

TECNOLOGIAS GENÔMICAS NA CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

GENOMIC TECHNOLOGY APPLIED TO BIODIVERSITY CONSERVATION

Fabício R. SANTOS; Daniela R. LACERDA; Rodrigo A. F. REDONDO¹

RESUMO: A Genômica trouxe uma mudança de paradigma nas Ciências Biológicas com a introdução de diversas metodologias e abordagens experimentais. Os estudos dos primeiros genomas de procariotos e de eucariotos proporcionaram vislumbrar diversas aplicações e estudos não cogitados previamente. Desde o início do Projeto Genoma Humano em 1990, a informação genética contida no DNA de diversos organismos foi publicada em vários periódicos científicos. Apesar de todas as críticas feitas em relação à execução de projetos genomas, é inegável a enorme contribuição destes projetos no desenvolvimento de novos questionamentos e experimentos, o que tem acelerado, por exemplo, os estudos de Conservação da Biodiversidade. Antes dos projetos genomas era extremamente difícil estudar em detalhe a genética de espécies da fauna, da flora e de microrganismos, da forma como é feita atualmente com o advento das tecnologias genômicas. A Evolução de Charles Darwin, teoria unificadora das Ciências Biológicas, nunca foi tão testada e veementemente reafirmada através da Genômica. A Biodiversidade, produto da Evolução em pelo menos 3,5 bilhões de anos de vida na Terra, é a fonte de todos os genomas e variações entre eles. Quanto mais genomas decifrados de distintas espécies de vários Filos, Classes, Ordens, etc, mais facilitado será o estudo dos demais genomas. Atualmente a Genômica tem proporcionado estudos para o aproveitamento biotecnológico desta biodiversidade (bioprospecção), mas também para estudos nas áreas de genética da conservação e estudos evolutivos. Uma revolução está em andamento no campo da Conservação da Biodiversidade, facilitando o diagnóstico de espécies em extinção, promovendo a identificação de mecanismos genéticos ligados ao desaparecimento das espécies no ambiente natural, permitindo o monitoramento de processos de reintrodução e translocação de animais na natureza, bem como na criação ou cultivo em cativeiro, gerando conhecimento sobre a biologia e evolução das espécies, sobre as interações observadas entre espécies e entre estas e o meio abiótico.

UNITERMOS: Genômica, Biodiversidade, Genética da Conservação

INTRODUÇÃO

A Genômica apareceu no final da década de 1980 como um novo ramo da Biotecnologia capaz de gerar uma quantidade enorme de dados biológicos sobre várias espécies. Atualmente, genomas de várias espécies de eucariotos e procariotos, dos vários ambientes de nosso planeta, já foram seqüenciados. Muitos destes genomas, principalmente de bactérias e de arqueobactérias de vida livre, representam uma grande fonte de produtos e processos de aplicação biotecnológica. Em um estudo genômico recente (Venter *et al.*, 2004), foram seqüenciados 1,2 bilhões de genes previamente desconhecidos a partir de aproximadamente 1800 espécies de bactérias do Mar dos Sargassos. Esta abordagem demonstra a grande quantidade de informação que pode

ser obtida a partir da biodiversidade, principalmente de ambientes previamente inexplorados. Este enorme valor potencial da biodiversidade, principalmente nos trópicos, é que tem levado à regulamentação do acesso ao patrimônio genético em países megadiversos como o Brasil, a fim de impedir a biopirataria (Borém e Santos, 2001). No entanto, a genômica tem sido também aplicada à minimização do impacto antrópico à biodiversidade. Por exemplo, utilizando-se da tecnologia genômica, a genética da conservação auxilia no diagnóstico e monitoramento de vários processos relacionados à preservação e manejo de espécies da biodiversidade em seu hábitat natural ou em condições *ex-situ* (cativeiro, jardins zoológicos etc).

A Biotecnologia, em especial a tecnologia genômica, é atualmente uma ferramenta muito importante para preservação e valoração da biodiversidade,

¹ Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM), Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

compromisso firmado entre os países que seguem as premissas da Convenção em Diversidade Biológica (<http://www.biodiv.org>). Ferramentas genômicas permitem, por exemplo, quantificar e avaliar a diversidade genética de qualquer espécie da fauna, da flora ou de microrganismos. Esta diversidade se caracteriza pelo conjunto de todas as variações existentes no genoma de cada espécie (entre indivíduos), bem como a variação observada entre espécies. Diversidade genética, diversidade de espécies e de ecossistemas correspondem aos três níveis componentes da biodiversidade que podem ser estudados por ferramentas genômicas.

A genética da conservação é empregada atualmente em vários problemas da biologia da conservação, tais como na discriminação de espécies e/ou subespécies ameaçadas de extinção (Daugherty *et al.*, 1990; Walpole *et al.*, 2001), elaboração de estratégias de manejo reprodutivo (Geyer *et al.*, 1993; Miller, 1995), determinação do *status* de conservação de uma espécie (O'Brien *et al.*, 1985) entre outros. Ferramentas genômicas modernas foram utilizadas, recentemente, para a identificação de espécies de baleias a partir de amostras de carne apreendidas no comércio japonês e coreano (Palumbi e Cipriano, 1998; Baker *et al.*, 2000). Estes estudos comprovaram que no Japão e na Coreia estava ocorrendo o consumo de carne de espécies protegidas pela comissão internacional que regulamenta a caça de baleias.

A genética da conservação permite a avaliação a variabilidade genética intra e interespecífica buscando uma melhor compreensão da dinâmica de populações das espécies na natureza ou em cativeiro. Estes estudos podem resultar, por exemplo, na quantificação do grau de estruturação geográfica de populações naturais, na estimativa de graus de diversidade genética e consangüinidade nas populações naturais e em cativeiro, e em várias outras análises filogenéticas e filogeográficas (Avice *et al.*, 1995). A aplicação destas pesquisas é importante em vários contextos ecológicos e evolutivos.

Os estudos filogenéticos concentram-se nos problemas envolvendo a discriminação de espécies e sua classificação taxonômica. Por exemplo, através de estudos filogenéticos foram feitas a validação e a identificação de uma espécie de Tuatara (*Sphenodon guntheri*), que se acreditava fazer parte da espécie mais comum (*S. punctatus*) no arquipélago da Nova Zelândia (Daugherty *et al.*, 1990). Este estudo propiciou a elaboração de estratégias de conservação envolvendo a criação de áreas de proteção para a nova espécie de Tuatara.

Estudos de diversidade genética podem também ser empregados para quantificar graus de endogamia de populações na natureza e em cativeiro, bem como para monitorar o manejo reprodutivo e tentativas de reintrodução

de indivíduos da espécie ao meio natural. No projeto de reintrodução assistida do mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), implantado em 1984 nas reservas do Estado do Rio de Janeiro, foram utilizados animais de mais de 140 zoológicos de todo o mundo (Beck *et al.*, 1986). O número de indivíduos na natureza naquela época era bastante reduzido e as populações apresentavam-se altamente endogâmicas. Através de estudos de variabilidade genética foi possível selecionar, entre os animais oriundos de cativeiro, os indivíduos menos aparentados entre si para serem reintroduzidos nas diferentes populações naturais a fim de restaurar parte da variabilidade genética perdida na natureza. Este exemplo demonstra como a biotecnologia aplicada à conservação pode interferir de maneira efetiva no monitoramento de projetos de reintrodução e manejo de populações naturais. No caso das espécies de primatas, vários estudos de variabilidade genética puderam ser executados ainda nos primórdios da era genômica, devido ao início, em 1990, do seqüenciamento do genoma humano. No caso das espécies de Primatas, Ordem a qual nossa espécie pertence, vários estudos de variabilidade genética puderam ser executados ainda nos primórdios da era genômica, devido ao início, em 1990, do seqüenciamento do genoma humano, que é similar ao genoma de demais Primatas.

Os estudos filogeográficos, por outro lado, permitem o mapeamento espaço-temporal da diversidade genética, isto é, como se caracteriza a variabilidade genética no espaço geográfico e como esta se originou no passado evolutivo das espécies. As conseqüências destes estudos consistem, muitas vezes, na identificação de populações ou grupos de populações prioritárias para a preservação. Em alguns países esta abordagem tem proporcionado a utilização do conceito de ESU (*Evolutionary Significant Units* - ver a seguir) ou Unidades Evolucionárias Significativas (Ryder, 1986; Moritz, 1994). Desta forma, nas discussões sobre implementação de unidades de conservação utilizam-se as ESUs, consideradas grupos populacionais representativos que possuam diversidade genética suficiente para assegurar o futuro evolutivo da espécie. Esta consideração é importante para que seja feito o planejamento, a médio e longo prazo, de preservação da biodiversidade, no qual se deve levar em conta, além dos fatores antrópicos, a ocorrência de vários outros fatores evolutivos, desde aqueles de fundo genético até fatores demográficos e ambientais que podem levar as espécies naturalmente à extinção ou à especiação.

Recentemente, com o advento da clonagem (ver adiante), tem sido aventada a possibilidade da utilização deste avanço biotecnológico para preservação da biodiversidade. Esta técnica poderia, de acordo com os

mais otimistas, ser utilizada para perpetuação em laboratório de indivíduos de espécies em extinção ou até mesmo, de acordo com os “futurologistas”, para reviver indivíduos de espécies já extintas. A aplicação da clonagem para a manutenção de populações naturais é algo quase inconcebível para geneticistas da conservação e ecólogos. No entanto, a clonagem poderia ser utilizada, por exemplo, para a conscientização da população sobre o processo acelerado de extinção em massa que vive nosso planeta atualmente, promovendo-se a exposição de clones de animais em extinção nos Jardins Zoológicos. Todavia, deve ser combatida a idéia de que a clonagem possa um dia ser utilizada para impedir o processo de extinção. A clonagem é um processo de perpetuação de um ou poucos genomas e, portanto, não permite a manutenção da diversidade genética intra-específica. Atualmente, do ponto de vista genético e evolutivo, diversas espécies apresentam um número reduzido de indivíduos e, conseqüentemente,

contém baixa diversidade genética, incompatível com sua sobrevivência no meio natural a médio e longo prazo. Portanto, a preservação ou recuperação da biodiversidade no nível genético é uma das principais metas dos pesquisadores que utilizam a biotecnologia em prol da conservação das espécies.

O DIAGNÓSTICO DA EXTINÇÃO

Com o aumento da urbanização e de outras atividades antrópicas, tais como a agricultura, pecuária e industrialização, enormes extensões de vegetação natural e outros ambientes terrestres e aquáticos têm sido destruídos, levando à fragmentação dos ecossistemas. Esta fragmentação leva a uma subdivisão das populações naturais de diferentes espécies com várias conseqüências importantes (*Figura 1*).

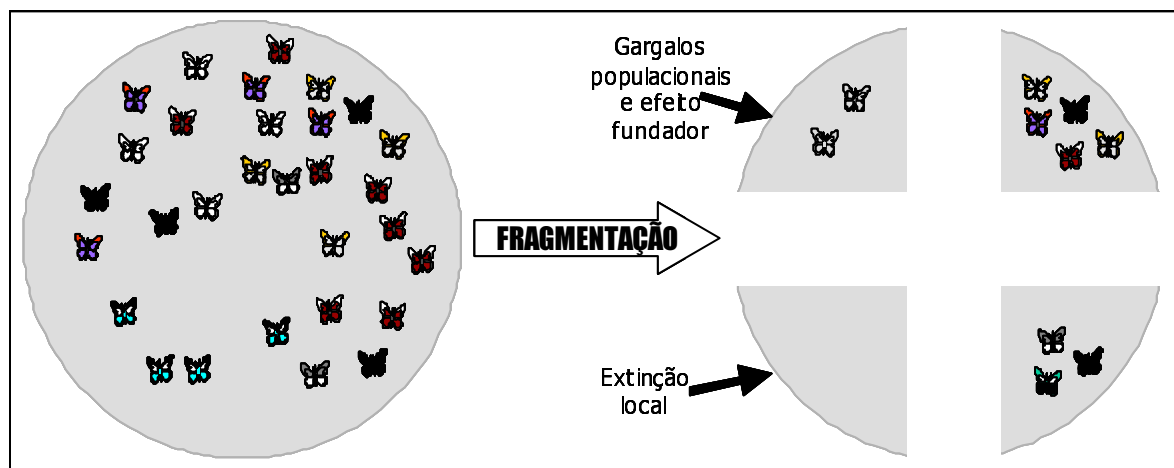


Figura 1 - Fragmentação de ecossistemas e conseqüências imediatas na biodiversidade

O processo de fragmentação habitats pode levar imediatamente a extinções locais, bem como à subdivisão de populações, o que resulta em redução e segregação aleatória de porções da diversidade total de cada espécie. Este processo pode levar ao isolamento de populações diferenciadas e, até mesmo, à evolução de populações com baixa variabilidade genética, em conseqüência de efeito fundador (ver explicação a seguir). Posteriormente ao processo de fragmentação, várias conseqüências podem resultar do isolamento populacional. Quando populações de uma mesma espécie estão isoladas (apresentam um baixo fluxo gênico entre si), estas tendem a se diferenciar geneticamente com a fixação aleatória de alelos distintos em conseqüência de processos estocásticos, tal como a deriva genética, ou ainda devido a regimes seletivos distintos atuando em cada uma das populações. Além disso,

estas populações pós-fragmentação são geralmente pequenas e apresentam uma tendência de diminuição da variabilidade genética intrapopulacional em conseqüência da endogamia. A redução da variabilidade genética limita as possibilidades que as populações têm de responder a adversidades ambientais, aumentando ainda mais o risco de extinção local. Dessa forma, a quantificação da diversidade genética intra-específica, ou seja, nas populações, pode contribuir bastante para a investigação e o monitoramento do impacto da fragmentação sobre espécies ameaçadas.

A genética da conservação é uma nova abordagem aplicada à quantificação do risco de extinção das espécies (O'Brien, 1994; Avise *et al.*, 1995). Para esta quantificação podem ser considerados vários fenômenos genéticos tais como endogamia, gargalos populacionais, efeitos fundadores, fluxo gênico, deriva

genética etc. Um dos primeiros estudos de genética da conservação foi feito com güepardos (*Acinonyx jubatus*), um felino africano em processo de extinção. Descobriu-se inicialmente que existia muito pouca variabilidade genética entre os güepardos (O'Brien *et al.*, 1983; 1985), o que sugeria que no passado, talvez 10 mil anos atrás, esta espécie teria passado por um gargalo populacional (*bottleneck*), ou seja, uma redução drástica no tamanho populacional. Os dados indicavam também que a população atual de güepardos derivaria de poucos indivíduos remanescentes, um fenômeno chamado de “efeito de fundador”. Esta baixa diversidade genética é provavelmente responsável pela fragilidade da espécie frente a adversidades ambientais, como a que afetou o centro de reprodução de güepardos em cativeiro de Oregon, nos E.U.A., resultando numa mortalidade de 60% da população local (O'Brien, 1994). Como a diversidade genética é muito baixa, a maioria dos indivíduos desta espécie responde da mesma forma às pressões ambientais, tal como a sensibilidade a doenças. Além dos estudos pioneiros com güepardos, já foram realizados estudos similares com rinocerontes negros (*Diceros bicornes*) na África (Walpole *et al.*, 2001), com o condor da Califórnia (Geyer *et al.* 1993) e com o puma (*Puma concolor*) (Culver *et al.*, 2000) nos E.U.A., com panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) na China (Zhou e Pan, 1997) e com vários outros animais ameaçados.

Uma outra aplicação prática da genética na conservação inclui estudos de populações geneticamente viáveis. Nestes estudos, o principal objetivo é estimar qual o tamanho efetivo populacional (N_e) mínimo, compatível com a persistência a médio e longo prazo das espécies. Este valor de N_e corresponde, aproximadamente, ao número médio de indivíduos (machos + fêmeas) que efetivamente contribuem reprodutivamente nas gerações. Em algumas simulações, considerando uma taxa tolerável de endogamia no máximo de 1%, foram calculados valores gerais de N_e (pode variar conforme o grupo de organismos considerado) em torno de 50 indivíduos, para a viabilidade a curto prazo, e 500, a longo prazo, para uma espécie qualquer (Frankham *et al.* 2002). Com certeza, estes valores na prática dependem de vários fatores típicos da espécie em estudo tais como seus hábitos reprodutivos, habitat, nicho ecológico etc. A definição de populações mínimas tem sido um tema de muita investigação visto a diminuição das áreas de reservas naturais e a crescente fragmentação dos habitats. Este tamanho mínimo deve ser grande o suficiente para impedir a perda do sucesso reprodutivo da espécie e permitir que haja diversidade genética bastante para que a espécie possa responder às modificações ambientais, ou seja, para que haja retenção do potencial evolutivo da espécie. Uma análise deste tipo

foi feita com o rinoceronte da Índia (*Rhinoceros unicornis*), um país onde há uma altíssima densidade populacional humana e as áreas naturais estão cada dia menores e mais degradadas. Este estudo (Frankham *et al.* 2002) concluiu que não há indivíduos suficientes para impedir, a longo prazo, a extinção do rinoceronte da Índia em consequência de endogamia ou de baixa variabilidade associada à perda da habilidade adaptativa.

Em um contexto mais amplo, os estudos de genética populacional são também utilizados em associação a outros estudos ecológicos (que medem a ameaça devido à perda de habitats, poluição, caça, introdução de espécies exóticas, etc.) para uma análise de viabilidade populacional (PVA - *population viability analysis*, Frankham *et al.* 2002). A PVA é utilizada para a predição das probabilidades de extinção das espécies. Neste processo, avaliam-se os efeitos combinados de ameaça de extinção a populações ou espécies, bem como se calculam as chances de recuperação destas sob determinadas condições de manejo. Pela incerteza dos fatores, tais como eventos climáticos cíclicos (El niño, Glaciações), este é um cálculo de probabilidades que será mais difícil de ser estimado quanto mais tempo se considera para a sobrevivência da espécie, pois a incerteza é ainda maior. Por exemplo: com a ocorrência de uma nova glaciação nos próximos 12 mil anos, se a Mata Atlântica brasileira se mantiver do mesmo tamanho (cerca de 5% da cobertura original), provavelmente uma parte significativa das espécies serão extintas, pois nestes períodos glaciais a mata se retrai ainda mais, perdendo espaço a vegetações mais adaptadas ao frio. A análise de PVA se mostra então bastante complexa, sendo feita atualmente com alguns programas como o VORTEX (Miller e Lacy, 1999). Em uma análise de PVA, os efeitos de endogamia, que podem ser medidos por estudos genéticos, freqüentemente aumentam o risco de extinção das espécies ameaçadas, mas outros fatores genéticos não podem ainda ser considerados na PVA por limitações dos próprios programas. No entanto, estudos prévios demonstraram a importância de vários fatores genéticos nos cálculos de PVA. Uma destas análises, feita com o puma da Flórida, E.U.A., predizia em 1989, um declínio da população na natureza entre 6 a 10% ao ano, com extinção provável entre 25 e 40 anos, devido principalmente aos efeitos da endogamia e de alguns fatores demográficos (Frankham *et al.* 2002).

DEFININDO POPULAÇÕES PRIORITÁRIAS PARA CONSERVAÇÃO

A especiação é um processo dinâmico e não existe um limite exato de diferenciação que possa ser apontado como o marco zero do início de uma espécie. Além disso,

determinadas populações possuem características próprias e divergentes de outras populações da mesma espécie, apresentando, portanto, contingências evolutivas separadas. Por estas características inerentes ao processo evolutivo, o conceito de espécie se torna vago sendo, muitas vezes, um empecilho para organizações que buscam traçar estratégias para a conservação da biodiversidade. Este fato levou a uma ampla utilização, por parte dos conservacionistas, de um conceito de população ameaçada que levasse em conta sua distinção evolucionária e sua representação em termos de variabilidade genética.

Ryder (1986) foi o primeiro a sugerir o termo e o uso de ESUs (Unidades Evolucionárias Significativas) para se referir a alvos prioritários para a conservação. Estas unidades foram inicialmente definidas como sendo “unidades populacionais que atualmente representam variações adaptativas significantes, baseado na concordância entre conjuntos de dados derivados de diferentes técnicas” (Ryder, 1986). Posteriormente este conceito foi descrito como “populações reprodutivamente isoladas e possuindo adaptações únicas” (Waples, 1991 *apud* Crandall *et al.*, 2000). Com a melhora dos métodos de inferência filogenética e filogeográfica, alguns autores sugeriram que as populações selecionadas para conservação fossem aquelas de descendência monofilética, isto é que apresentavam história evolutiva distinta das demais (Moritz, 1994).

Atualmente, o conceito de ESUs relativo às populações isoladas e monofiléticas, é bastante utilizado na prática conservacionista. Para a caracterização de uma ESU, geralmente são feitos estudos de filogeografia e de genética populacional clássica com dados de variações no DNA. A análise filogeográfica tenta identificar as ESUs estudando a diversidade genética intra-específica no tempo e no espaço (Avice *et al.* 1995; Hewitt, 2001). A possibilidade de se realizar estudos de distribuição da variabilidade genética no passado da espécie e no espaço geográfico de sua distribuição atual, tem aumentado muito o nosso conhecimento em biogeografia e evolução. Estes estudos podem desvendar as relações de ancestralidade comum, populações antigas e recentes, rotas de migração e padrões de dispersão das espécies (Avice *et al.*, 1995; Hewitt, 2001). Conhecendo a presente estrutura da variabilidade genética populacional (Excoffier *et al.*, 1992) e como ela foi gerada no passado evolutivo da espécie (Hewitt, 2001), podemos traçar planos de manejo considerando populações importantes evolutivamente, as ESUs, que são identificadas pela filogeografia.

Alguns autores, no entanto, criticam esta aplicação das ESUs (Crandall *et al.*, 2000) alegando, principalmente, que marcadores moleculares neutros (como o DNA mitocondrial) comumente utilizados, podem não representar

corretamente a diversidade das populações em termos adaptativos, e é justamente esta diversidade que é necessária para assegurar a persistência da espécie evolutivamente. Além disso, o uso da monofilia como conceito de ESU utilizando DNA mitocondrial, sugerida por Moritz (1994), parece só ser aplicável aos animais e não às plantas (Crandall *et al.*, 2000).

Apesar das críticas à utilização de marcadores neutros, como DNA mitocondrial e microssatélites, estas metodologias têm conseguido diagnosticar com sucesso as populações divergentes evolutivamente e importantes como reservatórios de variabilidade genética das espécies (Hedrick, 2001). A aplicação do conceito de ESU continua ainda bastante subjetivo, existindo uma tendência de retorno à sua definição original (Ryder, 1986), com a associação do máximo de informações de diferentes fontes. Desta forma, dados de ecologia, história natural, fisiologia e até comportamentais podem ser somados aos dados filogeográficos e de genética de populações para a definição de populações prioritárias para a conservação. Independente da definição, o conjunto de ESUs deve possuir variabilidade genética significativa que represente um potencial adaptativo suficiente para assegurar o futuro evolutivo da espécie, garantindo sua persistência no hábitat natural.

O MONITORAMENTO DAS POPULAÇÕES NATURAIS

O manejo das populações naturais com finalidade conservacionista tem revelado que diversos fatores genéticos importantes devem ser avaliados. Dentre estes, os efeitos da endogamia têm sido considerados fatores limitantes à persistência a médio e longo prazo das populações naturais (Frankham *et al.*, 2002; Keller e Waller, 2002).

A endogamia pode ser definida como o acasalamento entre indivíduos relacionados por ancestralidade comum recente (com parentesco). Um dos efeitos da endogamia é a *depressão endogâmica*, que é a queda do valor adaptativo (*fitness*) de uma população ao longo das gerações causada pelo aumento da homozigose para caracteres deletérios, levando a manifestações de doenças, baixa fecundidade etc (Frankham *et al.*, 2002). A homozigose também pode aumentar em situações de acasalamentos preferenciais entre parentes mesmo em populações grandes, mas em populações pequenas há um aumento da identidade por descendência e, portanto, maior chance de consangüinidade. Outro efeito da endogamia, que traz conseqüências menos drásticas a curto e médio prazo do que a depressão endogâmica é a *carga genética* que está relacionada a uma redução no valor adaptativo médio da

população, quando comparado ao de uma população equivalente sem consangüinidade (Hedrick, 2001). O impacto destes efeitos no risco de extinção das espécies é inversamente proporcional ao tamanho da população (Keller e Waller, 2002). Alguns estudos prévios têm apontado alguns números gerais sobre o efeito da endogamia. Dentre estes, considera-se que a maior taxa de endogamia tolerável para populações na natureza seja de 1% (Frankham *et al.*, 2002). No entanto, o risco de extinção associado ao nível de endogamia varia muito dependendo dos táxons estudados, das populações e até mesmo do ambiente em que vivem (Keller e Waller, 2002). Teoricamente, a depressão endogâmica pode trazer conseqüências como a redução drástica no tamanho populacional que pode levar à extinção local ou completa da espécie, dependendo da estrutura populacional (Hedrick 2001). Apenas um caso de extinção por conseqüência da endogamia foi documentado em populações naturais até hoje (em borboletas da espécie *Melitaea cinxia*, Saccheri *et al.*, 1998), mas seu efeito deletério já foi registrado em populações naturais e em cativeiro de várias espécies (O'Brien, 1994, Frankham *et al.*, 2002). Contudo, além de ser vista como um possível fator acelerador da extinção, a depressão endogâmica tem sido mais considerada como uma conseqüência do processo de fragmentação de ecossistemas e subdivisão populacional (Frankham *et al.* 2002). Por isso o diagnóstico e a quantificação da endogamia e seus efeitos têm sido metodologias constantes nas avaliações de viabilidade populacional e risco de extinção das espécies. Além disto, diversos programas de reprodução assistida e reintrodução ao hábitat natural incluem o monitoramento genético das populações a fim

de serem minimizados os efeitos da endogamia, principalmente nas espécies em extinção com poucos indivíduos remanescentes. Alguns exemplos de aplicação prática da genética e biologia molecular, auxiliando a conservação e o manejo de populações naturais, serão citados a seguir.

Em meados dos anos 90, foi feito um estudo com cavalos de Przewalski (*Equus przewalskii*), a partir de um grupo de doze indivíduos de cativeiro remanescentes desta espécie e de um cavalo doméstico. Estes animais fizeram parte de um programa de reprodução assistida que posteriormente levou à reintrodução de vários indivíduos desta espécie no ambiente natural, na Mongólia. Aparentemente, toda a população atual descende destes 13 indivíduos e análises genéticas têm sido utilizadas para tentar diminuir a consangüinidade e evitar os efeitos dos cruzamentos endogâmicos indesejáveis (Miller, 1995; Van Dierendonck *et al.*, 1996).

No Brasil, a espécie mico-leão-dourado foi pioneira no uso da genética no processo de reintrodução e monitoramento de populações naturais (Figura 2). O número de indivíduos em 1970 era muito pequeno, com cerca de 200 micos, e suas populações possuíam um alto nível de endogamia. Utilizou-se a genética molecular para a determinação do nível de parentesco entre os animais de cativeiro. Assim, foi possível planejar a reintrodução destes animais nas diferentes unidades de conservação procurando a diminuição do nível endogâmico. Atualmente a população já passa de mil indivíduos (Beck e Martins, 2001) e o nível de endogamia monitorado nas populações naturais está bem reduzido com a introdução de mais de 470 animais nascidos em cativeiro.

Mico-Leão-Dourado - *Leontopithecus rosalia*

Em 1970 a população natural era de 200 indivíduos, devido principalmente à perda de hábitats. Estas populações apresentavam alto índice de endogamia e, a partir de 1984 foi feito um programa de reintrodução com animais provenientes de 140 zôos de vários países. Neste processo foi utilizada a análise de parentesco com testes de DNA para ser minimizado o efeito da endogamia.



Figura 2 - Reintrodução e monitoramento de populações naturais de mico-leão-dourado

Recentemente, Caparroz *et al.* (2001) realizaram estudos de variabilidade genética com a ararinha azul (*Cyanopsitta spixii*), nos quais foram amostrados sete dos trinta e nove animais existentes em cativeiro (Figura

3). Apesar de apenas um dos animais amostrados ter realmente nascido em cativeiro, a variabilidade genética observada sugeria uma altíssima consangüinidade. Um destes animais poderia ser selecionado como parceiro do

único exemplar livre na natureza, mas o plano foi frustrado pelo trágico desaparecimento deste indivíduo no final de 2000 na região de caatinga no vale do Rio São Francisco, na Bahia. Contudo, a reprodução em cativeiro poderá ser

futuramente utilizada na geração de indivíduos para uma possível reabilitação da espécie ao ambiente natural, embora a maior parte da diversidade genética original já esteja extinta.

Ararinha azul - *Cyanopsitta spixii*

Em 1980 começou uma campanha para recuperação da espécie que estava ameaçada de extinção. A criação de unidades de conservação e a conscientização da população local não foram suficientes e o último exemplar vivo na natureza desapareceu no final de 2000, um macho de pelo menos 20 anos de idade. Os estudos genéticos para reintrodução dos animais de cativeiro revelam que há baixíssima variabilidade nestes indivíduos.



Figura 3 - A última ararinha azul desapareceu da natureza em outubro de 2000.

Um outro caso bem estudado ocorreu na Flórida, E.U.A., com as populações locais de pumas (*Puma concolor*). Estas populações possuíam uma história natural de isolamento que foi intensificada por pressões antrópicas, resultando atualmente na existência de apenas uma única e pequena população natural (Roelke *et al.*, 1993). Esta população foi diagnosticada como tendo baixíssima variabilidade genética e conseqüente depressão endogâmica. Por isto diversas características desvantajosas se manifestavam, como a redução unilateral dos testículos, baixa contagem de esperma e vários defeitos anatômicos (Roelke *et al.*, 1993, Hedrick, 1995). Para remediar esta situação um programa para a translocação de pumas vindos de populações do Texas foi iniciado em meados da década de 1990 (Land e Lacy 2000). A translocação foi um sucesso e a redução nos fenótipos indesejados foi registrada na geração seguinte, sendo que um dos defeitos anatômicos foi completamente eliminado da população e outros reduziram de 93% para 14% de incidência (Hedrick, 1995). No entanto, verificou-se que parte deste sucesso se deu também pela reintrodução não programada de espécimes da América do Sul (O'Brien *et al.*, 1990).

Contudo, a translocação de indivíduos de populações distintas deve ser feita com muita cautela. Quando duas populações estão isoladas há muito tempo, as diferenças genéticas acumuladas podem ser muito grandes a ponto de que a formação de híbridos entre indivíduos das populações divergentes pode ser danosa (Templeton *et al.*, 1986, Edmands, 1999). Este efeito é chamado de depressão exogâmica e pode estar associado

a dois fatores distintos de divergência populacional: as adaptações locais e as co-adaptações gênicas ou complexos gênicos coadaptados (Templeton *et al.*, 1986).

As adaptações locais se devem ao acúmulo de variantes gênicas específicas que conferem maior adaptação ao ambiente em que se localiza a população, isto é, populações em diferentes ambientes tendem a fixar alelos diferentes que conferem vantagem adaptativa. O inter cruzamento de animais, oriundos de populações com adaptações locais distintas, pode resultar em filhotes que apresentam um fenótipo intermediário ou uma mistura de diferentes características. Geralmente estes híbridos intra-específicos não são adaptados a nenhum dos dois ambientes, levando a uma diminuição na taxa de sobrevivência (Edmands, 1999; Templeton *et al.*, 1986). O exemplo clássico de depressão exogâmica devido a diferentes adaptações locais ocorreu com a população de íbex (*Capra ibex*), um cabrito selvagem das montanhas Tatra da Eslováquia (Grieg 1979 *apud* Templeton *et al.*, 1986). Após extinção local, animais adaptados ao frio da montanha foram trazidos inicialmente da Áustria para repovoar a área, mas, posteriormente, com a finalidade de aumentar a população local, foram translocados indivíduos da Turquia e do Sinai, oriundos de populações adaptadas ao deserto. Nas montanhas geladas do Tatra (*Figura 4*), os híbridos entre indivíduos das distintas populações entravam no cio mais cedo, durante o outono, e os filhotes nasciam em fevereiro, o mês mais frio do inverno. Como conseqüência, a população inteira se extinguiu por causa da depressão exogâmica (Grieg 1979 *apud* Templeton *et al.*, 1986).



Figura 4 - Depressão exogâmica levou à extinção do íbex nas montanhas Tatra.

A ruptura de complexos de genes co-adaptados é uma segunda forma de depressão exogâmica. Diferentes complexos gênicos são estabelecidos em populações isoladas, cada uma possuindo uma combinação específica de alelos de distintos genes. O valor adaptativo dos indivíduos em cada população depende da interação alélica selecionada nestes complexos co-adaptados. Esta co-adaptação gênica também pode se dar no nível cariotípico, tal como nas populações divergentes que possuem distintos cariótipos. Quando se dá o intercruzamento de indivíduos de populações divergentes, a co-adaptação gênica pode ser rompida e distintas combinações alélicas aparecem nos híbridos podendo levar a uma redução do valor adaptativo destes indivíduos (Templeton *et al.*, 1986).

Aparentemente as populações se recuperam mais rapidamente da depressão exogâmica do que da endogâmica (Templeton *et al.*, 1986), mas este fator aumenta ainda mais a importância de um monitoramento genético detalhado nos programas de reintrodução e translocação de populações de espécies em extinção.

Outro problema que a genética da conservação está abordando é a identificação de híbridos entre espécies na natureza. Os híbridos ocorrem naturalmente em regiões de simpatria de duas espécies filogeneticamente aparentadas, mas muitas das hibridizações observadas atualmente parecem resultar de processos de fragmentação antrópica ou pela translocação artificial de populações.

Muitas vezes os híbridos interespecíficos são estéreis ou passam a ser estéreis após poucas gerações de cruzamentos com as espécies parentais. Estes híbridos estéreis podem acelerar o próprio processo de extinção em espécies já com número bastante reduzido de indivíduos. Porém, em outros casos estes híbridos são férteis e podem cruzar com uma ou ambas espécies parentais causando a introgressão de genes que não pertencem originalmente a cada uma das espécies. Essa introgressão pode causar efeitos semelhantes aos da depressão exogâmica, porém na maioria dos casos estes efeitos são ainda mais graves.

Outro problema relacionado à existência de híbridos reflete diretamente nas ações de manejo das espécies. Algumas populações híbridas foram erroneamente classificadas como espécies próprias, como o lobo vermelho (Ex. *Canis rufus*) dos Estados Unidos (O'Brien e Mayr, 1991; Wayne e Jenks, 1991), que era considerado uma espécie distinta do lobo cinzento (*Canis lupus*) (ver Figura 5). Análises filogenéticas com DNA mitocondrial e marcadores de microssatélites mostraram que os lobos vermelhos são na verdade híbridos entre lobos cinzentos e coiotes (*Canis latrans*) (Wayne e Jenks, 1991; Reich *et al.*, 1999). Por serem híbridos, há agora nos E.U.A. uma grande discussão sobre a existência de áreas de proteção ao lobo vermelho, que até pouco tempo constava como uma “espécie” em risco de extinção (O'Brien e Mayr, 1991).

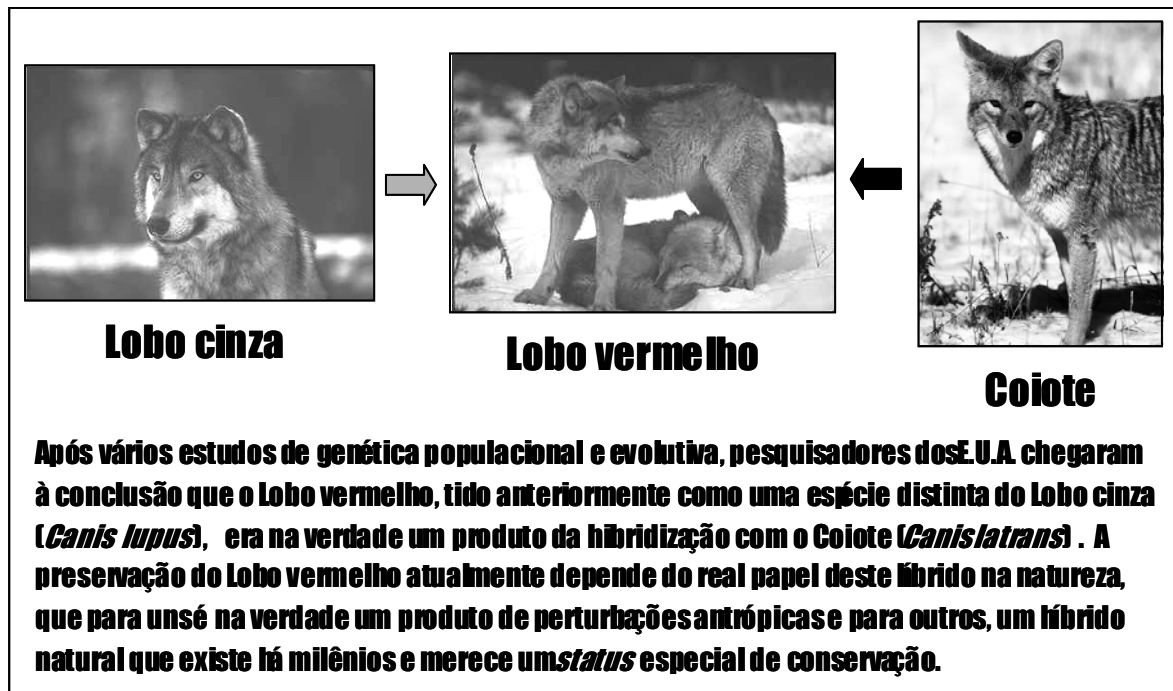


Figura 5 - A história de preservação do lobo vermelho nos E.U.A.

Utilizando marcadores moleculares aleatórios, Lacerda *et al.* (2002) identificaram uma possível população híbrida entre duas importantes espécies de leguminosas: o vinhático do cerrado (*Plathymenia reticulata*) e o vinhático da mata (*Plathymenia foliolosa*). A detecção de uma população híbrida poderia levantar diversas questões importantes, inclusive a possibilidade de que as duas não fossem espécies distintas, ainda que diferentes marcadores espécie-específicos tenham sido descritos (Heringer, 1956; Heringer e Ferreira, 1972; Matos *et al.*, 1984; Lacerda *et al.*, 2002). Recentemente, dois importantes taxonomistas de plantas sugeriram, com base em caracteres morfológicos e no estudo de Lacerda *et al.* (2002), que o gênero *Plathymenia* deve de fato ser considerado mono-específico, com *P. reticulata* sendo a única espécie do gênero e apresentando variantes morfológicas em decorrência das características de solo e umidade dos diferentes locais onde ocorre (Warnick e Lewis, 2003).

Uma outra aplicação importante da biologia molecular em estudos com plantas, consiste na identificação de sistemas de cruzamento predominantes e seu papel na diferenciação genética de populações, e ainda na identificação dos principais mecanismos de fluxo gênico. Recentemente, em uma pesquisa envolvendo o Pequi (*Caryocar brasiliense*), uma espécie ameaçada do Cerrado Brasileiro, constatou-se, através da utilização de marcadores nucleares e de cloroplasto, que a dispersão de pólen atualmente é muito superior à dispersão de sementes (Collevatti *et al.*, 2001; 2003). Este achado, provavelmente associado à extinção de grandes mamíferos (megafauna) responsáveis pela dispersão das sementes, em conjunto com fatores históricos que incluem as mudanças climáticas do Quaternário, permite explicar o porquê da alta subdivisão genética populacional encontrada nesta espécie, com diferentes linhagens em cada região amostrada e múltiplas linhagens dando origem às populações atuais do Cerrado Brasileiro (Figura 6).



Figura 6 – O Pequi do Cerrado Brasileiro e o papel de dispersão da megafauna.

RECUPERAÇÃO DE ANIMAIS EM EXTINÇÃO E JÁ EXTINTOS

Diante da tecnologia atual de clonagem a partir de células somáticas uma nova abordagem tem sido discutida: a produção em laboratório de animais em extinção ou já extintos (Cohen, 1997). A clonagem já foi utilizada em laboratório para gerar um clone do Gauro (*Bos gaurus*), uma espécie de boi selvagem asiático com pouquíssimos indivíduos remanescentes na natureza (Lanza *et al.*, 2000). Foi utilizado um método de transferência nuclear interespecífica onde introduziu-se um núcleo da célula de um Gauro selvagem nos ovócitos enucleados de vaca doméstica (*Bos taurus*). Após gestação no útero da vaca doméstica, o bezerro Gauro sobreviveu por dois dias, morrendo de disenteria. Mesmo assim, esta estratégia se mostrou possível e aplicável a espécies em extinção. Subseqüentemente, foi clonado um indivíduo da subespécie rara de ovelha *Mouflon* (*Ovis orientalis musimon*) utilizando o núcleo de um indivíduo *Mouflon* recentemente morto e a espécie de ovelha doméstica (*Ovis aries*) como doadora de ovócitos enucleados e de útero para a gestação. O clone nascido sobreviveu e foi reintroduzido em uma unidade de conservação, consistindo no primeiro caso de reintrodução do clone de uma espécie em extinção à sua população natural.

Vários grupos de pesquisa já propuseram a aplicação da clonagem para espécies extintas. O último *Bucardo* (*Capra pyrenaica pyrenaica*), uma espécie

espanhola de cabra, foi morto no ano de 2000 e atualmente estão tentando obter o primeiro clone desta espécie extinta através de uma amostra de tecido congelada em 1999. No entanto, para a grande maioria dos animais extintos, quando há algum tecido remanescente este possui DNA altamente degradado. A estratégia proposta para clonar estes animais inclui a utilização de porções do genoma extraídas de tecidos menos afetados como partes congeladas de mamutes ou de um feto de Tilacino (Tigre da Tasmânia) preservado em álcool. Várias abordagens foram propostas para a recuperação das células com o genoma destes animais. Uma destas prevê o seqüenciamento completo dos genes e montagem de cromossomos artificiais para geração *de novo* do genoma extinto que deveria ser introduzido em uma célula de uma espécie relacionada. Alternativamente, os fragmentos do genoma extinto poderiam ser introduzidos nos cromossomos de espécies relacionadas produzindo indivíduos transgênicos, que teriam parte do genoma vindo do animal extinto. Subseqüentes adições de fragmentos do genoma extinto iriam transformando gradativamente, ao longo das várias gerações, animais existentes, como o Elefante indiano e o Diabo da Tasmânia, nos extintos Mamute e Tilacino, respectivamente.

Todas as idéias a respeito da recuperação de espécies há muito tempo extintas são atualmente consideradas apenas como ficção ou meras anedotas científicas. Entretanto, a revitalização do Tilacino tem sido vista como uma grande possibilidade na Austrália, com

apoio do governo, museus e grande parte da sociedade (<http://www.austmus.gov.au/thylacine>).

No entanto existem vários problemas associados ao tema da clonagem aplicada a animais em extinção ou já extintos. Esta idéia poderia, por exemplo, levar muitas pessoas a acreditarem que a clonagem realmente salvará os animais da extinção uma vez que poderão ser “refeitos” em laboratório sempre que necessário. Com esta idéia em mente, a preservação de habitats poderia ser facilmente colocada em segundo plano, usando-se como desculpa a possibilidade da recuperação dos animais via clonagem, o que seria inaceitável. Outro problema diz respeito à clonagem em si, considerando a possibilidade de que esta seja, no futuro, uma metodologia corriqueira e de ampla utilização. A clonagem é um processo de multiplicação de um ou poucos indivíduos, e conseqüentemente não pode ser usada para recuperar a diversidade genética original da espécie. A clonagem em massa a partir de poucos indivíduos poderia reconstituir uma população com baixíssima variabilidade genética e, portanto, com poucas chances de sucesso reprodutivo e persistência a médio e longo prazo na natureza.

O FUTURO DA BIODIVERSIDADE

Atualmente, é muito provável que estejamos vivenciando a maior extinção em massa de todos os tempos (Leakey e Lewin, 1996). A taxa de espécies que estão se extinguindo é muito maior do que a taxa com que novas espécies se originam, uma razão que é enorme quando comparada com as outras extinções em massa de nosso passado evolutivo, tal como a que extinguiu os dinossauros no final do Cretáceo. As principais causas desta extinção são de natureza antrópica, intensificadas pela superpopulação humana mundial, hoje acima de 6,4 bilhões de pessoas. Diante dos problemas imediatos que afetam a nossa própria espécie, os problemas com as demais espécies da biodiversidade parecem muito pequenos para nós. Mesmo que esta extinção, acelerada pela destruição de habitats naturais, traga conseqüências drásticas a médio e longo prazo para a própria espécie humana, são ainda poucos os esforços globais para a desaceleração deste processo. No entanto, a tecnologia genômica tem tornado possível o diagnóstico de que este processo de extinção é ainda mais acelerado do ponto de vista molecular, ou seja, na diversidade genética. A abordagem molecular pode permitir o cálculo do risco de extinção da espécie antes mesmo que esta conste das listas elaboradas pelos órgãos de defesa ambiental. O diagnóstico prévio da probabilidade de extinção local de populações pode ser utilizado para elaboração de estratégias de preservação e recuperação ambiental aplicadas às espécies de interesse.

Atualmente, cada país mantém unidades de conservação que foram criadas por razões diversas, mas grande parte serve à preservação de algumas espécies chave ou espécies “bandeira” de animais e vegetais. A tecnologia genômica pode ser, então, aplicada à identificação de populações representativas da diversidade genética total da espécie chave. Esta abordagem é útil no caso de restrições políticas e orçamentárias que limitam a implementação de unidades de conservação e inviabilizam a preservação de uma determinada espécie em toda sua distribuição. Se a escolha de populações é inevitável, a identificação das ESUs como populações prioritárias para preservação pode ser uma alternativa menos desastrosa para a biodiversidade.

Outro ponto fundamental sobre a questão do desaparecimento das espécies em nosso planeta é o nosso desconhecimento acerca da biodiversidade (Blackmore, 1996). Estima-se que uma quantidade enorme de espécies tenha se extinguido nos últimos três séculos, principalmente nas áreas tropicais. As estimativas atuais sugerem em torno de 30 mil espécies extintas a cada ano. Das espécies existentes na Terra, talvez não conheçamos cientificamente 10% do total (1,7 milhões de espécies estão catalogadas). O uso da sistemática molecular pode nos auxiliar na identificação e catalogação taxonômica de diversas espécies ainda desconhecidas ou confundidas com espécies afins. Além disto, se não conhecemos ainda a vasta maioria das espécies, o que dizer então sobre a quantidade de funções bioquímicas e fisiológicas, representadas por distintas proteínas, sistemas metabólicos e outras substâncias, que estão presentes nestes genomas e são desconhecidas da ciência. Várias aplicações na indústria de fármacos e cosméticos, de alimentos, de combustíveis e de outros materiais, estão sendo abolidas com o processo de extinção.

A tecnologia genômica não irá impedir a extinção, mas com certeza, associada a vários tipos de iniciativas de preservação dos habitats naturais, poderá retardar o processo ou reduzir suas conseqüências catastróficas. Com o uso de produtos provenientes do conhecimento das espécies silvestres podemos agregar valor à nossa biodiversidade, mas isto não pode ser motivo para mais degradação, extrativismo descontrolado e biopirataria. A consciência coletiva da importância da biodiversidade para nossa persistência na Terra, a médio e longo prazo, deve ser alcançada também com o auxílio da genômica. Talvez até mesmo a clonagem possa ter seu papel na criação desta consciência de preservação ambiental, mostrando o contraste entre os organismos que vieram do laboratório (clones) e aqueles que foram moldados na natureza pela Evolução e que jamais poderão ser completamente reconstituídos pelo homem.

AGRADECIMENTOS

Esta revisão foi estimulada pelos projetos de pesquisa em biodiversidade feitos em nosso laboratório,

com fomento do programa PELD/CNPq, do Fundo Fundep da PRPq/UFMG e da Fundação o Boticário de Proteção à Natureza, bem como a todos os estudantes e técnicos do LBEM que tem conduzido estes projetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVISE J.C.; HAIG S.M.; RYDER O.A.; LYNCH M.; GEYER C.J. Descriptive genetic studies: applications in population management and conservation biology. In: Ballou, J.D. e Fose, T.J. (Ed.) **Population management for survival and recovery**. Columbia University Press, New York. 1995. pp. 183-244.
- BAKER, C.S.; LENTO, G.M.; CIPRIANO, E.; PALUMBI, S.R. Predicted decline of protected whales based on molecular genetic monitoring of Japanese and Korean markets. **Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences** 267: 1191-1199. 2000.
- BECK, B.B.; MARTINS, A.F. Update on the golden lion tamarin reintroduction program. **Tamarin Tales** 5: 7-8. 2001.
- BECK, B.B.; DIETZ, J.M.; KLEIMAN, D.G.; CASTRO, M.I.; LÉMOS DE SÁ, R.M.; LUZ, V.L.F. Projeto Mico-Leão IV. Reintrodução de micos-leões-dourados (*Leontopithecus rosalia* Linnaeus, 1766) (Callitrichidae, Primates) de cativeiro para seu ambiente natural. In **A primatologia no Brasil** 2, pp. 243-248 (M.T. de Mello, ed.). Sociedade Brasileira de Primatologia, Brasília, D.F. 1986.
- BLACKMORE, S. Knowing the Earth's Biodiversity: Challenges for the Infrastructure of Systematic Biology. **Science** 274: 63 – 64. 1996.
- BORÉM, Aluizio; SANTOS, Fabrício Rodrigues. **Biotecnologia Simplificada**. Editora Suprema, Visconde do Rio Branco, MG, 2001. 250 pp.
- CAPARROZ, R.; MIYAKI, C.Y.; BAMPI, M.I.; WAJNTAL, A. Analysis of the genetic variability in a sample of the remaining group of Spix's Macaw (*Cyanopsitta spixii*, Psittaciformes: Aves) by DNA fingerprinting. **Biological Conservation** 99: 307-311. 2001.
- COHEN, J. Can Cloning Help Save Beleaguered Species? **Science** 276: 1329–1330. 1997.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. High resolution microsatellite based analysis of mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, and endangered tropical species. **Heredity** 86: 60-67. 2001.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology** 12: 105-115. 2003.
- CRANDALL, K.A.; BININDA-EMONDS, O.R.P.; MACE, G.M.; WAYNE, R.K. Considering evolutionary processes in conservation biology. **Trends in Ecology and Evolution** 15: 290-295. 2000.
- CULVER M.; JOHNSON, W.E.; PECON-SLATTERY, J.; O'BRIEN, S.J. Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). **Journal of Heredity** 91: 186-197. 2000.
- DAUGHERTY, C.H.; CREE, A.; HAY, J.M.; THOMPSON, M.B. Neglected taxonomy and continuing extinctions of tuatara (*Sphenodon*). **Nature** 347: 177–179. 1990.

- EDMANDS S. Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. **Evolution** 53: 1757-1768. 1999.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA data. **Genetics** 131: 479-491. 1992.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Conservation Genetics**. Cambridge University Press: Cambridge UK. 2002. 617 pp.
- GEYER, C.J.; RYDER, O.A.; CHEMNICK, L.G.; THOMPSON, E.A. Analysis of relatedness in the California condors from DNA fingerprints. **Molecular Biology and Evolution** 10: 571-589. 1993.
- HEDRICK, P.W. Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. **Conservation Biology** 9: 996-1007. 1995.
- HEDRICK, P.W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology and Evolution** 16: 629-636. 2001.
- HERINGER, E.P. O gênero *Plathymania*. In: **Annais da Sociedade Botânica do Brasil**, São Paulo, 1956. p. 55-64.
- HERINGER, E.P.; FERREIRA, M.B. Árvores úteis no cerrado (I): Vinhático – o gênero *Plathymania* Benth. *P. foliolosa* Benth. e *P. reticulata* Benth., vinhático da mata e vinhático do campo (par vicariante). **Cerrado** 5: 28-34. 1972.
- KELLER, L.F.; WALLER, D.M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology and Evolution** 17: 230-241. 2002.
- HEWITT, G.M. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. **Molecular Ecology** 10: 537-549. 2001.
- LACERDA, D.R.; LEMOS FILHO, J.P.; ACEDO, M.D.P.; LOVATO, M.B. Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymania foliolosa* and *P. reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution**, 235: 67-77. 2002.
- LAND, D.E., LACY R.C. Introgression level achieved through Florida Panther genetic restoration. **Endangered species update**. 17: 99-103. 2000.
- LANZA R.P.; CIBELLI J.B.; DIAZ F.; MORAES C.T.; FARIN P.W.; FARIN C.E.; HAMMER C.J.; WEST M.D.; DAMIANI, P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning** 2: 79-90. 2000.
- LEAKEY, R.; LEWIN R. **The Sixth Extinction: Patterns of of Life and the Future of Humankind**. Doubleday and Company. 1996. 288 pp.
- MATOS, F.J.A.; CRAVEIRO, A.A.; MAURERA, M.A.M.A. Furan diterpenes of the *Plathymania* genus. **Journal of Natural Products** 47: 581-584. 1984.
- MILLER, P.S. Selective breeding programs for rare alleles: examples from the Przewalski's horse and California condor pedigrees. **Conservation Biology** 9: 1262-1273. 1995.
- MILLER, P.M.; LACY, R.C. **VORTEX: a stochastic simulation of the extinction process. Version 8 User's Manual**. Conservation Breeding Specialist Group. (SSC/IUCN), Apple Valley, MN. 1999. 51 pp.
- MORITZ, C. Defining "evolutionary significant units" for conservation. **Trends in Ecology and Evolution** 9: 373-375. 1994.

- O'BRIEN, S.J.; WILDT, D.E.; GOLDMAN, D. MERRIL, C.R.; BUSH, M. The cheetah is pauperate in genetic variation. **Science** 221: 459-462. 1983.
- O'BRIEN, S.J.; ROELKE, M.F.; MARKER, L.; NEWMAN, A.; WINKLER, C.A.; MELTZER, D.; COLLY, L.; EVERMANN, J.F.; BUSH, M.; WILDT, D.E. Genetic Basis For species vulnerability in the cheetah. **Science** 227: 1428-1434. 1985.
- O'BRIEN, S.J.; ROELKE, M.F.; YUKHI, M.; RICHARDS, K.W.; JOHNSON, W.E.; FRANKLIN, W.L.; ANDERSON, A.E., BASS, O.L.J.; BELDEN, R.C.; MARTENSON, J.S. Genetic introgression within the Florida panther *Felis concolor coryi*. **National Geographic Research** 6: 485-494. 1990.
- O'BRIEN, S.J.; Mayr, E. Species hybridization and protection of endangered animals. **Science** 253: 251-252. 1991.
- O'BRIEN, S.J. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 91: 5748-5755. 1994.
- PALUMBI, S.R.; CIPRIANO, F. Species identification using genetic tools: The value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. **Journal of Heredity** 89: 459-464. 1998.
- REICH, D.E.; WAYNE, R.K.; GOLDSTEIN, D.B. Genetic evidence for a recent origin by hybridization of red wolves. **Molecular Ecology** 8: 139-144. 1999.
- ROELKE, M.E., MARTENSON, J.S.; O'BRIEN, S.J. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. **Current Biology** 3:340-350. 1993.
- RYDER, O.A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends in Ecology and Evolution** 1: 9-10. 1986.
- SACCHERI, I.; KUUSSAARI, M.; KANKARE, M.; VIKMAN, P.; FORTELIUS, W.; HANSKI, I. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. **Nature** 392: 491-494. 1998.
- TEMPLETON, A. R., H. HEMMER, G. MACE, U. S. SEAL, W. M. SHIELDS, D. S. WOODRUFF. Local adaptation, coadaptation, and population boundaries. **Zoo Biology** 5: 115-125. 1986.
- VAN DIERENDONCK, M.C. E WALLIS DE VRIES, M.F. Ungulate reintroductions: experiences with the Takhi or Przewalski horse (*Equus ferus przewalskii*) in Mongolia. **Conservation Biology** 10: 728-740. 1996.
- VENTER, J.C., REMINGTON, K., HEIDELBERG, J.F., HALPERN, A.L., RUSCH, D., EISEN, J.A., WU, D., PAULSEN, I., NELSON, K.E., NELSON, W., FOUTS, D.E., LEVY, S., KNAP, A.H., LOMAS, M.W., NEALSON, K., WHITE, O., PETERSON, J., HOFFMAN, J., PARSONS, R., BADEN-TILLSON, H., PFANNKOCH, C., ROGERS, Y., SMITH, H.O. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. **Science**. 304: 66-74. 2004.
- WALPOLE, M.J.; MORGAN-DAVIES, M.; MILLEDGE, M.; BETT, P.; LEADER-WILLIAMS, N. Population dynamics and future conservation of a free-ranging black rhinoceros (*Diceros bicornis*) population in Kenya. **Biological Conservation** 99: 237-243. 2001.
- WARWICK, M.C.; LEWIS, G.P. Revision of *Plathyenia* (Leguminosae-Mimosoideae). **Edinburgh Journal of Botany** 60: 111-119. 2003.
- WAYNE, R.K.; JENKS, S.M. Mitochondrial DNA analysis implying extensive hybridization of the endangered red wolf *Canis rufus*. **Nature** 351: 565-568. 1991.
- ZHOU, Z.; PAN, W. Analysis of the viability of a giant panda population. **Journal of Applied Ecology** 34: 363-374. 1997.