	

Alelo	Espécie	Paisagem Contínua		Paisagem Fragmentada	
		Ponto 1	Ponto 2	Fragmento 1	Fragmento 2
A1	<i>C. philander</i>				
A2	<i>C. philander</i>				
A3	<i>C. philander</i>				
A4	<i>C. philander</i>				
A1	<i>A. lituratus</i>				
A2	<i>A. lituratus</i>				
A3	<i>A. lituratus</i>				
A4	<i>A. lituratus</i>				

Tabela 4. Frequências alélicas de *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus* nas duas populações nas paisagens contínua e fragmentada.

Espécie	Paisagem Contínua						Paisagem Fragmentada					
	Ponto 1			Ponto 2			Fragmento 1			Fragmento 2		
	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>	<i>f</i>									
<i>Caluromys philander</i>												
<i>Artibeus lituratus</i>												

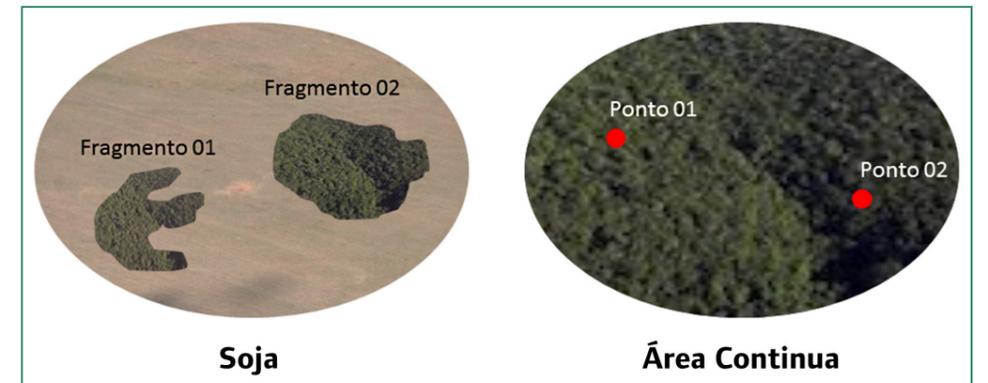
Tabela 5. Estimativas dos valores de diversidade genética (*H_e*, heterozigosidade esperada), heterozigosidade observada (*H_o*) e coeficiente de endogamia (*f*) para *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus* nas duas populações nas paisagens contínua e fragmentada.

	Paisagem Contínua			Paisagem Fragmentada		
	<i>H_s</i>	<i>H_T</i>	<i>F_{ST}</i>	<i>H_s</i>	<i>H_T</i>	<i>F_{ST}</i>
<i>Caluromys philander</i>						
<i>Artibeus lituratus</i>						

Tabela 6. Estimativas dos valores médios de diversidade genética (*H_s*, heterozigosidade esperada média entre fragmentos), *H_T* (heterozigosidade esperada total) e *F_{ST}* (coeficiente de diferenciação genética) das espécies *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus* nas duas populações das paisagens contínua e fragmentada.

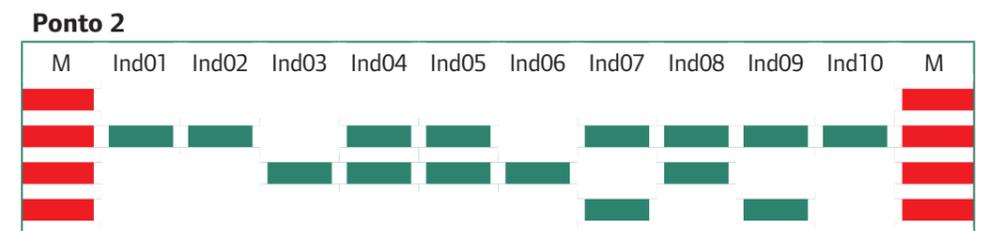
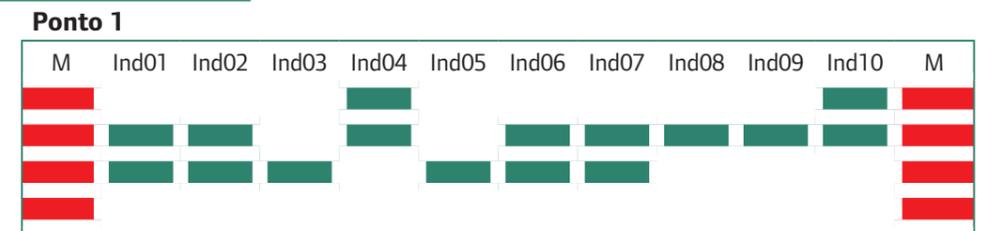
PAINÉIS

Painel 1. Paisagens contínua e fragmentada com matriz de plantação de soja. Na paisagem fragmentada foi coletada uma população por fragmento. Na paisagem contínua foram coletadas duas populações, uma no ponto 01 e outra no ponto 02.

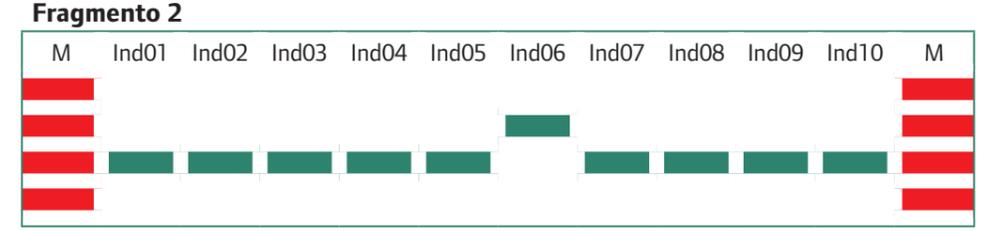
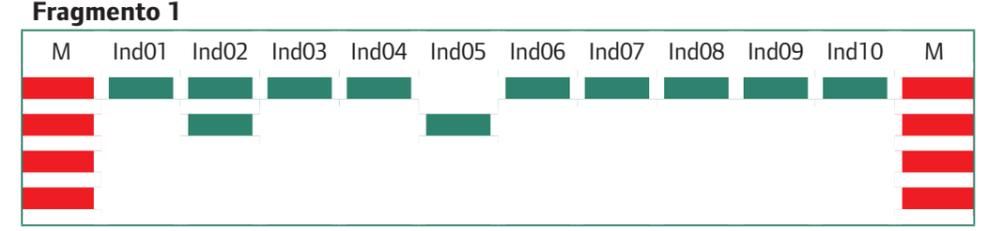


Painel 2. Representação esquemática dos géis de poliacrilamida, corados com nitrato de prata com os genótipos para um locus microssatélite de *Caluromys philander*, para as duas populações nas paisagens contínua e fragmentada. M, escada alélica para determinação dos alelos.

Painel 2.1. Representação esquemática de gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata com os genótipos para um locus microssatélite de *Caluromys philander*, para as duas populações da paisagem contínua. M, escada alélica para determinação dos alelos.



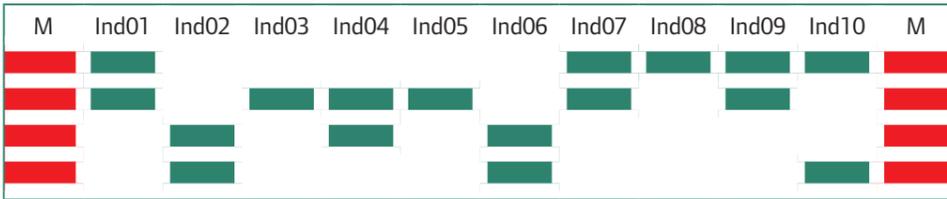
Painel 2.2. Representação esquemática de gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata com os genótipos para um locus microssatélite de *Caluromys philander*, para as duas populações da paisagem fragmentada. M, escada alélica para determinação dos alelos.



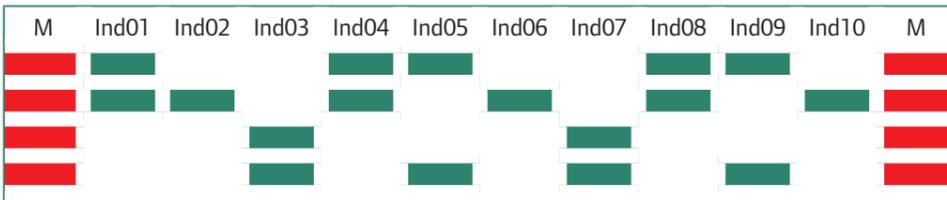
Painel 3.

Representação esquemática dos géis de poliacrilamida, corados com nitrato de prata com os genótipos para um locus microssatélite de *Artibeus lituratus*, para as duas populações das paisagens contínua e fragmentada. M, escada alélica para determinação dos alelos.

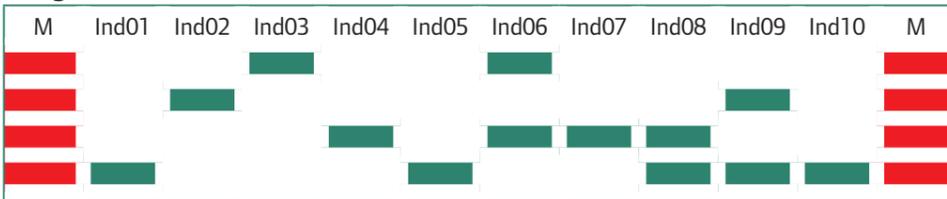
Ponto 1



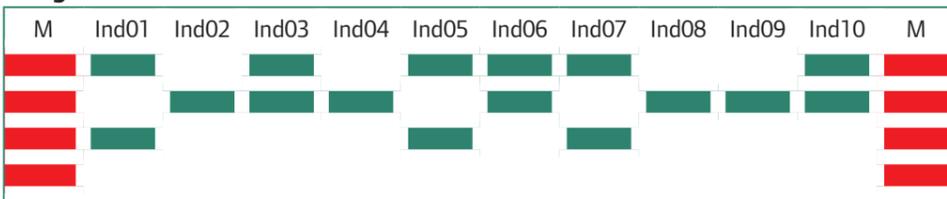
Ponto 2



Fragmento 1



Fragmento 2



Painel 3.1.

Representação esquemática do gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata com os genótipos para um locus microssatélite de *Artibeus lituratus*, para as duas populações da paisagem contínua. M, escada alélica para determinação dos alelos.

Painel 3.2.

Representação esquemática do gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata com os genótipos para um locus microssatélite de *Artibeus lituratus*, para as duas populações da paisagem fragmentada. M, escada alélica para determinação dos alelos.



RESPOSTAS

Tabela 2.

Genótipos dos indivíduos de *Caluromys philander* pertencentes às duas populações nas paisagens contínua e fragmentada.

Contínua				Fragmentada			
Ponto 01		Ponto 02		Fragmento 01		Fragmento 02	
Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo
Ind01	A2A3	Ind01	A2A2	Ind01	A1A1	Ind01	A3A3
Ind02	A2A3	Ind02	A2A2	Ind02	A2A1	Ind02	A3A3
Ind03	A3A3	Ind03	A3A3	Ind03	A1A1	Ind03	A3A3
Ind04	A1A2	Ind04	A2A3	Ind04	A1A1	Ind04	A3A3
Ind05	A3A3	Ind05	A2A3	Ind05	A2A2	Ind05	A3A3
Ind06	A2A3	Ind06	A3A3	Ind06	A1A1	Ind06	A2A2
Ind07	A2A3	Ind07	A2A4	Ind07	A1A1	Ind07	A3A3
Ind08	A2A2	Ind08	A2A3	Ind08	A1A1	Ind08	A3A3
Ind09	A2A2	Ind09	A2A4	Ind09	A1A1	Ind09	A3A3
Ind10	A1A2	Ind10	A2A2	Ind10	A1A1	Ind10	A3A3

Cálculo das frequências alélicas, da heterozigosidade esperada (H_e) sob EHW, heterozigosidade observada (H_o) e coeficientes de endogamia (f) de *C. philander*

Ponto 01 (Paisagem Contínua):

- Calcular as frequências alélicas

$$n(A1) = 2$$

$$n(A2) = 10$$

$$n(A3) = 8$$

$$n(A4) = 0$$

$$nt = 2 + 10 + 8 + 0 = 20$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 2/20 = 0,1$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 10/20 = 0,5$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 8/20 = 0,4$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 0/20 = 0$$

- Calcular a heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e):

$$H_e = 2pq + 2pr + 2ps + 2qr + 2qs + 2rs$$

$$H_e = 2(0,1*0,5) + 2(0,1*0,4) + 2(0,1*0) + 2(0,5*0,4) + 2(0,5*0) + 2(0,4*0)$$

$$H_e = 0,58$$

- Calcular a heterozigosidade observada (H_o):

$$H_o = f(A_i A_j) / f(A_i A_i)$$

$$H_o = 6/10$$

$$H_o = 0,6$$

- Calcular o coeficiente de endogamia (f):

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e} \rightarrow f = \frac{0,58 - 0,6}{0,58} \rightarrow f = -0,03$$

Ponto 02 (Paisagem Contínua):

- Calcular as frequências alélicas

$$n(A1) = 0$$

$$n(A2) = 11$$

$$n(A3) = 7$$

$$n(A4) = 2$$

$$nt = 0 + 11 + 7 + 2 = 20$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 0/20 = 0$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 11/20 = 0,55$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 7/20 = 0,35$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 2/20 = 0,1$$

♦ Calcular a heterozigiosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e):

$$H_e = 2pq + 2pr + 2ps + 2qr + 2qs + 2rs$$

$$H_e = 2(0,0 \cdot 0,55) + 2(0 \cdot 0,35) + 2(0 \cdot 0,1) + 2(0,55 \cdot 0,35) + 2(0,55 \cdot 0,1) + 2(0,35 \cdot 0,1)$$

$$H_e = 0,56$$

♦ Calcular a heterozigiosidade observada (H_o):

$$H_o = f(A_i A_j) / f(A_i A_i)$$

$$H_o = 6/10$$

$$H_o = 0,6$$

♦ Calcular o coeficiente de endogamia (f):

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e} \rightarrow f = \frac{0,56 - 0,6}{0,56} \rightarrow f = -0,06$$

Fragmento 01 (Paisagem Fragmentada):

♦ Calcular as frequências alélicas

$$n(A1) = 17$$

$$n(A2) = 3$$

$$n(A3) = 0$$

$$n(A4) = 0$$

$$nt = 17 + 3 = 20$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 17/20 = 0,85$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 3/20 = 0,15$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 0/20 = 0$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 0/20 = 0$$

♦ Calcular a heterozigiosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e):

$$H_e = 2pq + 2pr + 2ps + 2qr + 2qs + 2rs$$

$$H_e = 2(0,85 \cdot 0,15) + 2(0,85 \cdot 0) + 2(0,85 \cdot 0) + 2(0,15 \cdot 0) + 2(0,15 \cdot 0) + 2(0 \cdot 0)$$

$$H_e = 0,25$$

♦ Calcular a heterozigiosidade observada (H_o):

$$H_o = f(A_i A_j) / f(A_i A_i)$$

$$H_o = 1/10$$

$$H_o = 0,1$$

♦ Calcular o coeficiente de endogamia (f):

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e} \rightarrow f = \frac{0,25 - 0,1}{0,25} \rightarrow f = 0,60$$

Fragmento 02 (Paisagem Fragmentada):

♦ Calcular as frequências alélicas

$$n(A1) = 0$$

$$n(A2) = 2$$

$$n(A3) = 18$$

$$n(A4) = 0$$

$$nt = 2 + 18 = 20$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 0/20 = 0$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 2/20 = 0,1$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 18/20 = 0,9$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 0/20 = 0$$

♦ Calcular a heterozigiosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e):

$$H_e = 2pq + 2pr + 2ps + 2qr + 2qs + 2rs$$

$$H_e = 2(0 \cdot 0,1) + 2(0 \cdot 0,9) + 2(0 \cdot 0) + 2(0,1 \cdot 0,9) + 2(0,1 \cdot 0) + 2(0,9 \cdot 0)$$

$$H_e = 0,18$$

♦ Calcular a heterozigiosidade observada (H_o):

$$H_o = f(A_i A_j) / f(A_i A_i)$$

$$H_o = 1/10$$

$$H_o = 0,1$$

♦ Calcular o coeficiente de endogamia (f):

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e} \rightarrow f = \frac{0,18 - 0,1}{0,18} \rightarrow f = 0,44$$

Tabela 3.

Genótipos dos indivíduos de *Artibeus lituratus* pertencentes às duas populações nas paisagens contínua e fragmentada.

Contínua				Fragmentada			
Ponto 01		Ponto 02		Fragmento 01		Fragmento 02	
Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo	Indivíduo	Genótipo
Ind01	A1A2	Ind01	A1A2	Ind01	A4A4	Ind01	A1A3
Ind02	A3A4	Ind02	A2A2	Ind02	A2A2	Ind02	A2A2
Ind03	A2A2	Ind03	A3A4	Ind03	A1A1	Ind03	A1A2
Ind04	A2A3	Ind04	A1A2	Ind04	A3A3	Ind04	A2A2
Ind05	A2A2	Ind05	A1A4	Ind05	A4A4	Ind05	A1A3
Ind06	A3A4	Ind06	A2A2	Ind06	A1A3	Ind06	A1A2
Ind07	A1A2	Ind07	A3A4	Ind07	A4A4	Ind07	A1A3
Ind08	A1A1	Ind08	A1A2	Ind08	A3A4	Ind08	A2A2
Ind09	A1A2	Ind09	A1A4	Ind09	A2A4	Ind09	A2A2
Ind10	A1A4	Ind10	A2A2	Ind10	A4A4	Ind10	A2A3

Cálculo das frequências alélicas, da heterozigiosidade esperada (H_e) sob EHW, heterozigiosidade observada (H_o) e coeficientes de endogamia (f) de *A. lituratus*.

Ponto 01 (Paisagem Contínua):

♦ Calcular as frequências alélicas

$$n(A1) = 6$$

$$n(A2) = 8$$

$$n(A3) = 3$$

$$n(A4) = 3$$

$$nt = 6 + 8 + 3 + 3 = 20$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 6/20 = 0,30$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 8/20 = 0,40$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 3/20 = 0,15$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 3/20 = 0,15$$

♦ Calcular a heterozigiosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e):

$$H_e = 2pq + 2pr + 2ps + 2qr + 2qs + 2rs$$

$$H_e = 2(0,30 \cdot 0,40) + 2(0,30 \cdot 0,15) + 2(0,30 \cdot 0,15) + 2(0,40 \cdot 0,15) + 2(0,40 \cdot 0,15) + 2(0,15 \cdot 0,15)$$

$$H_e = 0,70$$

♦ Calcular a heterozigiosidade observada (H_o):

$$H_o = f(A_i A_j) / f(A_i A_i)$$

$$H_o = 7/10$$

$$H_o = 0,7$$

♦ Calcular o coeficiente de endogamia (f):

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e} \rightarrow f = \frac{0,70 - 0,7}{0,70} \rightarrow f = 0,007$$

Ponto 02 (Paisagem Contínua):

♦ Calcular as frequências alélicas

$$n(A1) = 5$$

$$n(A2) = 9$$

$$n(A3) = 2$$

$$n(A4) = 4$$

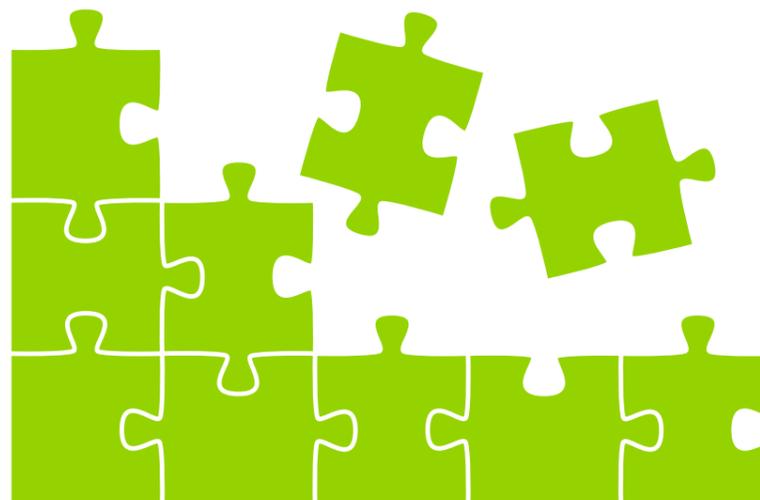
$$nt = 5 + 9 + 2 + 4 = 20$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 5/20 = 0,25$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 9/20 = 0,45$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 2/20 = 0,10$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 4/20 = 0,20$$



♦ Calcular a heterozigiosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e):

$$H_e = 2pq + 2pr + 2ps + 2qr + 2qs + 2rs$$

$$H_e = 2(0,25 \cdot 0,45) + 2(0,25 \cdot 0,10) + 2(0,25 \cdot 0,20) + 2(0,45 \cdot 0,10) + 2(0,45 \cdot 0,20) + 2(0,10 \cdot 0,20)$$

$$H_e = 0,68$$

♦ Calcular a heterozigiosidade observada (H_o):

$$H_o = f(A_i A_j) / f(A_i A_i)$$

$$H_o = 7/10$$

$$H_o = 0,7$$

♦ Calcular o coeficiente de endogamia (f):

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e} \rightarrow f = \frac{0,68 - 0,7}{0,68} \rightarrow f = -0,02$$

Fragmento 01 (Paisagem Fragmentada):

♦ Calcular as frequências alélicas

$$n(A1) = 3$$

$$n(A2) = 3$$

$$n(A3) = 4$$

$$n(A4) = 10$$

$$nt = 3 + 3 + 4 + 10 = 20$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 3/20 = 0,15$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 3/20 = 0,15$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 4/20 = 0,20$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 10/20 = 0,50$$

♦ Calcular a heterozigiosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e):

$$H_e = 2pq + 2pr + 2ps + 2qr + 2qs + 2rs$$

$$H_e = 2(0,15 \cdot 0,15) + 2(0,15 \cdot 0,20) + 2(0,15 \cdot 0,50) + 2(0,15 \cdot 0,20) + 2(0,15 \cdot 0,50) + 2(0,20 \cdot 0,15)$$

$$H_e = 0,66$$

♦ Calcular a heterozigiosidade observada (H_o):

$$H_o = f(A_i A_j) / f(A_i A_i)$$

$$H_o = 4/10$$

$$H_o = 0,4$$

♦ Calcular o coeficiente de endogamia (f):

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e} \rightarrow f = \frac{0,66 - 0,4}{0,66} \rightarrow f = 0,39$$

Fragmento 02 (Paisagem Fragmentada):

♦ Calcular as frequências alélicas

$$n(A1) = 5$$

$$n(A2) = 11$$

$$n(A3) = 4$$

$$n(A4) = 0$$

$$nt = 5 + 11 + 4 + 0 = 20$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 5/20 = 0,25$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 11/20 = 0,55$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 4/20 = 0,20$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 0/20 = 0$$

♦ Calcular a heterozigiosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e):

$$H_e = 2pq + 2pr + 2ps + 2qr + 2qs + 2rs$$

$$H_e = 2(0,25 \cdot 0,55) + 2(0,25 \cdot 0,20) + 2(0,25 \cdot 0) + 2(0,55 \cdot 0,20) + 2(0,55 \cdot 0) + 2(0,20 \cdot 0)$$

$$H_e = 0,59$$

♦ Calcular a heterozigiosidade observada (H_o):

$$H_o = f(A_i A_j) / f(A_i A_i)$$

$$H_o = 4/10$$

$$H_o = 0,4$$

♦ Calcular o coeficiente de endogamia (f):

$$f = \frac{H_e - H_o}{H_e} \rightarrow f = \frac{0,59 - 0,4}{0,59} \rightarrow f = 0,32$$

Tabela 4.

Frequências alélicas de *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus* nas duas populações nas paisagens contínua e fragmentada.

Alelo	Espécie	Paisagem Contínua		Paisagem Fragmentada	
		Ponto 1	Ponto 2	Fragmento 1	Fragmento 2
A1	<i>C. philander</i>	0,10	0,00	0,85	0,00
A2	<i>C. philander</i>	0,50	0,55	0,15	0,10
A3	<i>C. philander</i>	0,40	0,35	0,00	0,90
A4	<i>C. philander</i>	0,00	0,10	0,00	0,00
A1	<i>A. lituratus</i>	0,30	0,25	0,15	0,25
A2	<i>A. lituratus</i>	0,40	0,45	0,15	0,55
A3	<i>A. lituratus</i>	0,15	0,10	0,20	0,20
A4	<i>A. lituratus</i>	0,15	0,20	0,50	0,00

Espécie	Paisagem Contínua						Paisagem Fragmentada					
	Ponto 1			Ponto 2			Fragmento 1			Fragmento 2		
	H_e	H_o	f	H_e	H_o	f	H_e	H_o	f	H_e	H_o	f
<i>Caluromys philander</i>	0,58	0,6	-0,030	0,56	0,6	-0,06	0,25	0,1	0,60	0,18	0,1	0,44
<i>Artibeus lituratus</i>	0,70	0,7	0,007	0,68	0,7	-0,02	0,66	0,4	0,39	0,59	0,4	0,32

Tabela 5.

Estimativas dos valores de diversidade genética (H_e , heterozigiosidade esperada), heterozigiosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia (f) para *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus* nas duas populações nas paisagens contínua e fragmentada.

Calcular as frequências alélicas totais de *C. philander* (Contínua):

$$n(A1) = 4$$

$$n(A2) = 17$$

$$n(A3) = 15$$

$$n(A4) = 4$$

$$nt = 4 + 17 + 15 + 4 = 40$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 4/40 = 0,10$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 17/40 = 0,43$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 15/40 = 0,38$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 4/40 = 0,10$$

♦ Calcular H_T de *C. philander* (Contínua):

$$H_T = \sum 1 - (p^2 + q^2 + r^2 + s^2)$$

$$p^2 = 0,10^2 = 0,01$$

$$q^2 = 0,43^2 = 0,18$$

$$r^2 = 0,38^2 = 0,14$$

$$s^2 = 0,10^2 = 0,01$$

$$H_T = 1 - 0,34$$

$$H_T = 0,66$$

♦ Calcular H_s de *C. philander* (Contínua):

$$H_s = \frac{He_1 \cdot N_1 + He_2 \cdot N_2}{N_{Total}}$$

$$H_s = \frac{0,58 \cdot 10 + 0,56 \cdot 10}{20} = 0,57$$

♦ Calcular F_{ST} de *C. philander* (Contínua):

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$$

$$F_{ST} = \frac{0,66 - 0,57}{0,66} = 0,13$$

Calcular as frequências alélicas totais de *C. philander* (Fragmentada):

$$n(A1) = 17$$

$$n(A2) = 5$$

$$n(A3) = 18$$

$$n(A4) = 0$$

$$nt = 17 + 5 + 18 + 0 = 40$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 17/40 = 0,425$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 5/40 = 0,125$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 18/40 = 0,45$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 0/40 = 0$$

♦ Calcular H_T de *C. philander* (Fragmentada):

$$H_T = \sum 1 - (p^2 + q^2 + r^2 + s^2)$$

$$p^2 = 0,425^2 = 0,180$$

$$q^2 = 0,125^2 = 0,015$$

$$r^2 = 0,45^2 = 0,202$$

$$s^2 = 0^2 = 0$$

$$H_T = 1 - 0,398$$

$$H_T = 0,602$$

♦ Calcular H_s de *C. philander* (Fragmentada):

$$H_s = \frac{He_1 \cdot N_1 + He_2 \cdot N_2}{N_{Total}}$$

$$H_s = \frac{0,25 \cdot 10 + 0,18 \cdot 10}{20} = 0,217$$

♦ Calcular F_{ST} de *C. philander* (Fragmentada):

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$$

$$F_{ST} = \frac{0,602 - 0,217}{0,602} = 0,64$$

Calcular as frequências alélicas totais de *A. lituratus* (Contínua):

$$n(A1) = 11$$

$$n(A2) = 17$$

$$n(A3) = 5$$

$$n(A4) = 7$$

$$nt = 11 + 17 + 5 + 7 = 40$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 11/40 = 0,275$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 17/40 = 0,425$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 5/40 = 0,125$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 7/40 = 0,175$$

♦ Calcular H_T de *A. lituratus* (Contínua):

$$H_T = \sum 1 - (p^2 + q^2 + r^2 + s^2)$$

$$p^2 = 0,275^2 = 0,076$$

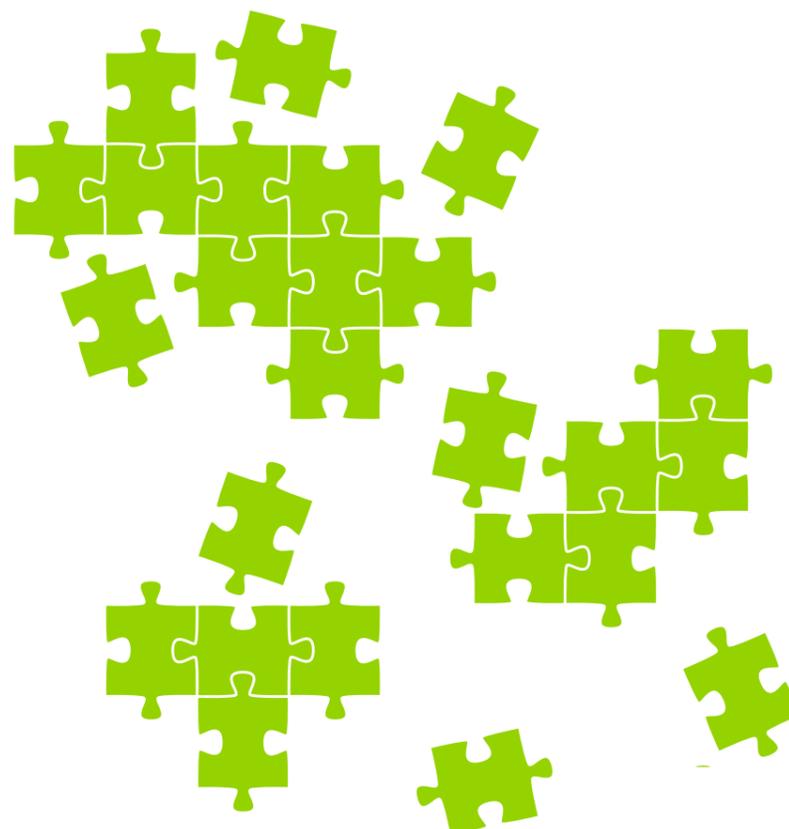
$$q^2 = 0,425^2 = 0,181$$

$$r^2 = 0,125^2 = 0,016$$

$$s^2 = 0,175^2 = 0,031$$

$$H_T = 1 - 0,30$$

$$H_T = 0,70$$



♦ Calcular H_s de *A. lituratus* (Contínua):

$$H_s = \frac{He_1 \cdot N_1 + He_2 \cdot N_2}{N_{Total}}$$

$$H_s = \frac{0,70 \cdot 10 + 0,68 \cdot 10}{20} = 0,69$$

♦ Calcular F_{ST} de *A. lituratus* (Contínua):

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$$

$$F_{ST} = \frac{0,70 - 0,69}{0,70} = 0,014$$

Calcular as frequências alélicas totais de *A. lituratus* (Fragmentada):

$$n(A1) = 8$$

$$n(A2) = 14$$

$$n(A3) = 8$$

$$n(A4) = 10$$

$$nt = 8 + 14 + 8 + 10 = 40$$

$$f(A1) = n(A1)/nt = 8/40 = 0,20$$

$$f(A2) = n(A2)/nt = 14/40 = 0,35$$

$$f(A3) = n(A3)/nt = 8/40 = 0,20$$

$$f(A4) = n(A4)/nt = 10/40 = 0,25$$

♦ Calcular H_T de *A. lituratus* (Fragmentada):

$$H_T = \sum 1 - (p^2 + q^2 + r^2 + s^2)$$

$$p^2 = 0,20^2 = 0,04$$

$$q^2 = 0,35^2 = 0,12$$

$$r^2 = 0,20^2 = 0,04$$

$$s^2 = 0,25^2 = 0,06$$

$$H_T = 1 - 0,26$$

$$H_T = 0,74$$

♦ Calcular H_s de *A. lituratus* (Fragmentada):

$$H_s = \frac{He_1 \cdot N_1 + He_2 \cdot N_2}{N_{Total}}$$

$$H_s = \frac{0,66 \cdot 10 + 0,59 \cdot 10}{20} = 0,62$$

♦ Calcular F_{ST} de *A. lituratus* (Fragmentada):

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$$

$$F_{ST} = \frac{0,74 - 0,62}{0,74} = 0,162$$

Tabela 6.

Estimativas dos valores médios de diversidade genética (H_s , heterozigiosidade esperada média entre fragmentos), H_T (heterozigiosidade esperada total) e F_{ST} (coeficiente de diferenciação genética) das espécies *Caluromys philander* e *Artibeus lituratus* nas duas populações das paisagens contínua e fragmentada.

	Paisagem Contínua			Paisagem Fragmentada		
	H_s	H_T	F_{ST}	H_s	H_T	F_{ST}
<i>Caluromys philander</i>	0,66	0,57	0,13	0,60	0,22	0,64
<i>Artibeus lituratus</i>	0,70	0,69	0,01	0,74	0,62	0,16

Questão 1.

Sim, os valores de resistência de matriz interferem nos parâmetros genéticos. Podemos observar que quanto maior a resistência da matriz maior também o valor de diferenciação genética (F_{ST}), que mede o quão as populações são diferentes geneticamente. Os valores dos coeficientes de endogamia (f), que nos indica se as populações são endogâmicas ou não, também são maiores quanto maior a resistência da matriz. Esses resultados mostram que a capacidade de movimentação das espécies entre as populações é afetada pela resistência da matriz, afetando, portanto, a estrutura genética das populações, uma vez que quanto menor a movimentação de indivíduos entre diferentes populações, menor será o fluxo gênico entre elas e maior o acasalamento entre indivíduos aparentados dentro das populações.

Questão 2.

A espécie de marsupial, *Caluromys philander*, foi a mais afetada pelo tipo de paisagem. Essa espécie possui capacidade de dispersão limitada, sendo assim, sua dispersão é mais dependente de uma paisagem contínua que *Artibeus lituratus*. O que podemos observar é que a paisagem fragmentada, com matriz de soja, interfere muito na dispersão de *Caluromys philander*, causando uma barreira à dispersão e, portanto, ao fluxo gênico. Devido à limitação de fluxo gênico essa espécie apresentou menores valores de diversidade genética (H_e) e maiores valores de diferenciação genética (F_{ST}), o que aconteceu com menor intensidade com *Artibeus lituratus*. A espécie de morcego possui grande capacidade de dispersão e por isso não sofreu grandes alterações com os diferentes tipos de paisagem. Por conseguir se movimentar a grandes distâncias, o nível de fragmentação no estudo apresentado interrompeu o fluxo gênico entre as populações em nível mais baixo, e por isso a espécie apresentou valores mais altos de diversidade genética (H_e) e baixos valores de diferenciação (F_{ST}). Em relação ao coeficiente de endogamia (f), a espécie que possui grande capacidade de dispersão (*A. lituratus*) apresentou também valores

mais baixos, o que significa que suas populações em paisagem fragmentada estão sofrendo endogamia em nível mais baixo que *Caluromys philander*. Como podemos observar, a fragmentação do habitat cria barreiras ao fluxo gênico, afetando mais intensamente espécies que apresentam dispersão mais limitada, o que resulta na diminuição da diversidade genética, aumento da diferenciação genética entre populações e aumento da endogamia dentro das populações.

Questão 3.

Os marcadores microssatélites apresentam herança mendeliana, são codominantes e multialélicos, o que permite a detecção de heterozigotos e distinção entre indivíduos. Devido a essas características, podemos estimar parâmetros genéticos como índices de endogamia (f) e diferenciação genética (F_{ST}), parâmetros de grande importância quando se tem como objetivo avaliar o efeito da fragmentação nas características genéticas das populações.

Questão 4.

Como pode ser observado no presente estudo, mesmo espécies pertencentes ao mesmo grupo, nesse caso, mamíferos, podem apresentar características biológicas únicas, como, por exemplo, diferentes tipos de dispersão, diferentes tipos de habitats, e devido a essas características, elas podem responder de diferentes formas às características da paisagem. Sendo assim, é crucial o conhecimento prévio das características ecológicas da espécie em estudo e do seu habitat, para a realização de eficientes estratégias de manejo e conservação. Essas informações são de grande importância na avaliação de como as perturbações causadas pelo homem interferem no habitat e viabilidade das populações. Os resultados do presente estudo apontam que a manutenção da conectividade entre populações é muito importante para a conservação de ambas as espécies, já que os parâmetros genéticos foram bem diferentes entre as populações da paisagem contínua, com alta conectividade, comparada com as populações

da paisagem fragmentada com matriz de soja, com baixa conectividade. Entretanto, a espécie de marsupial, *Caluromys philander*, foi muito mais afetada. Desta forma, para a conservação desta espécie, é extremamente importante a manutenção da conectividade entre fragmentos, permitindo a dispersão entre fragmentos.

REFERÊNCIAS

- KEYGHOBADI, N. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Canadian Journal of Zoology*, v.85, p.1049–1064, 2007.
- LYNCH, M.; CONERY, J.; BURGER, R. Mutation accumulation and the extinction of small populations. *American Naturalist*, v.146, p.489–518, 1995.
- MANEL, S.; SCHWARTZ, M. K.; LUKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, v.18, p.189–197, 2003.
- MÜHLNER, S.; KORMANN, U.; SCHMIDT-ENTLING, M. H.; HERZOG, F.; BAILEY, D. Structural versus functional habitat connectivity measures to explain bird diversity in fragmented orchards. *Journal of Landscape Ecology*, v. 3, p. 52–63, 2010.

PUTTKER, T.; BUENO, A. A.; BARROS, C. S.; SOMMER, S.; PARDINI, R. Immigration rates in fragmented landscapes- Empirical evidence for the importance of habitat amount for species persistence. *PLoS ONE*, v.6, p.e27963, 2011.

PARA SABER MAIS

Para mais informações sobre teorias e conceitos em ecologia e genética da paisagem consulte:

- TURNER, M. G.; GARDNER, R.H.; O'NEILL, R. V. *Landscape ecology in theory and practice: pattern and process*. New York: Springer, 2001.
- HOLDEREGGER, R.; WAGNER, H. H. Landscape genetics. *BioScience*, v.58, p. 199–207, 2008.
- MANEL, S.; HOLDEREGGER, R. Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 28, p. 614–621, 2013.
- SPEAR, S. F.; BALKENHOL, N.; FORTIN, M. J.; MCRAE, B. H.; SCRIBNER, K. Use of resistance surfaces for landscape genetic studies: considerations for parameterization and analysis. *Molecular Ecology*, v.19, p. 3576–3591, 2010.

PARA MAIS INFORMAÇÕES SOBRE AS EQUAÇÕES DOS PARÂMETROS GENÉTICOS CONSULTE:

- HARTL, D. L., CLARK, A. G. *Princípios de genética de populações*. 4º. ed. Curitiba: Artmed, 660 p., 2010.
- WEIR, B. S.; *Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 192 p., 1996.