Capítulo 4

Passos para incorporar variáveis espaciais e temporais na genética da conservação

Andreia Magro Moraes

Marciane da Silva Oliveira

O objetivo deste capítulo é discutir os tipos de amostragens e de marcadores moleculares e as análises de dados mais utilizadas em estudos de genética da conservação, que têm incorporado variáveis espaciais e temporais. Análises genéticas que incorporam variáveis espaciais são objetos de estudo da genética da paisagem, área que está em ascensão por permitir investigar processos ecológicos e analisar o seu funcionamento no mundo "real".

Entretanto, a maioria das pesquisas de genética da conservação permanece sem um delineamento amostral explícito, exibindo amostragens oportunistas. Esse comportamento é tradicionalmente adotado na genética das populações e pode comprometer as análises, gerando resultados equivocados. Para que os resultados das pesquisas genéticas sejam aplicáveis à conservação, as principais mudanças que devem ser incorporadas são o delineamento amostral explícito e a consideração do efeito de escalas espaciais e temporais sobre a estruturação genética. Para isso, informações sobre o uso do espaço e tempo pela espécie de estudo devem ser previamente reunidas, assim como as falhas dos métodos de estudo, no intuito de evitar erros na interpretação dos resultados e, consequentemente, no planejamento dos programas de conservação.

Introdução

A variação genética tem sido um crescente alvo de investigação devido à sua importância para a biologia da conservação, uma ciência multidisciplinar que visa congregar o conhecimento de diferentes áreas para entender e combater

os processos que ameaçam a sustentabilidade da biodiversidade. A biodiversidade genética, por sua vez, pode ser afetada em múltiplas escalas, tanto espaciais quanto temporais (ANDERSON et al., 2010). O número de publicações científicas que tem usado variáveis espaciais para explicar a variação genética de populações naturais tem crescido substancialmente desde 2003. Contudo, o montante de pesquisas que tem incorporado variáveis temporais ainda é bastante incipiente (Figura 1).

A ciência que explica a influência das características da paisagem sobre a variação genética é a genética da paisagem. Ela foi citada pela primeira vez por volta dos anos de 1980, mas só foi proposta como uma ciência em 2003 (MANEL et al., 2003). Manel e demais autores (2003) a definiram como uma disciplina que integra as características espaciais com processos microevolutivos, como o fluxo gênico, a deriva genética e a seleção. Anos mais tarde, ela foi redefinida para integrar a genética de populações, a ecologia da paisagem e as estatísticas espaciais (STORFER et al., 2007).

Enquanto os estudos de genética da paisagem permitem avaliar a estrutura genética intra e interpopulacional em diferentes escalas espaciais (SORK; WAITS, 2010), os modelos temporais ajudam a entender quais forças determinam a diferenciação das populações e a testar quais as causas da perda de diversidade genética ao longo do tempo. As amostragens em múltiplas escalas temporais permitem também monitorar e avaliar os programas de conservação, tais como medidas de reintroduções e translocações de indivíduos (SMYSER et al., 2013), e planejar novas medidas de conservação, uma vez

que conhecemos a causa primária de diferenciação genética (HABEL et al., 2014). Desse modo, as escalas espaciais contribuem para a avaliação do efeito da paisagem sobre a variação genética (STORFER et al., 2007), ao passo que são importantes para a investigação de eventos demográficos e declínios populacionais (ORTEGO et al., 2011).

Conjuntamente, as amostragens em múltiplas escalas espaciais e temporais podem ajudar a identificar eventos passados e atuais que governam a diferenciação populacional. Por serem a dinâmica e a estruturação populacional resultados de múltiplos processos temporais, espaciais e biológicos, amostragens genéticas espaço-temporais tendem a aumentar o poder das análises e gerar informações mais precisas sobre os mecanismos de diferenciação populacional e sobre seu *status* de ameaça. Entretanto, apesar das vantagens listadas, o número de publicações que incorporam dados temporais é muito menor que aqueles que incorporam amostragens espaciais. Menor ainda tem sido o número de pesquisas que incorporaram ambas as escalas (espacial e temporal), conforme o disposto na Figura 1, que reúne publicações encontradas no banco de dados do Scopus e que contêm, no título, resumo ou palavras-chaves, os termos: (1) *landscape genetic* + *population* + *conservation*; (2) *temporal scale* + *conservation genetic*; e (3) *spatial scale* + *temporal scale* + *genetic conservation*. É possível que isso ocorra em função da dificuldade de obter e analisar amostras temporais. Por essa razão, este capítulo reúne as principais recomendações para testar o efeito da escala e o tipo de amostragem em pesquisas de genética da conservação que incorporam variáveis espaciais e/ou temporais (HABEL et al., 2014; 2015).

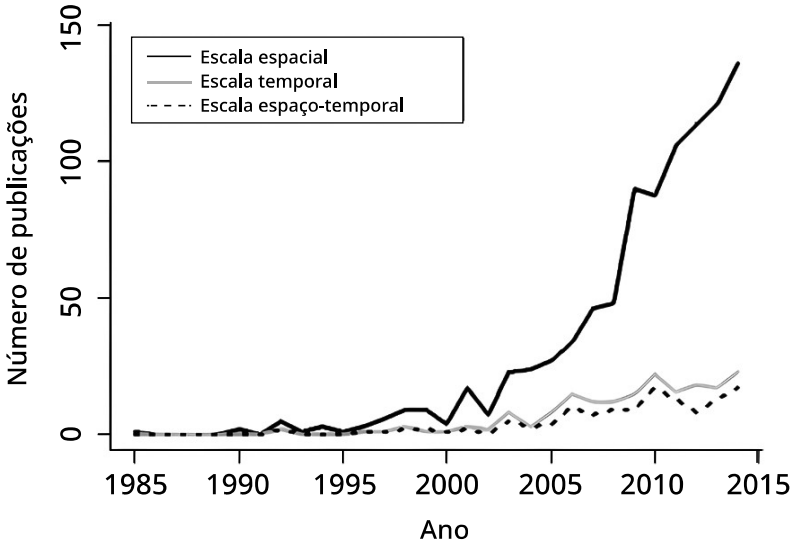

Figura 1: Número de publicações com os respectivos temas, entre 1985 e 2015

Fonte: elaborada pelos autores.

Identificação do problema

Os objetivos mais comuns de estudos de genética da conservação que incorporam variáveis espaciais incluem identificar as características ambientais ou da paisagem que facilitam ou impedem o movimento e fluxo gênico (MULLINS et al., 2015) e avaliar a influência da composição e configuração da paisagem sobre a diversidade e diferenciação genética populacional (APARICIO et al., 2012). Esses estudos permitem quantificar a atividade da variação da paisagem, em diferentes escalas espaciais, na moldagem da estrutura genética dentro das e entre as populações (SORK; WAITS, 2010). Já os modelos temporais ajudam a entender as forças que determinam a diferenciação das populações e a testar a perda de diversidade genética, que se deve a declínios ou gargalos populacionais (HABEL et al., 2014, 2015).

Dessa forma, pesquisas que incorporaram variáveis espaciais avaliam a influência de fatores da paisagem sobre a variação dos dados genéticos, tais como barreiras físicas, resistência e configuração da paisagem, fragmentação, perda de hábitat e distância inter-hábitat (MORAES et al., 2018). Já estudos que incorporam variáveis temporais avaliam a influência de eventos estacionais e demográficos sobre a variação genética (GUILLEMAUD et al., 2011).

Escolha da escala

Segundo Hall e Beissinger (2014), a escolha da escala é a segunda etapa em uma pesquisa, depois da definição do objetivo. A escala pode ser pequena/curta, grande/longa ou múltipla. Em análises de fluxo gênico, a escala temporal pode variar desde escalas históricas até regionais ou contemporâneas. Assim, a estrutura genética de uma população pode refletir um padrão histórico maior que os padrões contemporâneos da paisagem, exibindo um tempo de atraso no padrão genético observado. Por isso, torna-se importante considerar os efeitos da escala temporal em estudos genéticos. Por exemplo, Zelmer e Knowles (2009) usaram múltiplas escalas de tempo e espaço para investigar a influência da paisagem na diferenciação genética de uma espécie de anfíbio: *Rana sylvatica*. Usando essa metodologia, os autores observaram que a variação genética de *R. sylvatica* estava respondendo a escalas mais contemporâneas da paisagem.

A escolha da escala (espacial ou temporal) deve ser definida previamente à realização da pesquisa, que depende de informações sobre o comportamento e a ecologia da

espécie de estudo. Quando a escolha da escala é realizada de forma intuitiva, ela pode comprometer a interpretação dos resultados. Uma determinada escala pode ser adequada para um dado organismo, mas não para outro. Por isso, uma mesma escala não pode ser utilizada como parâmetro para espécies sem similaridades ecológicas. Uma escala de baixa resolução e uma classificação simples do uso e cobertura do solo, por exemplo, são adequadas para avaliar a influência da paisagem sobre o fluxo gênico de grandes vertebrados, mas em análises com pequenos vertebrados, que são afetados por mudanças em pequenas escalas da paisagem, são inapropriadas (SEGELBACHER et al., 2010).

Segundo Anderson e demais autores (2010), a escala espacial é caracterizada pela granulação, extensão e resolução; relacionadas à biologia da espécie em estudo. A granulação deve ser menor que a média da área de vida ou que a distância de dispersão da espécie, e a extensão deve ser maior que a área ocupada pela população e que a distância esperada de dispersão. Esse esquema está representado na Figura 2, em que a linha pontilhada representa a granulação; a contínua, a extensão; a em negrito, ligando os grãos à distância entre unidades amostrais; e a seta, que indica a distância de dispersão da espécie de estudo.

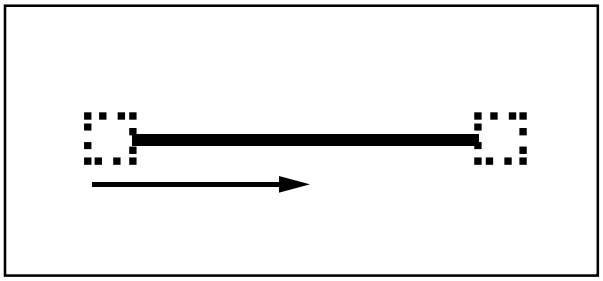

Figura 2: Esquema indicando a granulação, a extensão e a distância entre as unidades amostrais, que devem ser consideradas durante o delineamento de uma amostragem espacial
Fonte: Anderson e demais autores (2010).

Desenho amostral

Uma questão comum em estudos de genética de populações é a definição do número de indivíduos que deve ser amostrado e do número de marcadores a ser utilizado. Tradicionalmente, tem sido aceitável um mínimo de 20 a 30 indivíduos (NEI, 1978). Hale e demais autores (2012) demonstraram, utilizando diferentes táxons, que a variação na frequência alélica, na heterozigose esperada (He) e no coeficiente de endogamia devido à diferenciação entre subpopulações (Fst), diminuem à medida que o tamanho amostral aumenta. Os autores também observaram que a variação genética não é significativa em valores acima de 25 ou 30 indivíduos amostrados. Contudo, pesquisas que usam algoritmos de agrupamento genético e testes de atribuição podem dispensar esse tipo de delineamento, pois é mais importante para a genética da paisagem uma ampla distribuição da amostragem no espaço que na dimensão do indivíduo (STORFER et al., 2007).

Uma solução para definir o número de amostras, sítios, populações e marcadores pode ser os testes de randomização,

que visam quantificar o esforço mínimo necessário para encontrar uma variação genética. Dharmarajan e demais autores (2014) realizaram testes de aleatorização para avaliar o poder de sua amostragem – utilizando 13 microssatélites, Fst igual a 0,018 e o número mínimo de amostras (aproximadamente 20) – e observaram um poder maior que 80% de encontrar estruturação genética. Alguns programas podem ser usados para realizar esses testes, como o POWSIN. Esse *software* estima o poder e o erro das análises, usando o teste exato de Fisher e o teste de qui-quadrado e combinando informações, como número de sítios ou populações, tamanho das amostras, número de *loci*, frequência alélica e grau esperado de diferenciação (RYMAN; PALM, 2006).

A escala da amostragem pode ser a nível de indivíduo, grupo ou população. A amostragem a nível de indivíduo será adequada para espécies com distribuição contínua. Já amostragens a nível da população serão adequadas para espécies com distribuição descontínua ou agrupadas por uma grande escala geográfica. Para que múltiplos fatores (temporais e/ou espaciais) que afetam o objeto de estudo (como o fluxo gênico, por exemplo) sejam coletados, a amostragem deve ser bem distribuída no tempo e espaço (ANDERSON et al., 2010). Assim, quanto maior o número de sítios ou populações amostradas ao longo da área de distribuição da espécie de estudo, maior será o número de variáveis espaciais capturadas.

Geneticistas geralmente não têm conhecimento prévio sobre a espécie de estudo e, por isso, investigam a influência de várias características da paisagem ou assumem que apenas a distância geográfica pode causar o isolamento. Entretanto,

para aplicar a genética da paisagem na conservação, é necessário lançar mão de delineamentos amostrais mais explícitos e métodos mais sofisticados (SEGELBACHER et al., 2010), diferentemente do que ocorre com estudos de genética populacional, que, tradicionalmente, têm sido realizados com amostragens oportunistas (STORFER et al., 2007). Segundo Meirmans (2015), um dos principais erros encontrados na literatura de genética das populações é dar maior atenção à genotipagem que à amostragem. A randomização das amostras no laboratório é falha ou não informada e é conduzida considerando os limites geopolíticos, não biológicos.

O delineamento amostral pode, ainda, ser sistemático ou randômico. O modelo sistemático possui intervalos fixos de amostragem e cobre toda a área de estudo. Já modelos randômicos possuem uma amostragem aleatória e podem ser aplicados a espécies distribuídas continuamente ou em subconjuntos na paisagem. Esses modelos gerais podem ser implementados com delineamentos mais complexos, como:

1. Amostragem hierárquica: uma variável (a exemplo do tipo de cobertura) é mais intensamente coletada em fina escala do que outra variável (como genótipos);
2. Aninhada: a coleta ocorre numa escala mais ampla (bloco 1) e em limites mais finos (blocos 2 e 3);
3. Estratificada: apropriada para análises de gradiente e efeito da configuração da paisagem, quando se deseja capturar variáveis da paisagem distribuídas desigualmente na área de estudo.

Algumas questões que devem ser respondidas antes do delineamento amostral são: "Qual o objetivo do estudo? Como a espécie está distribuída no tempo e no espaço? Quais tipos de modelos estatísticos são adequados para o delineamento amostral e os tipo de dados coletados?". Quando o objetivo da pesquisa é avaliar a perda de diversidade ou a história demográfica, é recomendável que, antes de definir o delineamento amostral, as mudanças ocorridas na área de distribuição da espécie ao longo do tempo sejam investigadas. É importante interrogar, também, a existência de amostras coletadas em períodos simultâneos para uma mesma área ou região (STORFER et al., 2007).

Segundo Habel e demais autores (2015), um desafio da genética de populações é coletar um grande número de amostras de uma população em vários pontos no tempo. Embora estudos com a amostragem de um único ano ou de um período contemporâneo tenham sido capazes de estimar a influência de eventos passados na composição genética, o poder de detecção de efeitos históricos aumenta quando múltiplos pontos de amostragem no tempo – ou de períodos que antecederam ou sucederam o evento histórico – são amostrados. As coleções de museus são a chave para a incorporação dos dados temporais nas pesquisas (HABEL et al., 2014). O problema é que amostras antigas de museus são raras e de difícil extração de DNA e amplificação (pequena quantidade DNA e baixa qualidade). Entretanto, muitas análises que investigam eventos antigos podem ser realizadas com pequeno tamanho amostral, o que pode encorajar a incorporação dessas amostras (RAMAKRISHNAN; HADLY; MOUNTAIN, 2005).

No geral, pesquisas genéticas que avaliam a influência de variáveis espaciais buscam amostrar mais largamente a área de distribuição da espécie de estudo. Quanto maior o número de grupos (sítios e/ou períodos), menor o seu tamanho amostral. Dessa forma, geneticistas da paisagem capturam maiores informações do espaço, usando escalas ao nível de grupos ou populações (STORFER et al., 2007). Na situação inversa, a amostragem captura maiores informações na esfera do indivíduo (genótipos). Por isso, espera-se que estudos que avaliam a variação genética em um dado tempo se concentrem em obter um maior número de indivíduos (ANDERSON et al., 2010; HABEL et al., 2015).

Escolha do marcador molecular

No terceiro capítulo deste livro, foram apresentados alguns marcadores que podem ser utilizados em estudos de genética da conservação, destacando a empregabilidade dos marcadores dominantes e codominantes e as possíveis informações que cada um pode gerar. A Tabela 1, a seguir, evidencia, além da herança, a aplicação de alguns desses marcadores em estudos da genética da conservação.

Até o momento, os microssatélites têm sido os marcadores mais utilizados, atuando como base de sustentação da genética de populações por serem altamente polimórficos, abundantes no genoma e possuírem ampla área evolutiva, que permite examinar diferentes escalas de tempo. Os microssatélites são sequências curtas, altamente repetitivas, não codificadoras e com alta taxa de mutação devido aos deslizes da enzima durante a replicação das unidades de repetição. Eles são indicados para estudos que quantificam a estrutura

genética populacional e o fluxo gênico recente, além de serem os melhores marcadores para investigar as consequências da fragmentação contemporânea (ANDERSON et al., 2010).

Nessa esteira, a Tabela 1 explicita a aplicação dos marcadores moleculares em pesquisas de genética da conservação. A notação é a seguinte: "+" para técnicas que podem ser utilizadas para tal aplicação. Vários sinais indicam maior utilidade, sendo "–" para as que não podem ser utilizadas para o objetivo em questão e "?" às técnicas sobre as quais há informação insuficiente para inferência. A tabela foi baseada em Frankham, Briscoe e Ballou (2002), Hall e Beissinger (2014), Ouborg e demais autores (2010) e Schlötterer (2004).

		ALOENZIMAS	AFLP	SSR	mtDNA[1]	SNP
Fonte		**proteínas**	**nuDNA**	**nuDNA**	**mtDNA**	**nuDNA**
Herança		**codominante**	**dominante**	**codominante**	**codominante**	**codominante**
Reprodutibilidade		?	alta	baixa	alta	alta
APLICAÇÕES	***Tamanho efetivo***	++	?	+++	++	+++
	Gargalos	++	++	+++	++	+++
	Endogamia	-	+++	+++	?	+++
	Seleção	+	+++	-	-	+++
	Migração e fluxo gênico	++	+++	+++	++	+++
	Estrutura genética	++	++	+++	++	+++
	Padrão de acasalamento	++	-	+++	-	+++
	Parentesco	+	+	+++	+	+++

Tabela 1: Aplicação dos marcadores moleculares em pesquisas de genética da conservação

Fonte: baseado em Frankham; Briscoe; Ballou (2002), Hall; Beissinger (2014), Ouborg *et al*. (2010) e Schlötterer (2004).

Apesar das vantagens concedidas pelos marcadores de microssatélites, é preciso ter cautela na aplicação do método, já que possuem difícil interpretação de resultados devido à presença de artefatos (SCHLÖTTERER, 2004). Caso sejam usadas amostras não invasivas ou antigas na pesquisa, o conjunto de dados de microssatélite pode apresentar mais erros de genotipagem, dada a pequena quantidade e qualidade do DNA. Os erros de genotipagem comprometem severamente análises de parentesco e, moderadamente, as de diversidade genética e os testes de atribuição. Esses erros podem ser estimados utilizando o método de Zhan e demais autores (2010) e minimizados, com múltiplos tubos de genotipagem (TABERLET; LUIKART; WAITS, 1999) e usando pequenos fragmentos de microssatélites, especialmente em estudo com amostras antigas (HABEL et al., 2014).

O mtDNA e cpDNA são os marcadores mais indicados para estudos que investigam mudanças históricas em longas escalas espaciais (ANDERSON et al., 2010) e para análises com amostras antigas (HABEL et al., 2014). Eles não são recombinantes (HOLDEREGGER; WAGNER, 2008) e têm herança materna. Por isso, seus resultados contam a história do fluxo gênico mediado por apenas um dos sexos. Geralmente, o mtDNA e o cpDNA não fornecem variação genética entre indivíduos suficiente para investigar a influência da paisagem (Tabela 1). No entanto, se for observada, a dispersão é facilmente detectada. Estudos de fluxo gênico de plantas têm utilizado mais frequentemente o cpDNA, permitindo avaliar a dispersão do pólen ou sementes em diferentes escalas temporais e espaciais (ANDERSON et al., 2010).

AFLPs e aloenzimas também têm sido utilizados para investigar a diferenciação genética, especialmente em pesquisas com espécies de plantas (STORFER et al., 2010). Eles são indicados para análises com amostras recentes (HABEL et al., 2014). O AFLP é um tipo de marcador nuclear neutro e dominante, baseado na combinação da restrição da variação local (enzimas de restrição) e amplificação por meio do método de PCR (OUBORG et al., 2010). A principal vantagem do AFLP é não requerer informação a *priori* sobre a sequência alvo (*primer*). Ele é indicado na construção de mapas genéticos de espécies com pouco conhecimento a respeito do seu genoma (Tabela 1) (SCHLÖTTERER, 2004) e aplicado em estudos de grande escala espacial ou temporal (ANDERSON et al., 2010).

As aloenzimas, por sua vez, permitem distinguir variações nas enzimas (mudanças causadas pela substituição de aminoácidos) visualizadas no gel de eletroforese. Apesar de ser uma técnica de baixo custo e possuir um protocolo universal, o número de pesquisas que tem usado aloenzimas como marcadores tem diminuído expressivamente desde o surgimento dos marcadores de DNA. Sua substituição se justifica pelo fato de consistir em um método indireto de detecção da variação no DNA, possuir um número limitado de marcadores disponíveis e apresentar instabilidade em alguns dos seus *loci*, entre outros fatores (SCHLÖTTERER, 2004).

Até o momento, a maioria dos estudos de genética da conservação realizados tem utilizado, basicamente, marcadores neutros. Portanto, testes empíricos acerca do efeito de pequeno tamanho efetivo populacional sobre a variação genética funcional são praticamente inexistentes. Assim, uma

questão que atualmente não é clara na genética da conservação é como a variação genética relacionada com o *fitness* é afetada pelos mesmos processos observados em marcadores neutros (OUBORG et al., 2010). Uma maior cobertura do genoma permitirá obter uma melhor compreensão da variação genética e identificar regiões genômicas adaptativas. Novas tecnologias de sequenciamento, como a identificação de marcadores SNP, podem tornar possível a geração de enormes quantidades de sequências de DNA com baixo custo e rapidamente. No futuro, essas novas tecnologias substituirão os marcadores microssatélites e outros métodos tradicionais que são mais custosos e trabalhosos (SEGELBACHER et al., 2010).

SNP é um novo tipo de marcador molecular que detecta a mudança em uma única base na sequência de DNA nuclear (HOLDEREGGER; WAGNER, 2008). Eles têm maior cobertura do genoma que os microssatélites e os AFLPs e sua principal vantagem é o alto potencial de automatização, com custo moderado (OUBORG et al., 2010). Os SNPs são menos variáveis, além de serem os representantes mais comuns no genoma polimórfico quando comparados aos microssatélites. Por isso, seu uso tem crescido e é considerado o marcador do futuro (HABEL et al., 2014).

O SNP, assim como o microssatélite, tem alto poder de detecção de mudanças através de uma curta escala espacial ou temporal. Um grande conjunto de dados, tanto de SNP quanto de microssatélite, permite fazer inferências sobre o fluxo gênico de espécies com alto nível de dispersão e que exibem fraca estruturação genética, devido a processos ecológicos e evolutivos que têm atuado em curtos espaços de tempo

(ANDERSON et al., 2010). Entretanto, para que o primeiro SNP seja desenvolvido para uma dada espécie, é necessário, anteriormente, realizar o sequenciamento de vários genes do genoma, o que demanda tempo (HOLDEREGGER; WAGNER, 2008).

Métodos de análise

As pesquisas de genética da conservação mensuram a influência de variáveis espaciais e temporais na variação genética, estimando a diversidade genética e/ou diferenciação genética populacional. Inicialmente, contudo, é necessário realizar uma exploração dos dados, investigando:

1. A presença de alelos nulos, artefatos e alelos *dropout* no conjunto amostral;
2. Desvios no Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW);
3. Os testes de atribuição (CARLSSON, 2008).

Muitas análises são sensíveis à presença de alelos nulos, aos desvios no EHW e à presença de amostras relacionadas (CHAPUIS; ESTOUP, 2007). Desvios no EHW podem ser ajustados com correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989). Os alelos nulos também podem ser corrigidos usando programas como FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007), ou, quando em baixa frequência (< 0,1), as análises podem ser realizadas sem significativa influência nos resultados (CARLSSON, 2008). O programa FreeNA estima a frequência de alelos nulos por *loco* e população e corrige o conjunto de dados para calcular o Fst e a distância genética, seguindo o método de ENA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007). Além disso, testes de atribuição

também podem ser realizados, removendo ou não os *loci* com alelos nulos do conjunto de dados. Quando a remoção ou correção dos alelos nulos não alteram significativamente os resultados, os *loci* podem ser mantidos nas análises (MULLINS et al., 2015).

As estimativas de diversidade genética incluem a frequência alélica, número médio de alelos (Na), heterozigose esperada (He), riqueza alélica (AR), riqueza de alelos privados (PR) e coeficiente de endogamia (Fis). Pesquisas de genéticas delimitadas temporalmente usam os índices de diversidade de genética para entender a perda e a variação genéticas ao longo do tempo. Já pesquisas espaciais acessam a diversidade genética para investigar sua correlação com as métricas da paisagem. Por último, as pesquisas espaço-temporais correlacionaram a perda de diversidade ao tempo de fragmentação ou a eventos históricos (NORA; ALBALADEJO; APARICIO, 2015).

Uma diminuição no uso de métodos que quantificam o isolamento por distância (IBD) e uma maior importância dada aos testes de agrupamento genético e espacial indicam um avanço nas pesquisas (STORFER et al., 2010). Um modelo bayesiano usado largamente em estudos de genética da conservação para identificar grupos genéticos é o algoritmo implementado no *software* Structure (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), que mostra a proporção do genoma do indivíduo pertencente à população residente e/ou de origem. Apesar da sua importância e alta aplicabilidade em estudos de genética da paisagem, as análises no Structure e a interpretação de seus resultados devem ser realizadas com

cautela, especialmente se a amostragem utilizou um pequeno tamanho amostral e/ou amostras oportunistas.

Schwartz e Mckelvey (2009) mostraram que análises de agrupamento bayesiano no Structure podem identificar diferentes números de grupos genéticos, dependendo do método de amostragem aplicado. Como gradientes genéticos são, provavelmente, comuns na natureza, o Structure pode indicar populações enganosas. Por isso, antes de analisar a estrutura populacional, padrões que podem influenciar os resultados, como os espaciais e temporais, devem ser avaliados.

Fatores múltiplos das espécies, como demografia e fatores ambientais e históricos, muitas vezes desconhecidos pelo pesquisador, podem afetar a estrutura genética populacional. Dessa forma, a espécie pode não ser estruturada hierarquicamente por regiões geográficas, e diferentes cenários de K (ou seja, número de grupos genéticos estruturados) podem explicar a estrutura populacional, refletindo os diferentes processos biológicos envolvidos. Assim, além do valor ideal de K, apontado pelas estatísticas (aquele com maior valor), também é recomendada a interpretação dos valores subótimos de K (segundo e terceiro valores "ranqueados" nas estatísticas K), de acordo com os aspectos biológicos da espécie (MEIRMANS, 2015).

Outra análise que tem sido bastante utilizada para estimar a estrutura genética populacional é a Análise de Variância Molecular (Amova). A Amova produz estimativas de componentes de variâncias análogas à estatística F, que refletem a correlação da diversidade em diferentes níveis hierárquicos

para testar a subdivisão populacional (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992). A variância molecular é calculada hipotetizando uma fronteira populacional, o que aumenta o poder de inferência da análise caso a hipótese seja estabelecida com informação biológica, não apenas com fronteiras geopolíticas. A Amova pode ser uma ferramenta poderosa quando o resultado de estruturação é fraco, conferindo-lhe maior confiabilidade (MEIRMANS, 2015).

Alguns dos testes que correlacionam os dados genéticos com as variáveis da paisagem são: testes de isolamento, testes parciais de mantel, autocorrelações espacial e modelagens. Os testes de isolamento incluem:

1. O Isolamento por Resistência (IBR), que correlaciona a distância genética com a resistência (MCRAE; BEIER, 2007);
2. O isolamento por ambiente, que correlaciona a diferenciação genética com as diferenças ambientais (WANG; SUMMERS, 2010);
3. O clássico Isolamento por Distância (IBD), que correlaciona a diferenciação genética com a distância geográfica e, geralmente, é mensurado por meio do teste de mantel, que se difere por ser uma correlação parcial que usa três matrizes de dissimilaridade (MANTEL, 1967).

Por sua vez, a autocorrelação espacial (SMOUSE; PEAKALL, 1999) é uma análise multivariada que avalia a associação entre o relacionamento genético e a distância geográfica (conceitualmente similar ao teste de mantel). O método testa se o genótipo de um indivíduo (quantificado pela frequência

de alelos, distância genética etc.) em um determinado local depende do genótipo de um segundo indivíduo em uma localidade vizinha por meio de um correlograma espacial. Também é crescente a utilização de modelos de regressão para avaliar a relação entre as variáveis genéticas e métricas da paisagem, assim como modelagens da distância de menor custo – que correspondem ao cálculo do comprimento do caminho de menor custo entre os dois pontos (ADRIAENSEN et al., 2003) – para mensurar a conectividade da paisagem (MORAES et al., 2018).

Desafios e perspectivas: incorporando variáveis espaço-temporais em pesquisas aplicadas à conservação genética

A dinâmica e estruturação populacional resultam de múltiplos processos temporais, espaciais e biológicos. Por isso, amostragens genéticas espaço-temporais devem aumentar o poder das análises e gerar informações mais precisas sobre os mecanismos de diferenciação das populações e o seu *status* de ameaça (HABEL et al., 2015). Assim, estudos de genética da paisagem devem considerar a influência da escala temporal sobre a variação genética e vice-versa. Porém, muitas vezes, a influência dessa escala temporal sobre um processo ecológico é esquecida ou ignorada. Se a heterogeneidade genética temporal não é considerada, a diferenciação da população pode ser interpretada de forma equivocada, especialmente em situações em que a estruturação é fraca (STORFER et al., 2007).

Para analisar os efeitos das mudanças ambientais sobre a estrutura populacional, os pesquisadores precisam considerar o tempo passado (pré-fragmentação ou pré-gargalo) e o tempo recente (pós-fragmentação ou pós-gargalo). Um dos grandes desafios atuais é a padronização da amostragem no tempo e espaço. É possível que, com os avanços moleculares, possamos inferir sobre eventos históricos, utilizando apenas dados contemporâneos. Por enquanto, a literatura tem relatado que o poder das análises aumenta quando diferentes amostragens no tempo são realizadas. Somente quando amostragens espaço-temporais múltiplas forem incluídas nas pesquisas genéticas, poderemos identificar empiricamente os efeitos recentes de processos de longo prazo, como a fragmentação (HABEL et al., 2014).

REFERÊNCIAS

ADRIAENSEN, Frank *et al.* The application of “least-cost” modelling as a functional landscape model. **Landscape and Urban Planning**, v. 64, n. 4, p. 233-247, ago. 2003. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169204602002426. Acesso em: 26 mar. 2023.

ANDERSON, Corey Devin *et al.* Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 17, p. 3565-3575, ago. 2010. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/j.1365-294X.2010.04757.x. Acesso em: 26 mar. 2023.

APARICIO, Abelardo *et al.* Fragmentation and comparative genetic structure of four mediterranean woody species: Complex interactions between life history traits and the landscape context. **Diversity and Distributions**, v. 18, n. 3, p. 226-235, jul. 2012. Disponivel em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1472-4642.2011.00823.x. Acesso em: 26 mar. 2023.

CARLSSON, Jens. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. **Journal of Heredity**, v. 99, n. 6, p. 616-623, nov./dez. 2008. Disponível em: https://academic.oup.com/jhered/article/99/6/616/2188029?login=false. Acesso em: 26 mar. 2023.

CHAPUIS, Marie Pierre; ESTOUP, Arnaud. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621-631, mar. 2007. Disponível em: https://academic.oup.com/mbe/article/24/3/621/2925626?login=false. Acesso em: 26 mar. 2023.

DHARMARAJAN, Guha *et al.* Effects of landscape, demographic and behavioral factors on kin structure: Testing ecological predictions in a mesopredator with high dispersal capability. **Animal Conservation**, v. 17, n. 3, p. 225-234, nov. 2014. Disponível em: https://zslpublications.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/acv.12086. Acesso em: 26 mar. 2023.

FRANKHAM, Richard; BRISCOE, David Anthony; BALLOU, Jonathan D. **Introduction to conservation genetics**. [*S. l.*]: Cambridge University Press, 2002.

GUILLEMAUD, Thomas *et al.* Weak spatial and temporal population genetic structure in the Rosy Apple Aphid, dysaphis plantaginea, in French Apple Orchards. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 1-8, jun. 2011. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021263. Acesso em: 26 mar. 2023.

HABEL, Jan C. *et al.* The relevance of time series in molecular ecology and conservation biology. **Biological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 484-492, nov. 2014. Disponível em: https://bpb-us-w2.wpmucdn.com/sites.baylor.edu/dist/6/18/files/2016/06/Habel-et-al.-2013-Biol-Rev-2998cbd.pdf. Acesso em: 26 mar. 2023.

HABEL, Jan C. *et al.* Population genetics revisited – towards a multidisciplinary research field. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 115, p. 1-12, maio 2015. Disponível em: https://academic.oup.com/biolinnean/article/115/1/1/2440240?login=false. Acesso em: 26 mar. 2023.

HALE, Marie L.; BURG, Theresa M.; STEEVES, Tammy E. Sampling for microsatellite-mased population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1-11, set. 2012.

HALL, Laurie A.; BEISSINGER, Steven R. A practical toolbox for design and analysis of landscape genetics studies. **Landscape Ecology**, v. 29, n. 9, p. 1487-1504, ago. 2014. Disponível em: https://nature.berkeley.edu/beislab/BeissingerLab/publications/Hall&Beis_2014_LandscapeEcol.pdf. Acesso em: 26 mar. 2023.

MANEL, Stéphanie *et al.* Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 4, p. 189-197, abr. 2003.

MANTEL, Nathan. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, fev. 1967.

MCRAE, Brad H; BEIER, Paul. Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 50, p. 19885-19890, dez. 2007.

MEIRMANS, Patrick G. Seven common mistakes in population genetics and how to avoid them. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 13, p. 3223-3231, jul. 2015.

MORAES, Andreia Magro *et al.* Landscape resistance influences effective dispersal of endangered golden lion tamarins within the Atlantic Forest. **Biological Conservation**, v. 224, p. 178-187, jun. 2018.

MULLINS, Jacinta *et al.* Evaluating connectivity between Natura 2000 sites within the montado agroforestry system: a case study using landscape genetics of the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). **Landscape Ecology**, v. 30, n. 4, p. 609-623, abr. 2015.

NEI, Masatoshi. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, jul. 1978.

NORA, Sofia; ALBALADEJO, Rafael G.; APARICIO, Abelardo. Genetic variation and structure in the Mediterranean shrubs Myrtus communis and Pistacia lentiscus in different landscape contexts. **Plant Biology**, v. 17, n. 2, p. 311-319, set. 2015.

ORTEGO, Joaquín *et al.* Temporal dynamics of genetic variability in a mountain goat (Oreamnos americanus) population. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 8, p. 1601-1611, abr. 2011.

OUBORG, N. Joop *et al.* Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in Genetics**, v. 26, n. 4, p. 177-187, abr. 2010.

PRITCHARD, Jonathan K.; STEPHENS, Matthew; DONNELLY, Peter. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, jun. 2000.

RAMAKRISHNAN, Uma; HADLY, Elizabeth A.; MOUNTAIN, Joanna L. Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 10, p. 2915-2922, set. 2005.

RICE, William R. Analyzing Tables of Statistical Tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223-225, jan. 1989.