

**Universidade Estadual de Santa Cruz
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da
Biodiversidade**

**Usando a Genética da Conservação e a Ecologia Molecular a favor da
conservação do *Leontopithecus chrysomelas* (Mico-Leão-da-Cara-Dourada).**

Orientador/e-mail: Fernanda Gaioto / gaiotto@uesc.br

Nome do Candidato/e-mail: Rebeca Ferreira Sampaio /
rebecasampaio.bio@gmail.com

Nível: Doutorado

Linha de pesquisa do curso na qual o projeto se encaixa: Ecologia e
conservação de populações.

Ilhéus 10/11/2017

RESUMO

Depois de mais de 500 séculos de degradação, a Mata Atlântica foi reduzida drasticamente e hoje restam apenas fragmentos florestais dispersos e isolados ao longo de sua distribuição original. Mesmo com o alto grau de fragmentação, a Mata Atlântica ainda abriga muitas espécies endêmicas e ameaçadas de extinção, que estão sofrendo os efeitos deletérios da fragmentação do habitat. As consequências de fragmentação podem ser vistas tanto na diminuição efetiva do número de indivíduos das populações, como na viabilidade em longo prazo das populações remanescentes. A Mata Atlântica do sul da Bahia segue o mesmo padrão de endemismo e fragmentação, e lá podemos encontrar o *Leontopithecus chrysomelas*, primata com distribuição restrita e que se encontra em ameaça de extinção. Buscamos com este trabalho conhecer a diversidade genética do mico-leão-da-cara-dourada e assim contribuir com sua conservação. Faremos extração de DNA de pelos e sequenciaremos porções do DNA, usaremos iniciadores mitocondriais e nucleares. Com os dados em mãos, voltaremos nossas análises para medir parâmetros de genética de populações, no intuito de conhecer melhor as populações de mico-leão-da-cara-dourada e conseguir traçar metodologias específicas para conservação das diferentes populações. Poderemos ter fundamento para decidir quais áreas são prioritárias para manter a viabilidade genética da espécie, bem como quais populações apresenta maior risco de extinção eminente.

INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é considerada um *hotspot* mundial em virtude da sua riqueza, alta taxa de endemismo e do alto grau de degradação, sendo considerada como área prioritária para conservação (EKEN et al., 2004; MAYERS et al., 2000; PINTO et al., 2006). Após séculos de contínua degradação neste bioma, restam apenas fragmentos florestais ao longo da sua distribuição original.

A fragmentação é um problema na conservação da biodiversidade por afetar a quantidade e a qualidade do habitat, e isolar as populações limitando sua dispersão. Esses fatores associados afetam a sobrevivência das espécies, sendo mais drásticos em populações pequenas, endêmicas e ameaças de extinção (FRANKHAN et al., 2008; PINTO et al., 2006; TABARELLI et al., 2005).

O sul da Bahia abriga a maior parte das espécies endêmicas da Mata Atlântica em risco de extinção (TABARELLI et al., 2003). Dentre essas espécies temos *Leontopithecus chrysomelas*, - o mico-leão-da-cara-dourada - primata arbóreo nativo de uma pequena porção da Mata Atlântica. Sua distribuição original é delimitada pelo Rio de Contas (ao norte), Rio Pardo (ao Sul) e a pela mudança de vegetação e aumento da altitude (à Oeste), estimada em 19.462 km² (PINTO; RYLANDS, 1997). Porém há relatos de ocorrência do *L. chrysomelas* fora dessa distribuição original, possivelmente devido à destruição do hábitat e ao assoreamento do Rio Pardo. (ZEIGLER et al., 2013).

Das manchas de florestas que abrigam *L. chrysomelas*, aproximadamente 48% são muito pequenas e muito isoladas, e todas essas se encontram na porção Oeste da sua distribuição (ZEIGLER et al., 2013). Mesmo que 55% da área de vida do *L. chrysomelas* é na porção Oeste (PINTO; RYLANDS, 1997). O restante das manchas de floresta são funcionalmente conectadas a uma mancha florestal maior protegida por lei federal, a Reserva Biológica de UNA, com 7.059 ha (PINTO; RYLANDS, 1997; ZEIGLER et al., 2010; ZEIGLER et al., 2013).

As duas parcelas da distribuição de *L. chrysomelas* - Oeste e Leste - possuem diferenças quanto ao tipo florestal, sazonalidade climática, composição florísticas e distribuição de áreas protegidas. Como consequência, espera-se diferenças nas populações, em termos de padrões de distribuição, tamanho de grupos e área de sobrevivência e nascimentos (PINTO; RYLANDS, 1997).

Apesar do conhecimento sobre distribuição e comportamento dos *L. chrysomelas*, as informações sobre diversidade genética e taxas de endogamia são incipientes. Dados de modelagem predizem que nenhuma população de *L. chrysomelas* é capaz de manter 80% da heterozigosidade pelos próximos 100 anos; e as populações estão fadadas ao declínio de 70% em sua abundância (ZEIGLER et al., 2010; ZEIGLER et al., 2013).

Para melhor contribuir a respeito da diversidade genética e estruturação das populações, utilizaremos os conceitos de Ecologia Molecular e Genética da Conservação. Unindo técnicas e teorias da genética permitindo estimar endogamia, identificar espécies e populações em risco, resolução da estrutura de populações, definir unidades de manejo, detectar híbridos, definir melhor locais e populações para reintroduções etc., com o objetivo de minimizar o risco de extinção e preservar as espécies e sua viabilidade evolutiva (FRANKHAN et al., 2008).

OBJETIVOS

Estimaremos a diversidade genética do *Leontopithecus chrysomelas*. Desta forma, fornecer dados no intuito de estabelecer estratégias de conservação e manejo.

Para atingir este objetivo, estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

- Estimar diversidade nucleotídica e o número de sítios segregantes;
- Estimar o índice de endogamia (F_{st} , F_{sc} e F_{ct});
- Determinar o sexo através de marcadores moleculares;
- Estimar a estrutura genética com base na divergência e frequência dos haplótipos entre as populações;
- Correlacionar estruturação genética com distribuição geográfica;
- Estimar áreas prioritárias para conservação com base em dados moleculares.

JUSTIFICATIVA

É sabido que a IUCN categorizou *Leontopithecus chrysomelas* como em risco de extinção devido à alta taxa de degradação do seu habitat, à severa redução populacional e por conta do alto nível de fragmentação das populações remanescentes (KIERULFF et al., 2008; ZEIGLER, 2011). Ademais conhecemos a distribuição restrita à Mata Atlântica do sul da Bahia da *L. chrysomelas*, e as diferenças ambientais e sociais da porção Oeste e Leste de sua área de vida.

Em posse dessas informações, buscamos mais dados para diagnosticar a vulnerabilidade de *L. chrysomelas* e os efeitos genéticos inerentes às populações pequenas. Assim como entender como está estruturada a diversidade genética entre as populações, para então inferir se há fluxo entre as populações ou se não há conectividade entre as manchas.

Após análises, poderemos ser capazes de prever quais populações de *L. chrysomelas* correm risco mais eminente de extinção; quais áreas são imperativas de serem protegidas para manter a diversidade genética do mico-leão-da-cara-dourada; como poderíamos contribuir com translocações para tentar aumentar a diversidade e diminuir a endogamia.

METODOLOGIA

Amostras biológicas.

Inicialmente, serão utilizadas amostras de pelos previamente coletadas em áreas que correspondem a toda distribuição do *L. chrysomelas*. Porém poderemos realizar novas coletas para aumentar a área amostrada.

Extração de DNA.

Quando se faz necessário amplificar fragmentos de até 764 pb de pequenas quantidades de pelos (de 1-3 bulbos capilares), a literatura sugere utilizar o método de digestão por proteinase K seguida por fenol e clorofórmio (BAREA et al. ,2004).

Para tal, inicialmente cortando os pelos a 1 cm a partir do bulbo e os colocaremos em tubos (tipo Eppendorf) de 2,0 mL. A primeira etapa será de lavagem do material biológico com o acréscimo de 500 µL-1mL de TKM-1 (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM EDTA) que deixaremos agir por dez minutos a temperatura ambiente. Transcorrido o tempo determinado, os tubos serão centrifugados por cinco minutos a 10.000 rpm e a solução será descartada com o auxílio de pipeta.

Em seguida, acrescentaremos 98 µL de tampão de digestão (10 mM Tris-HCl a 0,1 M; 10 mM de EDTA a 0,2 M) e 2 µL de proteinase K e deixaremos as amostras incubadas em banho-maria por três horas, a 56°C. Para desnaturar a proteinase K, aumentaremos a temperatura do banho-maria para 100°C por oito minutos.

Para precipitar o DNA, acrescentaremos um volume de fenol e um volume de álcool isoamílico:clorofórmio (na proporção de 1:24) e submeteremos os tubos a centrifugação (cinco minutos, a 10.000 rpm).

Após, a fase aquosa da solução será transferida para novos tubos e acrescentaremos 0,1 volumes de acetato de sódio a 3 M e dois volumes de etanol 100%. Essas amostras serão encubadas por duas-doze horas, a -20°C, e então centrifugadas a 14.000 rpm, por dez minutos. O sobrenadante será descartado e deixaremos os tubos secarem a temperatura ambiente. Por fim, acrescentaremos 50 µL de água estéril para resuspende o DNA. As adequações finais quanto aos volumes, temperaturas e tempo serão refinadas no decorrer da etapa de extração.

Amplificação e sequenciamento.

Testaremos diversos Fragmentos dos genes (Tabela 1) nucleares e mitocondriais serão isolados por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, em português), utilizando os iniciadores específicos e as condições (de temperatura, tempo e concentrações dos reagentes) descritos na literatura.

Tabela 1. Características dos genes que serão testados no desenvolvimento do trabalho. Pb: pares de base.

Gene	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
ND4	710	Pastorini et al., 1998
Cytb	975	Muniz <i>et al.</i> , 2015
D-Loop	890	Tagliaro <i>et al.</i> , 1997
CDK5	226	Montgomery <i>et al.</i> , 2011
SRY	832	Whitfild <i>et al.</i> , 1993

Para fazer a sexagem das amostras utilizaremos o gene SRY (WHITFILD et al., 1993), localizado no cromossomo Y. É possível determinar o sexo das amostras pela presença da sequência (nos machos) e ausência (nas fêmeas).

Após amplificar os fragmentos de interesse, as amostras serão purificadas e sequenciadas pelo método de dideoxinucleotídeos terminais e com o auxílio do kit *BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing* (seguindo as orientações do fabricante), em sequenciador automático.

Assim como na etapa de extração de DNA, durante a etapa de amplificação e sequenciamento as condições das reações poderão ser ajustadas para otimizar os resultados.

Análises.

As sequências resultante das etapas anteriores serão, então, concatenadas e editadas manualmente no *DNA Baser Sequence Assembler* v.4.16 (HeracleBioSoft, <http://www.dnabaser.com>), alinhadas com o software BioEdit7.2.5 (HALL, 1999) e traduzidas no Mega6 (TAMURA et al., 2013) na intenção de verificar se há códons de parada.

Essas sequências serão analisadas com o intuito de medir a quantidade de variação (variabilidade genética) entre os pontos amostrados e a organização dessa

variação, assim poderemos inferir se a fragmentação e a está interrompendo o ou não do fluxo gênico.

Para tanto, utilizaremos o *Arlequin*3.01 (EXOFFIER et al., 2005) para fazer a análise de variância molecular (AMOVA) e estimaremos os índices de F_{st} , Φ_{st} , F_{ct} e F_{sc} . No DNAsp (LIBERATO; ROZAS, 2009) calcularemos a diversidade haplotípica e nucleotídica, e também poderemos estimar sobre a história demográfica das populações através do teste de neutralidade seletiva de Tajima (D de Tajima) (TAJIMA, 1989), F_s de F_u (FU, 1997) e o teste de mudança no tamanho da população (R_2) (Ramos-Onsins e Rozas, 2002). Para inferir a respeito de eventos de expansão demográfica usaremos o método *Extended Bayesian Syline Plot* (HEED; DRUMMOND, 2008) no BEAST 1.6.2 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007). Usaremos Mega6 (TAMURA et al., 2013) para determinar as unidades evolutivamente significativas (UES) pela distância intraespecífica e interespecífica, assim como a árvore de *Neighbor-Joining*.

FINANCIAMENTOS OBTIDOS OU FONTES QUE PRETENDE PEDIR FINANCIAMENTO:

Buscaremos financiamento junto com as agências publicas de fomento a pesquisa - CAPES, CNPq e FAPESB. Bem como buscaremos instituições que contribuem com financiamento de pesquisas na área da conservação; tanto nacionais - Instituto Serrapilheira - e estrangeiras - *Rufford small grant for nature conservation*; *International Foundation for Science*, *Mohamed bin Zayed Species Conservation Fund* e *Primate Conservation, Incorporated*.

REFERÊNCIAS

BAREA, Jaqueline A.; PARDINI, Maria Inês M. C.; GUSHIKEN, Tsieko. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização vem reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista brasileira hematol.**, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.

DRUMMOND, A.; RAMBAUT A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC EvolBiol**, v. 7, p. 214, 2007.

EKEN, G.; BENNUN, L.; BROOKS, T. M.; DARWALL, W.; FISHPOOL, L. D. C.; FOSTER, M.; KNOX, D.; LANGHAMMER, P.; MATIKU, P.; RADFORD, E.; SALAMAN, P.; SECHREST, W.; SMITH, M. L.; SPECTOR, S.; TORDOFF, A. Key biodiversity areas as site conservation Targets. **BioScience**, v. 54, n. 12, p. 1110-1118, December 2004.

EXCOFFIER, L.G.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **EvolBioinform Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Sociedade Brasileira de Genética: Editora SBG, 262 p., 2008.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95\98\NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Bayesian inference of population size history from multiple loci. **BMC EvolBiol**, v. 8, p. 289, 2008.

KIERULFF, M. C. M.; RYLANDS, A. B.; MENDES, S. L.; de OLIVEIRA, M. M. 2008. *Leontopithecus chrysomelas*. The IUCN red list of threatened species. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T40643A10347712.en>>. Acesso em: 07 novembro 2017.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

MEYER, Andreas L. S.; PIE, Marcio R.; PASSOS, Fernando C. Assessing the exposure of lion tamarins (*Leontopithecus* spp.) to future climate change. **American Journal of Primatology**, v. 76, p. 551–562, 2014.

MONTGOMERY, S. H.; CAPELLINI, I.; VENDITTI, C.; BARTON, R. A.; MUNDY, N. I. Adaptive evolution of four microcephaly genes and the evolution of brain size in anthropoid primates. **MolBiolEvol**, v. 28, n. 1, p. 625-638, Jan 2011.

MUNIZ, C. P.; JIA, H.; SHANKAR, A.; TRONCOSO, L. L.; AUGUSTO, A. M.; FARIAS, E.; PISSINATTI, A.; FEDULLO, L. P.; SANTOS, A. F.; SOARES, M. A.;

SWITZER, W. M. An expanded search for simian foamy viruses (SFV) in Brazilian New Worlds primates identifies novel SFV lineages and host age-related infections. **Retrovirology**, v. 12, n. 94, 2015.

PAGLIA, A. P. Análises de viabilidade populacional: quantos indivíduos? Serão suficientes? Estudo de caso para espécies ameaçadas da Mata Atlântica do sul da Bahia. In: Prado, P. I.; LANDAU, E. C.; MOURA, R. T., PINTO, L. P. S.; FONSECA, G. A. B.; ALGER, K. Corredores de biodiversidade da Mata Atlântica do sul da Bahia. Ilhéus, IESB/CI/CABS/UFGM/UNICAMP. 2003.

PASTORINI, Jennifer; FORSTNER, Michael R. J.; MARTIN, Robert D.; Melnick, Don J. A reexamination of the phylogenetic position of *Callimico* (Primates) incorporating new mitochondrial DNA sequence data. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 47, p. 32–41, 1998.

PINTO, L.P.; BEDÊ, L.; PAESE, A.; FONSECA, M.; PAGLIA, A.; LAMAS, I. Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. P. 91-118. In: C.F.D. Rocha, H.G. Bergallo, M.V. Sluys, & M.A.S. Alves (eds.). **Biologia da Conservação**: essências. São Carlos, RiMa. 2006.

PINTO, Luiz Paulo de S.; RYLANDS, Anthony B. Geographic distribution of the golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*: Implications for its management and conservation. **Folia Primatol**, v. 68, p. 161-180, 1997.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Mol BiolEvol**, v. 19, p. 2092-2100, 2002.

TABARELLI, M.; Pinto, L. P.; Silva, J. M. C.; Costa, C. M. R. The Atlantic Forest of Brazil: endangered species and conservation planning. In: **C. Galindo-Leal & I. G. Câmara** (eds.), p. 86-94. The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook. Island Press, Washington, D.C. 2003.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. V.; HIROTA, M.; BEDÊ, L. Challenges and opportunities for Biodiversity. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, June 2005.

TAGLIARO, C.H.; SCHNEIDER, M.P.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.C.; STANHOPE, M. Jliaro. Marmoset phylogenetics, conservation perspectives, and evolution of the mtDNA control region. **Mol Biol Evol.**, v. 14, n. 6, p.674-684, June 1997.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA Polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585-595, 1989.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **MolBiolEvol**, v. 30, p. 2725-2729.

WHITFIELD, L. S.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P. N. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining genen SRY. **Nature**, v. 19, n. 364, p, 713-715, Aug 1993.

ZEIGLER, S. L.; De VLEESCHOUWER, Kristel M.; RABOY, Becky E. Assessing Extinction Risk in Small Metapopulations of Golden-headed Lion Tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) in Bahia State, Brazil. **BIOTROPICA**, p. 1–8, 2013.

Zeigler, S. L.; FAGAN, W. F.; DeFRIES, R.; RABOY, B. E. Identifying important forest patches for the long-term persistence of the endangered golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*). **Tropical conservation science**, v. 3, n. 1, p. 63-77, 2010.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividades	Ano 1												Ano 2												Ano 3												Ano 4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
Disciplinas	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Captação de recurso	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Qualificação																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Redação dos manuscritos																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Intercambio (Sanduíche)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Extração de DNA e PCR	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
Sequenciamento	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Análise dos dados genéticos				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Interpretação				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Defesa																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											</

Local e data: Ilhéus, 10 de Novembro de 2017

Nome do Orientador: Fernanda Gaiotto

Assinatura do Orientador: