



SHEILA VALÉRIA ÁLVARES CARVALHO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES
NATURAIS DE PIMENTA-ROSA (*Schinus
terebinthifolius* Raddi)**

LAVRAS – MG

2014

SHEILA VALÉRIA ÁLVARES CARVALHO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
PIMENTA-ROSA (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora
Dra Dulcinéia de Carvalho

LAVRAS – MG
2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Carvalho, Sheila Valéria Álvares.

Diversidade genética de populações naturais de pimenta-rosa
(*Schinus terebinthifolius* Raddi) / Sheila Valéria Álvares Carvalho. –
Lavras : UFLA, 2014.

129 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Dulcinéia de Carvalho.

Bibliografia.

1. Conservação. 2. Extrativismo. 3. Fragmentação. 4. Gargalos
genéticos. 5. Marcadores moleculares. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 634.9565

SHEILA VALÉRIA ÁLVARES CARVALHO

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE
PIMENTA-ROSA (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte da exigência do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2014.

Dr. Rubens Manoel dos Santos -	UFLA
Dra. Renata Silva Mann -	UFS
Dr. Robério Anastácio Ferreira -	UFS
Dr. Paulo Oswaldo Garcia -	UFLA

Dra Dulcinéia de Carvalho
Orientadora

LAVRAS – MG

2014

Ao Manoel Matos Carvalho, meu pai, que enfrentou as adversidades da vida e
provou que nada é impossível quando existe a necessidade de fazer.

A Alcione Álvares Carvalho, minha Mãe, pelo vínculo sublime na minha vida.

O exemplo que deixou é o que me impulsiona a seguir, mesmo na sua ausência
física.

Aos meus irmãos, pela força e carinho, estando sempre presentes na minha vida.

Aos meus sobrinhos, pela continuidade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Ciências Florestais (DCF) e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal (PPGEF) pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Ciências Florestais (DCF), pelos ensinamentos transmitidos.

À professora Dra. Dulcinéia de Carvalho pela orientação.

Ao professor Dr. Rubens Manoel dos Santos, pelos ensinamentos transmitidos e contribuição nas coletas no estado de Minas Gerais.

Ao professor Dr. Paulo Oswaldo Garcia, por se dispor a participar como membro na banca examinadora e pelas sugestões pertinentes para melhoria do trabalho.

Aos professores Dra. Renata Silva Mann (UFS) e Dr. Robério Anastácio Ferreira (UFS), pelos ensinamentos repassados e pela confiança de sempre.

À professora Dra. Laura Jane Gomes, pela parceria fornecida para as coletas realizadas em Sergipe.

Ao Sr. José Djenal e Dona Nair pela paciência e contribuição nas coletas dos materiais em Sergipe.

A empresa Agrososa, em especial ao Sr. Rolando, pela disponibilidade e contribuição com as coletas no estado do Espírito Santo.

Aos amigos Diego Gualberto, Glauber Pereira, Paola Pereira, Thalyta Almeida pela ajuda nas coletas.

A Jaqueline Fidelis Duarte, pela confiança, paciência, ensinamentos e, principalmente, pela Amizade doada com muito carinho juntamente com Joseane Duarte.

Aos Amigos que fiz em Lavras e que sempre se dispuseram a me ajudar, Gisele Menino, Luis Eduardo, Rute Maria, Sidney Geraldo, Nayara Carvalho, Allan Magalhães... sentirei saudades.

RESUMO GERAL

O extrativismo de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é realizado sem nenhum critério de manejo, comprometendo a sua perpetuação. Os dados obtidos a partir de estudos baseados na diversidade genética fornecem importantes informações para orientar programas de manejo e recuperação dessas áreas visando à conservação da diversidade genética. Este trabalho teve por objetivos acessar os padrões de distribuição genética em populações naturais de pimenta-rosa localizadas nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Sergipe. Também propusemos acessar os padrões da variabilidade genética intra e interpopulacional em área de intenso extrativismo dos frutos da espécie, localizadas em trecho da Bacia do Rio São Francisco, Sergipe. Os microsatélites (SSR) e marcadores ISSR foram utilizados para a obtenção dos parâmetros genéticos. As populações localizadas em Minas Gerais, Espírito Santo e Sergipe não foram isoladas pela distância, evidenciando a ocorrência de fluxo gênico histórico. As populações apresentam baixa diversidade genética. Usando a análise Bayesiana verificou-se que a diversidade genética foi distribuída em sete grupos ($K=7$). Nas populações do Espírito Santo não foi detectado *bottleneck*. A diferenciação genética entre as populações (F_{st}) localizadas na Bacia do Rio São Francisco (SE) foi 0,27. A diversidade genética entre as populações não pode ser explicada pelas distâncias geográficas, inferindo na existência de *bottleneck*. Nas populações de Sergipe, nove grupos genéticos foram evidenciados ($K=9$), nos quais foi constatada a subdivisão genética dessas populações. Indicamos ações de conservação imediatas nas populações de pimenta-rosa de Lavras, Ilha das Flores e Carmópolis devido à presença de *bottleneck*. As barreiras ao fluxo gênico evidenciadas nas áreas de Minas Gerais provavelmente ocorrem por causa das elevações montanhosas. As barreiras encontradas no Baixo São Francisco ocorrem principalmente em função do rio. As populações de pimenta-rosa de São Mateus, Canastra e Carmópolis são áreas prioritárias para a conservação devido à presença de alelos exclusivos. Na área do baixo São Francisco, a população de pimenta-rosa da Ilha das Flores poderá ser um modelo para auxiliar planos de manejo da espécie na região. Na população de Ilha das Flores encontramos agrupamentos genéticos distintos das outras populações de Sergipe.

Palavras-chave: Conservação. Extrativismo. Fragmentação. Gargalos genéticos. Marcadores moleculares

GENERAL ABSTRACT

The extractivism of Brazilian pepper populations (*Schinus terebinthifolius* Raddi) is performed without any management criteria compromising its perpetuation. Data obtained from studies based on genetic diversity provide important information to guide management and restoration programs aiming to conservation of genetic diversity. This work aimed to access the patterns of genetic structure in natural Brazilian pepper populations located in the Minas Gerais, Espírito Santo and Sergipe States. Also we proposed to access the patterns of intra and inter-population genetic variability in areas of intense extractivism of this species' fruits, located in the Rio São Francisco basin, in Sergipe. Microsatellites (SSR) and ISSR markers were used to obtain the genetic parameters. The populations located in Minas Gerais, Espírito Santo and Sergipe were not isolated by distance indicating the occurrence of historic gene flow. The populations showed low genetic diversity. Using the bayesian analyses we found that the genetic diversity was distributed into seven groups ($K=7$). In the populations of Espírito Santo it was not detected bottleneck. The genetic differentiation between the populations (F_{st}) located in the Rio São Francisco basin (SE) was of 0.27. The genetic diversity between populations could not be explained by geographic distances, inferring the presence of bottleneck. In the populations from Sergipe, nine genetic groups were evidenced ($K=9$), in which it was evidenced the genetic subdivision of these populations. We appointed the immediate conservation actions in the Brazilian pepper populations of Lavras, Ilha das Flores and Carmópolis, mainly due to the presence of bottleneck. The interruption of gene flow in the areas in Minas Gerais probably occurred due the barriers like mountainous elevations. The barriers found in the low São Francisco occur mainly due the river. The Brazilian pepper populations of São Mateus, Canastra and Carmópolis are priority areas to the conservation due to the exclusive alleles found. In the area of the low São Francisco the *S. terebinthifolius* population of the Ilha das Flores may be used as a model to aid in managing the species in this region. In the Ilha das Flores population we found distinct genetic groups from the other populations of Sergipe State.

Keywords: Conservation. Extractivism. Fragmentation. Genetic bottleneck. Molecular markers.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
INTRODUÇÃO GERAL	12
1 INTRODUÇÃO	16
2 HIPÓTESE	18
3 OBJETIVO	18
4 REFERENCIAL TEÓRICO	18
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS	41
REFERÊNCIAS	42
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	58
ARTIGO 1: ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	59
1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAL E MÉTODOS	63
3 RESULTADOS	78
4 DISCUSSÃO	92
5 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	104
ARTIGO 2 - <i>Schinus terebinthifolius</i>: POPULATION STRUCTURE AND IMPLICATIONS FOR ITS CONSERVATION	111
1 INTRODUCTION	113
2 MATERIAL AND METHODS	115
3 RESULTS	118
4 DISCUSSION	121
REFERENCES	125

PRIMEIRA PARTE

Introdução Geral

A história evolutiva da vegetação da América do Sul tem sido associada a uma sucessão de grandes eventos geológicos que modificaram tanto os continentes como os oceanos (CAVALLOTTO; VIOLANTE; HERNANDEZ-MOLINA, 2011; FOLGUERA et al., 2011). Tais eventos geológicos, juntamente com os climáticos e glaciações associados às transgressões marinhas, tiveram impacto importante nos continentes, criando cenários complexos para a diversificação de espécies (ARAGON et al., 2011).

A América do Sul tornou-se um continente diversificado composto por uma variedade de diferentes biomas (ARAGON et al., 2011), dentre esses, a Mata Atlântica brasileira é considerada um dos biomas mais diversos e ameaçados do planeta, onde seu nível de endemismo atinge 90% para alguns organismos, e seus 50% de endemismo médio geral é superado apenas pelo da Amazônia (COSTA et al., 2000). Assim, vários estudos filogeográficos têm sido realizados com o objetivo de compreender os níveis complexos e elevados de biodiversidade na América do Sul, uma vez que estes estudos podem fornecer informações valiosas sobre os processos históricos de diversificação das espécies na região (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013).

No Brasil, todos os grandes ciclos econômicos como a exploração do pau-brasil, o cultivo da cana-de-açúcar e o início da mineração do ouro, seguidos dos ciclos do café e da industrialização, se valeram da lógica do maior ganho no curto prazo, resultando em fortes mudanças dos ambientes naturais. Esse fenômeno foi mais intenso ao longo do litoral, onde se instalaram os primeiros núcleos de colonização, espaço ocupado originalmente pela Mata Atlântica (LINO, 2012).

Diante das possíveis perdas da diversidade existente nos diferentes ecossistemas, ações de conservação que garantam a sobrevivência das espécies

são necessárias e, para identificar quais as áreas prioritárias para preservar a biodiversidade, Myers et al. (2000) identificou as que concentravam os mais altos níveis de biodiversidade e onde as ações de conservação seriam mais urgentes. Essas áreas prioritárias para preservação da biodiversidade são conhecidas como *hotspots*, apresentando alto endemismo e mais de 75% ou mais de perda da sua vegetação original. Atualmente são reconhecidos 35 *hotspots* de Biodiversidade do mundo com prioridade para a conservação, (WILLIAMS et al., 2011). No Brasil dois *hotspots* foram identificados, o Cerrado, cuja área de cobertura vegetal original foi reduzida em aproximadamente 39,5% (SANO et al., 2010) e a Mata Atlântica que apresenta apenas 7 a 8% do seu território original (ABREU et al., 2007).

A maior parte da área litorânea coberta pela Mata Atlântica, hoje, é ocupada por grandes cidades, pastos e agricultura. Apesar do alto nível de exploração da Mata Atlântica, ainda restam remanescentes florestais em 17 Estados brasileiros (RS, SC, PR, SP, GO, MS, RJ, MG, ES, BA, AL, SE, PB, PE, RN, CE, PI) (BRASIL, 2006).

Em Sergipe, as áreas florestais remanescentes são pequenas e extremamente fragmentadas devido ao grande impacto antrópico (MOVIMENTO POPULAR ECOLÓGICO DE SERGIPE, 2008). Uma das regiões sergipanas em que a vegetação tem sofrido intensa pressão antrópica é a do baixo curso do Rio São Francisco, localizada entre os municípios de Neópolis e Santana do São Francisco. Parte da economia do município de Santana do São Francisco/SE está baseada na extração dos frutos de pimenta-rosa (*Schinus terebintifolius* Raddi), espécie de ocorrência natural na região.

O município de São Mateus (ES) também sofre pressão do extrativismo da espécie. Segundo o administrador da empresa de exportação Agrorosa, localizada em São Mateus/ES, parte deste extrativismo é proveniente de áreas plantadas, entretanto, mais de 70% são obtidos de florestas nativas. As

populações de pimenta-rosa existentes nos estados de SE e ES têm sido exploradas pela população local, seus frutos são repassados para compradores, que exportam para produção de condimentos alimentares.

Somando-se a falta de conhecimento da distribuição da diversidade genética da espécie, o nível de degradação das florestas que a espécie ocorre e a ação do extrativismo nesses locais, feita sem nenhum critério de manejo, prevê-se uma redução demográfica e deriva genética nas populações de pimenta-rosa, promovidas por alterações no número de indivíduos e na estrutura genética, respectivamente.

O extrativismo dos frutos é preocupante, pois a falta de sementes no solo compromete a regeneração da espécie. Como resultado, tem-se a diminuição da possibilidade, em longo prazo, de adaptação de novas combinações de alelos e ocorrência de indivíduos menos vigorosos (PRIMACK; EFRAIM, 2001) por uma possível endogamia.

Pesquisas realizadas com *S. terebinthifolius*, considerando aspectos técnicos, sociais, econômicos e ambientais, apontam para a necessidade de se estabelecer parâmetros para o manejo da espécie. Existem evidências que a falta de critérios para o uso sustentável da espécie tem levado a situações críticas, como o corte de árvores para impedir ações de extrativismo em propriedades particulares e a redução na produtividade de árvores em regiões antes com grande disponibilidade de frutos da espécie (JESUS; GOMES, 2013).

Baseando-se na necessidade de conservação da espécie, a proposta deste trabalho é quantificar a diversidade genética de *S. terebinthifolius* em diferentes remanescentes florestais ao longo de sua ocorrência. Assim, o conhecimento da diversidade genética nas populações estudadas auxiliará na identificação de unidades operacionais para a manutenção da diversidade da espécie no Baixo São Francisco e poderão ser formuladas algumas estratégias para o manejo

sustentável da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), principalmente no estado de Sergipe, onde existe um forte extrativismo.

Para uma melhor compreensão do trabalho realizado, a tese foi dividida em três capítulos, o primeiro capítulo trata de uma abordagem sobre os processos naturais e antrópicos que influenciaram a distribuição da vegetação no Brasil, dando ênfase à distribuição espacial de pimenta-rosa e sua importância ecológica e econômica no país. Ressalta-se também a importância da diversidade genética das espécies e como a exploração atual de pimenta-rosa pode contribuir para a redução da diversidade genética nas próximas gerações.

O segundo capítulo evidencia o padrão da diversidade e estrutura genética de pimenta-rosa em populações que possivelmente influenciaram a distribuição da diversidade genética da espécie no Baixo São Francisco (SE) devido à ligação destas com a bacia hidrográfica do Rio São Francisco e áreas consideradas de refúgio durante o Último Máximo Glacial. Diante dos resultados obtidos, foram formuladas medidas de manejo para as populações naturais do estado de Sergipe, assegurando o padrão de diversidade genética conhecida para a espécie.

O terceiro capítulo analisa a diversidade genética das populações de pimenta-rosa, sugerindo áreas prioritárias para a conservação da espécie em populações sob intenso extrativismo dos seus frutos.

1 Introdução

Mudanças climáticas e glaciações associadas às transgressões marinhas ocasionaram cenários complexos para a diversificação de espécies compostos por uma variedade de diferentes fisionomias vegetacionais (ARAGON et al., 2011). No Brasil, a Mata Atlântica inclui todas as fisionomias florestais da região Nordeste e na região Sul, inclui Florestas Costeiras Atlântica, as Florestas Semidecíduas, subtropicais Florestas de Araucária e Florestas de Brejo (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000). É considerada o *hotspots* de biodiversidade mais ameaçado na América do Sul (MYERS et al., 2000), sendo a demanda por terras agrícolas e fazendas de gado e a rápida expansão das áreas urbanas as principais ameaças à biodiversidade da região (CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL, 2000).

A influência da perda de *habitat* sobre a viabilidade das populações de espécies de plantas e animais é uma abordagem relevante nos estudos de conservação da biodiversidade. Em diversos estudos, são evidenciadas que a destruição e a fragmentação de *habitat* têm impactos negativos sobre as populações e são consideradas como as principais causas da perda de variabilidade genética, sendo uma das questões mais relevantes na área da biologia da conservação (LINDENMAYER; FISCHER, 2007; LINDENMAYER et al., 2008). No entanto, particularidades da história de vida e características das plantas podem conferir diferentes vulnerabilidades aos efeitos da fragmentação, pois se diferenciam amplamente em sistema de acasalamento, polinização, biologia de dispersão, além de outros fatores ecológicos (AGUILAR et al., 2008; KRAMER et al., 2008).

Devido ao efeito espécie-específico, um dos maiores desafios para os pesquisadores na atualidade é avaliar como a fragmentação contribui para um declínio na viabilidade populacional (LINDENMAYER; FISCHER, 2007) e

qual a funcionalidade ecológica desses ambientes fragmentados (REVILLA; WIEGAND, 2008). Para compreender e avaliar os impactos da fragmentação, as pesquisas têm levado a uma nova abordagem de correlacionar distâncias genéticas de indivíduos com características da paisagem. O objetivo é desenvolver modelos de conservação mais funcionais, além de analisar a dinâmica e viabilidade de metapopulações, consideradas de elevada importância na concepção de planos de conservação (BRAUNISCH; SEGELBACHER; HIRZEL, 2010). A junção de conceitos e ferramentas da genética de populações, ecologia da paisagem, geografia e estatística espacial dão suporte a estes estudos (MANEL et al., 2003; HOLDEREGGER; WAGNER, 2008).

Schinus terebintifolius, popularmente conhecida como pimenta-rosa é amplamente distribuída pela América tropical e subtropical, ocorrendo desde a restinga e margem de manguezais até Florestas Ombrófila Densa, Alto-Montana e Semidecídua de altitude e áreas antropizadas (GARRASTAZU; MATTOS, 2013). No Brasil, essa espécie tem sido alvo de intenso extrativismo dos frutos, principalmente no nordeste e no estado do Espírito Santo. Seus frutos são bastante apreciados pela culinária europeia e seu consumo vem crescendo no mercado brasileiro. A pressão do extrativismo sobre os frutos de pimenta-rosa é preocupante, pois promove a falta de sementes no solo, o que impede a sua distribuição e propagação, diminuindo a regeneração de novas plantas. Além disso, bancos de sementes e de plântulas que, eventualmente possam ocorrer, irão conter uma baixa variabilidade genética e, considerando as áreas que são constantemente alteradas, as populações de pimenta-rosa podem ser extintas localmente.

A análise da estrutura genética de populações de pimenta-rosa que ocorrem em diferentes remanescentes possibilitará verificar se os efeitos da fragmentação no baixo São Francisco influenciaram a diversidade genética local. Os resultados permitirão formular medidas de manejo mais adequadas para a

conservação da pimenta-rosa no baixo curso do rio São Francisco, além de auxiliar na identificação de áreas prioritárias para a conservação (Unidades Evolutivas Significativas - ESU's).

2 Hipótese

A diversidade genética de *Schinus terebinthifolius* Raddi apresenta correlação com as distâncias geográficas.

3 Objetivo

Este estudo teve como objetivo quantificar a diversidade genética de *Schinus terebinthifolius* Raddi em populações localizadas nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Sergipe, identificando áreas prioritárias para conservação da espécie.

4 Referencial Teórico

4.1 Filogeografia: Processos históricos na distribuição da variação genética

A América do Sul é um continente biogeograficamente diversificado, composto por uma variedade de diferentes fisionomias vegetacionais (ARAGON et al., 2011), cujos processos de diversificação das espécies estão associados a uma sucessão de grandes eventos geológicos (GRAHAM, 2009; CAVALLOTTO; VIOLANTE; HERNANDEZ-MOLINA, 2011; FOLGUERA et al., 2011). Durante toda a história da Terra, a superfície do planeta sofreu importantes eventos geográficos como deriva continental e tectonismo, além dos climatológicos como alterações cíclicas dos climas, glaciações, transgressão e

regressão marinhas (FERNANDES, 2007), que resultaram em ambientes com características bem heterogêneas. O movimento dos continentes, os períodos glaciais, o aparecimento de complexos montanhosos como os Andes, Himalaia e Alpes, a formação de mares, lagos e ilhas, são fatores que influenciaram a distribuição das espécies (SILVA, 2014), uma vez que, as espécies são selecionadas pelas condições ecológicas dos novos meios que estão inseridas, adaptando-se, migrando, sofrendo mutações ou mesmo extinguindo-se (SILVA, 2014).

Segundo alguns autores, as espécies arbóreas parecem ter respondido às mudanças climáticas pela criação de refúgios adequados durante o Último Máximo Glacial, que recolonizou a paisagem quando as condições tornaram-se mais favoráveis (PENNINGTON; PRADO; PENDRY, 2000; NEVILL; BOSSINGER; ADES, 2010; MARTINS; DOMINGUES, 2011). Foi verificado que durante as glaciações as espécies de várzea provavelmente se refugiaram no litoral, enquanto as espécies de montanha fizeram migrações para áreas mais elevadas ou sobreviveram em ambientes adequados (MCKINNON et al., 2004). Esse fato corrobora para a existência de correlações entre as espécies que compõem diferentes fitofisionomias e/ou a baixa diversidade genética das espécies em populações com distanciamentos geográficos elevados.

Outros autores, ainda sugerem a hipótese do Arco Pleistocênico para explicar a existência de contato entre as populações vegetacionais, considerando que centros de origens de espécies de plantas foram separados devido à subdivisão de algumas bacias hidrográficas permitindo assim a diversificação das espécies (PATTON; SILVA; MALCOLM, 2000). Com suporte nessa mesma hipótese, Prado e Gibbs (1993) enfatizam que na última glaciação, existia uma faixa que interligava dois centros de Florestas Estacionais Deciduais, a Caatinga no Nordeste Brasileiro e os Charcos, na Argentina e sul da

Bolívia, sendo a Caatinga coberta por extensas formações arbóreas sazonais, o que explica parcialmente a distribuição das espécies.

Para uma melhor compreensão dos processos evolutivos da distribuição da diversidade, nas últimas décadas vários estudos foram realizados em diferentes continentes. Por exemplo, na Europa (NIETO FELINER, 2011), na Nova Zelândia (WALLIS; TREWICK, 2009), no Sul da Austrália (BYRNE, 2008), na África (LORENZEN; HELLER; SIEGISMUND, 2012), no Brasil (ANTONELLI et al., 2010; MARTINS, 2011; FREGONEZI et al., 2012; SILVA et al., 2012) e na Patagônia (SÉRSIC; COSACOV; COCUCCI, 2011; PARDIÑAS et al., 2011; ALBINO et al., 2011). Além destes, o estudo realizado por Petit et al. (2003), em 22 espécies arbóreas localizadas no norte da Europa, inferiu que a baixa diversidade genética encontrada nas espécies arbóreas na região recolonizada desde o Último Máximo Glacial, surgiu a partir de uma série de gargalos associados aos eventos fundadores. De acordo com os autores, somente um subconjunto da diversidade genética presente nas áreas de refúgios foi encontrado nas áreas recolonizadas.

Assim, percebe-se que muitos esforços foram realizados para compreender os níveis complexos da diversidade das espécies, e fornecer informações valiosas sobre os processos históricos subjacentes à distribuição da diversidade genética (MANEL et al., 2003; STORFER et al., 2007; TURCHETTO-ZELET et al., 2013). Entretanto, identificar interrupções filogeográficas é um desafio, principalmente na América do Sul, em razão do baixo número de estudos (SÉRSIC; COSACOV; COCUCCI, 2011; TURCHETTO-ZELET et al., 2013). Contudo, estudos filogeográficos já existentes evidenciam que as barreiras mais comuns de interrupções filogeográficas encontradas são rios e elevações montanhosas, os quais desempenham um papel importante na formação de padrões biogeográficos da América do Sul (WARD et al., 2002).

Alguns estudos realizados no sudeste do Brasil relatam que a bacia do rio Doce funciona como barreira para a dispersão de algumas espécies de mamíferos (COSTA, 2003), lagartos (PELLEGRINO et al., 2005), aves (CABANNE et al., 2008), rãs (THOMÉ et al., 2010) e plantas (RIBEIRO et al., 2011) e que o rio São Francisco é uma barreira para a migração do roedor *Calomys expulsus* (NASCIMENTO et al., 2011). Além destes, as bacias do Rio Paraguai e Rio da Prata também foram indicadas como barreiras significativas à dispersão e ao fluxo gênico para *Leopardus colocolo* (JOHNSON et al., 1999). A bacia do Rio Paraná, afluente da bacia do Rio da Prata, separa populações do Cervo do Pantanal *Blastocerus dichotomus* (MÁRQUEZ et al., 2006).

Entretanto, a indicação de rios como barreiras deve ser cuidadosa, pois alguns autores enfatizam que os rios não são barreiras nas regiões florestadas das cabeceiras, onde as populações representativas de plantas e animais estão em contato direto, cruzando-se por hibridação ou excluindo-se reciprocamente por imposição geográfica (HAFFER; PRANCE, 2002). Um exemplo foi o do Rio Casiquiare, identificado como um corredor de dispersão da Amazônia para as bacias do Orinoco para três espécies de pavão: *Cichla temensis*, *Cichla monoculus* e *Cichla orinocensis*. Portanto, os rios evidenciam papel importante na influência da estrutura da população, não como barreiras, mas como corredores de dispersão de espécies (WILLIS et al., 2010).

Outro mecanismo de interrupção ao fluxo gênico e que promove a divergência genética entre as populações são as elevações montanhosas, sendo o soerguimento dos Andes um dos principais impulsionadores da organização da biodiversidade na América do Sul (ANTONELLI et al., 2010; HOORN et al., 2010). A cordilheira dos Andes compreende uma barreira leste-oeste que afeta a distribuição de climas da América do Sul (ARAGON et al., 2011). Ocasionalmente, também, significativo impacto sobre as terras baixas em termos de gerar os

padrões de diversidade ao longo dos principais rios da Amazônia (TURNER et al., 2004).

Assim, a alta divergência genética entre as populações de diferentes espécies de animais e vegetais como: *Glossophaga soricina* (DITCHFIELD, 2000); *Lepidothrix coronata* (CHEVIRON; HACKETT; CAPPARELLA, 2005); *Hypsiboas andinus* (KOSCINSKI et al., 2008); *Symphonia globulifera* (DICK; HEUERTZ, 2008); *Glyphorhynchus spirurus* (MILA et al., 2009) e *Cyathostegia mathewsii* (PENNINGTON et al., 2010) localizadas na Cordilheira dos Andes, está associada ao isolamento geográfico histórico, isto é, durante o período de elevação dos Andes, no Mioceno. Entretanto, para algumas espécies a divisão da população leste-oeste ocorreu mais recentemente, durante o Quaternário, relatados por Ternel et al. (2007), em um estudo realizado com a palmeira *Ceroxylon echinulatum*.

Estudos filogeográficos proporcionam uma melhor compreensão da biodiversidade, modos de dispersão, os tempos de diversificação, extinções, áreas de refúgios (DINIZ-FILHO; CAMPOS; BONATTO, 2008; TURCHETTO-ZELET et al., 2013). O estudo realizado por Carnaval e Moritz (2008), no qual os autores cruzaram os dados de simulações climáticas com dados de estudos filogeográficos, evidenciaram que a área central da Mata Atlântica, entre o rio São Francisco e o rio Doce, apresentou vegetação durante as condições mais secas do Quaternário (Último Máximo Glacial), sendo considerada área de refúgio.

Portanto, análises filogeográficas são capazes de detectar padrões de diversidade regionais em nível de paisagem, que são importantes para a compreensão e estabelecimento de áreas prioritárias para conservação (MORITZ, 2002; TURCHETTO-ZELET et al., 2013).

4.2 Genética da paisagem

A Mata Atlântica se encontra tanto na região litorânea como nos planaltos e serras do interior do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul. Ao longo de toda a costa brasileira, a sua largura varia entre pequenas faixas e grandes extensões, atingindo em média 200 km de largura. Assim, a Mata Atlântica apresenta uma variedade de formações, um diversificado conjunto de ecossistemas florestais com estruturas e composições florísticas bastante diferenciados, sendo estes influenciados pelas características climáticas das regiões onde ocorrem, tendo como elemento comum a exposição aos ventos úmidos que sopram do oceano (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005).

A Mata Atlântica ocupa regiões de diferentes relevos, clima e solo, sendo formada por vários tipos de vegetação como Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional, Manguezais, Restingas e outros (MARTINS et al., 2006). Estes diferentes tipos vegetacionais explica, pelo menos em parte, a riqueza de sua biodiversidade, uma vez que, árvores de uma dada espécie de ocorrência ao nível do mar diferem de árvores desta mesma espécie no topo da serra, portanto se apenas uma variação de altitude já exerce influência significativa sobre as espécies, é possível imaginar o que as diferenças de pluviosidade, temperatura, fertilidade dos solos, relevo, luminosidade, entre muitas outras, geraram em termos de diversidade de flora, fauna, microrganismos e os ecossistemas que a compõem ao longo do litoral brasileiro (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005).

A Mata Atlântica é um dos principais biomas do Brasil e se estende por toda porção leste do território brasileiro, incluído ainda Misiones na Argentina e o leste do Paraguai (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005). Além disso, a Mata Atlântica não faz fronteira com os outros biomas da América do Sul e está circundada pela diagonal da seca da América do Sul que é formada pelos biomas

Caatinga e Cerrado, tornando a Mata Atlântica uma ilha florestada na porção leste do continente Sul Americano (FERNANDES, 2007).

A extensão da Mata Atlântica original era de aproximadamente 1.360.000 km², sendo 70% de sua cobertura de formações florestais arbóreas densas e o restante, áreas abertas e campos (BRASIL, 2002). Assim, na atualidade, a Mata Atlântica é uma das 35 áreas de maior biodiversidade (*biodiversity hotspots*) reconhecidas no mundo (MYERS et al., 2000; WILLIAMS et al., 2011) e abriga mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005). Entretanto, esse bioma foi devastado desde a chegada dos primeiros europeus na costa brasileira. Atualmente a Mata Atlântica está reduzida a menos de 8% de sua extensão original, sendo representada por fragmentos dispersos ao longo da costa brasileira, no interior da região Sul e da Sudeste, no sul dos estados de Goiás e de Mato Grosso do Sul, no interior dos Estados do Nordeste e em Misiones na Argentina (Figura 1) (BRASIL, 2002; GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005). Mesmo com sua área original reduzida e muito fragmentada, estima-se que na Mata Atlântica existam cerca de 20.000 espécies vegetais (cerca de 35% das espécies existentes no Brasil), incluindo diversas espécies endêmicas e ameaçadas de extinção (BRASIL, 2002).

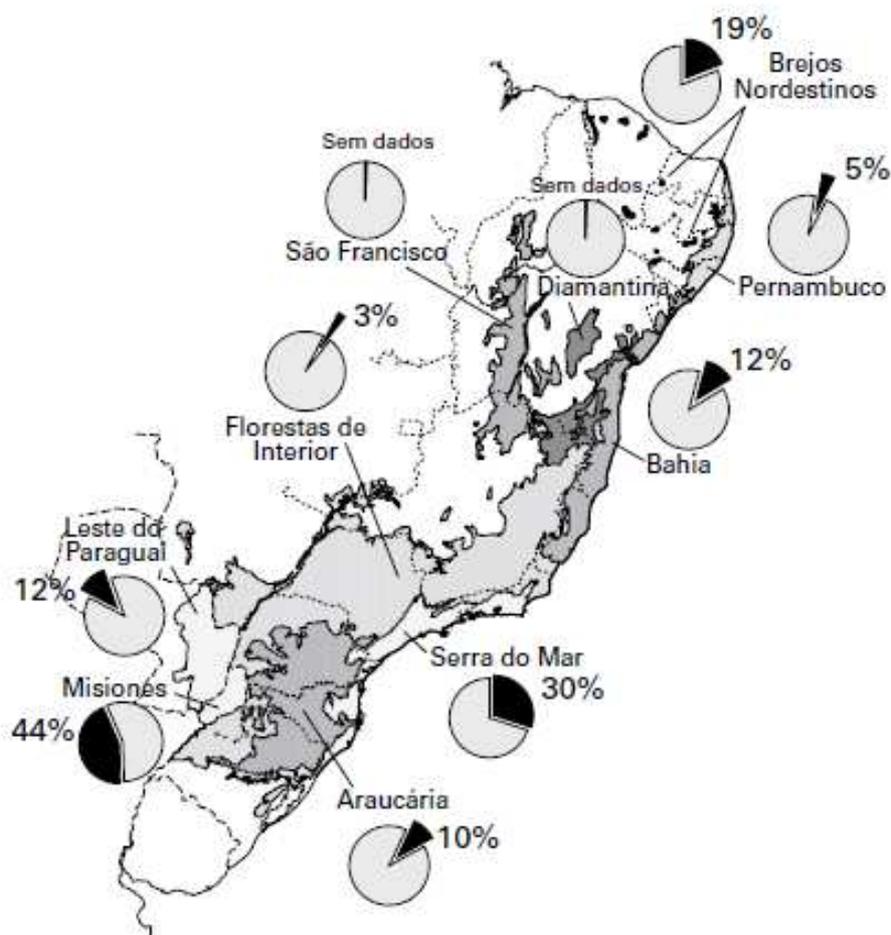


Figura 1 Porcentagem de remanescentes florestais (em preto) nas diferentes regiões biogeográficas do *hotspot* Mata Atlântica
 Fonte: GALINDO-LEAL; CÂMARA (2005)

A ocupação humana e suas atividades tiveram como consequência a transformação das vastas áreas das vegetações naturais em paisagens alteradas, resultando no processo de fragmentação do *habitat*, que modifica a estrutura, a distribuição e o funcionamento dos ecossistemas naturais (SAUNDERS; HOBBS; MARGULES, 1991). Portanto, as consequências imediatas da

fragmentação são a perda de *habitat*, a formação de manchas de remanescente com *habitats* de formas e tamanhos variados, a redução de tamanho da população e um aumento no grau de isolamento das populações restantes (MCGARIGAL; CUSHMAN, 2002; FAHRIG, 2003), podendo, este último, conter indivíduos reprodutivos com uma baixa representatividade do conjunto gênico da população (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2004).

Entretanto, diversos trabalhos buscam relações correlativas entre o padrão de paisagem e variáveis biológicas, avaliando apenas tamanho da população, ocupação ou a riqueza de espécies, mas ignorando os processos biológicos, o que gerou resultados conflitantes e confusos, concluindo que um dos maiores desafios nos estudos é o efeito espécie-específico de perda de habitat (LINDENMAYER; FISCHER, 2007). Portanto, os resultados destes trabalhos são limitados, principalmente devido à falta de ferramentas analíticas para revelar como os mecanismos biológicos são afetados pelas características da paisagem, além do processo de interações ser único para cada espécie.

Segundo Aguilar et al. (2008), particularidades da história de vida e características das plantas podem conferir diferentes vulnerabilidades aos efeitos da fragmentação. Efeitos genéticos negativos muitas vezes ocorrem por causa do baixo nível da diversidade de espécie que compõem os fragmentos, pois estas se diferem amplamente em sistema de acasalamento, polinização, biologia de dispersão, além de outros fatores ecológicos (KRAMER et al., 2008), portanto, nem todas as espécies de árvores respondem à fragmentação de maneira semelhante.

Estudos empíricos sobre os efeitos da fragmentação no fluxo de pólen em populações neotropicais de *Spondias mombin* (Anacardiaceae) evidenciaram que populações fragmentadas sofreram reduções significativas na taxa de germinação e produção de frutos em relação a populações de florestas contínuas. No entanto, 90-100% das progênies nos pequenos fragmentos eram resultantes

de fluxo gênico de pólen proveniente de povoamentos florestais localizados entre 80-1.000 m de distância (NASON; HAMRICK, 1997). Nesse caso, fatores ambientais em vez dos genéticos, provavelmente são responsáveis por diferenças de aptidão de progênie nesta população de *Spondias* (KRAMER et al., 2008).

Em outro estudo realizado por Sato et al. (2006) em *Cercidiphyllum japonicum*, árvore dioica e de mata ciliar no Japão, foi realizada a medição direta do movimento de pólen e sementes para analisar a estrutura genética espacial e a diferenciação genética entre as populações que cobrem o arquipélago japonês. Em uma área de 20 ha observou-se que 28,8% das progênies foram fertilizadas por pólen de árvores localizadas fora da área de estudo. A distância média de polinização dentro do local de estudo foi de 129 m, com distância máxima de 666 metros. Os genótipos de 30% das progênies eram incompatíveis com genótipos das árvores maternas mais próximas e a distância máxima de dispersão de sementes foi superior a 300 metros. Assim, a dispersão de alelos a longa distância é comum nesta espécie. As populações amostradas em toda a distribuição de *C. japonicum* mostrou significativo isolamento por distância, mas os baixos níveis de diferenciação genética ($F_{ST}=0,043$) indicou também que o fluxo gênico ocorre em longa distância contribuindo para a manutenção da diversidade genética da espécie.

Na tentativa de gerar resultados mais conclusivos, as pesquisas têm desenvolvido uma nova abordagem correlacionando distâncias genéticas de indivíduos com características da paisagem, com o objetivo de obter modelos de conservação mais explícitos, além de analisar dinâmica e viabilidade de metapopulações, sendo estas, consideradas de elevada importância na concepção de planos de conservação mais adequados (BRAUNISCH; SEGELBACHER; HIRZEL, 2010). Assim surgiu a genética da paisagem, com a junção de conceitos e ferramentas da genética de populações, ecologia da paisagem, geografia e estatística espacial (MANEL et al., 2003; HOLDEREGGER;

WAGNER, 2008). Em geral, a genética da paisagem muitas vezes envolve processos espaciais e temporais que diferem significativamente dos modelados em genética de populações (EPPERSON; MCRAE, 2010).

Portanto, a identificação de populações de plantas geneticamente diferenciadas fornece informações importantes sobre os processos ecológicos como fluxo gênico, que contribui para a manutenção da diversidade genética (MIYAKI, 2009), na qual pode-se identificar populações consideradas como Unidades Evolutivas Significativas (AVISE, 2000).

ESU's em biologia da conservação são interpretadas como os verdadeiros alvos de ações conservacionistas que coincidem ou não com limites interespecíficos reconhecidos (CRANDALL et al., 2000; HEY et al., 2003; MACE, 2004). As ESU's orientam o delineamento de estratégias a serem empregadas em programas de conservação *in situ* ou mesmo na amostragem de indivíduos para coleções de germoplasma. Para assegurar o manejo e viabilidade das ESU's, deve-se otimizar estratégias por meio de identificação de Unidades Operacionais (UO's). De acordo com esta metodologia, as UO's seriam as populações geograficamente distintas que apresentariam divergência nas frequências alélicas assegurando o manejo e viabilidade das ESU's (DINIZ-FILHO; TELLES, 2002; MANEL et al., 2003).

Nesse sentido, as ESUs podem auxiliar na indicação de áreas para estabelecimento de unidades de conservação, onde os dados de estudos filogeográficos e da genética da paisagem são utilizados para inferir a história geológica de espécies, criando assim, uma ponte entre as inferências micro e macro evolutivas (AVISE, 2009).

Entre essas espécies destaca-se a pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), típica de ambiente litorâneo do domínio da Mata Atlântica (RIZZINI, 1995) e que possui elevado potencial ecológico e econômico em suas áreas de ocorrência.

4.3 *Schinus terebinthifolius* Raddi e suas potencialidades

A família Anacardiaceae é um componente importante da Floresta Tropical e tem uma distribuição Pantropical, com algumas espécies encontradas em regiões temperadas (CRONQUIST, 1981). O México e algumas áreas da América do Sul (por exemplo, a região do Chaco da Argentina), são considerados como importantes centros de diversificação, devido à sua alta diversidade e alto endemismo (RAMÍREZ; CEVALLOS-FERRIZ, 2002).

O gênero *Schinus* é constituído por cerca de 30 espécies. No Sul do Brasil, esse gênero da família Anacardiaceae é o maior em riqueza específica (LAS PEÑAS et al., 2006). Dentre as espécies de Anacardiaceae tem-se *Schinus terebinthifolius*, popularmente conhecida como aroeira vermelha, aroeira-pimenteira, pimenta brasileira, fruto de sabiá e pimenta-rosa.

A pimenta-rosa é amplamente distribuída pela América tropical e subtropical, ocorrendo desde a restinga e margem de manguezais até nas florestas Ombrófila Densa, Alto-Montana e Semidecídua de altitude e áreas antropizadas. A espécie ocorre naturalmente no Brasil, Paraguai e nordeste da Argentina e encontra-se nas fronteiras de rios e lagos e em formações secundárias de floresta tropical úmida e solos orgânicos, porém consegue se desenvolver em qualquer tipo de solo. No Brasil, a pimenta-rosa ocorre em diferentes fitofisionomias como foi evidenciado na modelagem de distribuição realizada por Garrastazu e Mattos (2013) (Figura 2), onde as áreas de ocorrência mais favoráveis são representadas pela cor vermelha.

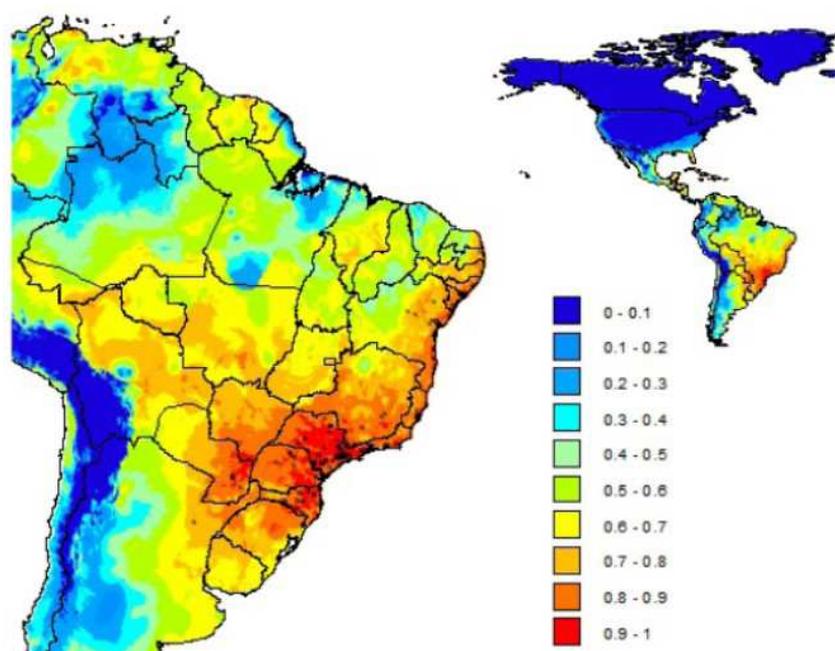


Figura 2 Distribuição potencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi considerando as camadas ambientais, altitude e pontos de ocorrência real da espécie, usando as camadas ambientais de 2,5 minutos

Fonte: GARRASTAZU; MATTOS (2013)

Nas fitofisionomias brasileiras, a pimenta-rosa tem um alto índice de valor de importância (4,19) ao longo de todas as áreas de distribuição (MELO; AMORIM; ALBUQUERQUE, 2009). Além da sua importância ecológica, a pimenta-rosa é amplamente utilizada para fins terapêuticos (MELO; AMORIM; ALBUQUERQUE, 2009). A importância comercial desta espécie aumentou consideravelmente e o cultivo da espécie é uma alternativa para a produção agrícola em alguns Estados brasileiros. As sementes são muito apreciadas como especiarias e a sua demanda está aumentando nos mercados nacional e internacional (JESUS; GOMES, 2013).

A pimenta-rosa é uma espécie arbórea, heliófila, tolerante à luz, resistente a inundações, incêndios e seca, rebrotando facilmente a partir do

tronco e raízes. A espécie é dioica, classificada como xenogâmica. As árvores femininas produzem pequenas flores brancas amareladas com picos nos meses de setembro a novembro e de março a maio, dependendo da região, seguidas pelo desenvolvimento de cachos de pequenas bagas vermelhas. Os frutos são muito apreciados por pássaros, que dispersam suas sementes. O amadurecimento dos frutos inicia-se em 30 dias do início de floração (LENZI; ORTH, 2004).

A espécie apresenta uma variação morfológica considerável em relação aos folíolos, principalmente na forma, tamanho, número, margem e ápice. Estudos morfo-anatômicos e fisiológicos demonstram que a pimenta-rosa apresenta grande plasticidade morfológica em resposta a *habitats* com diferentes condições lumínicas (SABBI; ÂNGELO; BOEGER, 2010). A altura das árvores pode atingir de 5 a 10 m, dependendo da região, os ramos são glabros com tricomas curtos ou longos, eretos, retos ou sinuosos no ápice, esparsos. As folhas são compostas, imparipenadas, cartáceas e o pecíolo estreitamente alado. A espécie possui folíolos opostos ou subopostos, geralmente sésseis; as brácteas possuem dimensões de 1-1,7 x 0,7-1,3 mm e são deltadas. As flores apresentam pedicelo verde de 1-2,2 mm, articulado a 0,6 mm de cálice, alarguecido no ápice. Apresentam frutos em forma de drupas rosadas ou vermelhas, com 4,5 mm de diâmetro (Figura 3).



Figura 3 Árvore de *Schinus terebinthifolius* localizada no município de Propriá no estado de Sergipe (A); Frutos maduros e verdes de *Schinus terebinthifolius* (B)

4.4 Os produtos não madeireiros e os aspectos legais referentes ao extrativismo dos frutos de pimenta-rosa

Historicamente a ocupação do território brasileiro ocorreu principalmente na região costeira em função de condições mais propícias à extração e exportação dos recursos naturais, que foram os principais produtos dos ciclos de desenvolvimento da história do Brasil, conforme relatado no item Apresentação.

As florestas tropicais são fontes de vasta diversidade de frutas, nozes, sementes oleaginosas, látex, resinas, gomas, especiarias e plantas medicinais sendo estes classificados como Produtos Florestais não Madeireiros (PFNMs) (PETERS, 1996). Os PFNMs são os recursos ou produtos biológicos da flora, que não a madeira, obtidos das florestas naturais, primárias ou secundárias, florestas plantadas ou sistemas agroflorestais, que são utilizados para subsistência ou para comercialização, apresentando grande potencial econômico (PETERS, 1996).

Os produtos florestais não madeireiros geralmente são a base para a produção artesanal e industrial em pequena escala. Até há pouco mais de 20 anos, estes produtos eram considerados com desinteresse, manifestados inclusive com a definição de "minor forest outputs". Entretanto, estes produtos podem gerar retornos consideráveis na manutenção de populações de países do terceiro mundo (ARNOLD; PÉREZ, 1995). Porém, alguns aspectos ecológicos do extrativismo, que explora o valor intrínseco da floresta, devem ser considerados, pois características biológicas básicas das populações de plantas tropicais limitam a natureza e a intensidade da exploração dos recursos. Os aspectos mais problemáticos incluem a diversidade e a baixa densidade de espécies de árvores, a complexidade de floração e frutificação, a especificidade dos ambientes para o sucesso da regeneração e do crescimento das espécies. Além de apresentar em

longo prazo, potenciais impactos ecológicos decorrentes da colheita seletiva de diferentes tecidos das plantas, principalmente os propágulos reprodutivos, como frutos, castanhas e sementes (PETERS, 1996).

Como produtos integrantes do extrativismo florestal não-madeiros no Brasil tem-se a Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) que ocorre principalmente no leste do Pará, sendo um produto muito valorizado no Brasil e também como produto de exportação. Palmeiras típicas de florestas ombrófilas como o açáí (*Euterpe oleracea*) e o palmito (ex. *Euterpe edulis*) abastecem o mercado interno e ainda são produtos de exportação. No Maranhão e em Tocantins, a extração do babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart) é importante para aplicações industriais e alimentícias. No Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte, a extração em grandes palmeiras de Carnaúba (*Copernicia prunifera*) tem como destino várias aplicações industriais. O Nordeste, ainda conta com o extrativismo de piaçava (*Attalea funifera*) utilizada em vassouras e cordas de navios; o coco (*Cocos nucifera*), que possui ampla utilização; a castanha-de-caju (*Anacardium occidentale* L) que produz um óleo com propriedades especiais; o buriti (ex. *Mauritia flexuosa*), que tem funções alimentícias e medicinais (GASPARETTO JÚNIOR, 2014) e, mais recentemente, a pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius*), utilizada principalmente como condimento.

Em relação à política do extrativismo de pimenta-rosa na região do Baixo São Francisco, os órgãos ambientais nos estados de Sergipe e Alagoas são contraditórios. O IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), em Alagoas, autorizou e produziu a Informação Técnica Nº 023/2005 (IBAMA/DITEC/AL) para a realização da coleta de pimenta-rosa na área de APA/AL a ser seguida pelas empresas processadoras e exportadoras da pimenta-rosa sediadas no estado do Espírito Santo, que compram os frutos provenientes dessas áreas. O mesmo órgão federal em Sergipe emitiu uma autorização provisória, mas não fiscaliza e, ao mesmo

tempo, afirma desconhecer a atividade de exploração da pimenta-rosa no local (Baixo São Francisco), embora tenha realizado ações de educação ambiental com os atores da prática extrativista dessa espécie no povoado Saúde (SE) em 2005 (JESUS; SANTANA; GOMES, 2011).

O órgão estadual ADEMA (Administração Estadual do Meio Ambiente) em Sergipe informou que tem conhecimento sobre as atividades extrativistas na área, mas questiona se a ele compete as ações de fiscalização na área, tendo em vista ser a atividade realizada em Áreas de Preservação Permanente (APP) de domínio da União e por estar às margens do Rio São Francisco (JESUS; SANTANA; GOMES, 2011).

Deste modo, nota-se que a pressão sobre o recurso natural gera degradação ambiental, uma externalidade negativa, pois não segue orientações técnicas para a atividade, a qual se torna não sustentável ambientalmente nas áreas de preservação permanente (APP) e nas Unidades de Conservação existentes na região (APA Piaçabuçu – AL e APA Litoral Norte - SE) (JESUS; SANTANA; GOMES, 2011).

O extrativismo de Produtos Florestais Não Madeireiros acaba gerando fragilidades e ameaças à espécie explorada. A maioria da exploração comercial de recursos não-madeireiros é realizada pela colheita destrutiva, superexploração, produzindo uma desestruturação básica na ecologia funcional das populações de plantas tropicais (PETERS, 1996). Estudos apontam uma tendência de extinção de muitas espécies, em função do excesso de colheitas decorrentes da alta demanda da utilização de plantas, o que reforça a necessidade de se averiguar os impactos em longo prazo da ação dos ribeirinhos que utilizam a flora local (AZEVEDO; SILVA, 2006).

4.5 Marcadores Moleculares

A estrutura e a diversidade genética das populações são a base da biodiversidade e podem ser quantificadas por meio de marcadores moleculares, sendo a utilização destes marcadores em estudos populacionais de espécies arbóreas uma ferramenta potencial (FREITAS et al., 2005) devido, principalmente ao fato de permitir detectar diferenças existentes entre dois ou mais indivíduos nas populações.

Na década 60, o desenvolvimento da eletroforese de proteínas (alozimas) permitiu pela primeira vez que a diversidade genética das espécies fosse quantificada de forma direta, pois os alelos eram identificados por possuírem diferentes propriedades eletroforéticas. Na década de 80, foram desenvolvidos os marcadores moleculares em nível de DNA, os quais podem ser utilizados a partir de amostras de células ou de tecidos de partes da planta (folhas, embriões, cotilédones, pólen etc.) e também em qualquer estágio de desenvolvimento (DANTAS; NODARI, 2006), apresentando vantagens em termos de tempo, além do que, não são afetados por fatores ambientais, permitindo assim, a determinação de relações filogenéticas entre materiais de origens distintas (SWOFFORD et al., 1996).

Diversas técnicas de biologia molecular são usadas para detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA para a identificação de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Estes marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética populacional como no melhoramento de plantas (BORBA, 2006).

Entre os marcadores mais conhecidos têm-se os identificados por hibridação, os marcadores de RFLP (Restriction Fragment Length

Polymorphism) e minissatélites; e aqueles revelados por ampliações, como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), SSR ou microssatélites (Simple Sequence Repeat) e AFLP (Amplified fragment Length Polymorphism).

Os marcadores moleculares também são divididos em marcadores dominantes e codominantes. Os marcadores dominantes são RAPDs, AFLPs e ISSRs. Estes marcadores mostram somente um padrão de fragmento para o genótipo heterozigoto ou homozigoto dominante, e quando há ausência do fragmento infere-se que o genótipo é homozigoto recessivo (WOLFE, 2005), ou seja, cada loco (ou posição da banda) é 'marcado' em um 'binário' sendo 'presença do produto' [1] ou 'ausência do produto' [0], portanto a informação genotípica completa não está disponível a partir de marcadores dominantes, com isso, as frequências alélicas da população são estimadas indiretamente (KINDT et al., 2009). Apesar desses tipos de marcadores receberem algumas críticas devido ao seu caráter dominante, Holsinger, Lewis e Dey (2002) desenvolveram uma abordagem bayesiana em que é possível quantificar a variação genética com dados obtidos de marcadores dominantes.

Entre as várias ferramentas de marcadores moleculares dominantes, o ISSR com base na amplificação pela PCR, tem sido amplamente utilizado para estudos de genética de populações de diversas espécies de plantas (WOLFE, 2005; CHEN et al., 2006; LI; JIN, 2008; HU et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2010; BRANDÃO; VIEIRA; CARVALHO, 2011). Iniciadores de ISSR anelam sequências simples repetidas (microssatélites) ancoradas ou não, por uma sequência 5' ou 3', e com poucos nucleotídeos específicos (1 a 3), amplificam sequências entre dois locos microssatélites, os quais são abundantes no genoma (NARZARY; RANA; RANADE, 2010). Os fragmentos obtidos pela amplificação destas regiões de DNA, geralmente apresentam 200 a 2000 pb (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Devido a uma maior

temperatura de anelamento e a sequência mais longa de iniciadores, os marcadores ISSR podem produzir bandas mais reprodutíveis do que RAPD (WOLFE; XIANG; KEPHART, 1998; GOULÃO et al., 2001; QIAN; GE; HONG, 2001), e o custo das análises é relativamente mais baixo do que a de alguns outros marcadores tais como RFLP, SSR e AFLPs (WANG et al., 2008).

Estudo realizado por Brandão, Vieira e Carvalho (2011) utilizando dez *primers* ISSR para avaliação da estrutura genética espacial em microescala de *Myrcia splendens* em 168 árvores distribuídas em cinco fragmentos e 104 árvores distribuídas nos quatro corredores de vegetação obtiveram 70 locos polimórficos. Os resultados mostraram que a maior proporção da variabilidade genética encontra-se dentro das populações (Fragmentos 96,5% e corredores 91,1%) e estão de acordo com os relatados para outras espécies arbóreas tropicais de fecundação cruzada e longevas. Os autores ainda evidenciam que a divergência entre populações é reduzida devida ao fluxo gênico, realizado via pólen e, ou, sementes, cujos vetores provavelmente têm sua migração entre fragmentos facilitada pelos corredores de vegetação, o que resultou na baixa divergência genética entre os fragmentos.

Outro estudo, em análise comparativa da diversidade e estrutura genética de duas espécies arbóreas do mesmo gênero: a *Dimorphandra wilsonii*, em perigo de extinção, endêmica e com baixo tamanho populacional (21 indivíduos) e a *Dimorphandra mollis*, que apresenta uma ampla distribuição, Souza e Lovato (2010) avaliaram oito populações de *D. mollis* e todos os indivíduos de *D. wilsonii* foram amostrados para a análise da variabilidade genética, utilizando marcadores ISSR. O percentual de bandas polimórficas, a diversidade genética de Nei e o índice de Shannon foram consideravelmente menores em *D. wilsonii* ($P = 40\%$, $H_E = 0,124$ e $I = 0,19$) comparados com *D. mollis* ($P = 70,4\%$, $H_E = 0,190$ e $I = 0,297$). A análise bayesiana agrupou os indivíduos de *D. wilsonii* em três populações e os mesmos apresentaram elevada diferenciação, e estes

resultados permitiram a sugestão de diversas medidas para a sua conservação, como a proteção de todas as populações existentes, a conservação *ex situ* das sementes, a produção de mudas em viveiros e o plantio de mudas da espécie em áreas de reserva.

No estado do Acre, a castanha do Brasil, *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae) é classificada pela população local em dois tipos de acordo com suas características morfológicas, incluindo cor, qualidade da madeira, forma do tronco e coroa, e produção de frutos. Comparando dados morfológicos e moleculares por meio de marcadores RAPD e ISSR foram encontradas diferenças significativas para as características morfológicas, porém os resultados obtidos com os marcadores moleculares mostraram que os dois tipos classificados localmente de castanheiras não diferem geneticamente, indicando que não há separação consistente entre elas (SUJII et al., 2013).

Apesar de bastante eficaz na quantificação da diversidade genética entre indivíduos e no estabelecimento de estratégias de conservação, a análise genética com esse tipo de marcador não permite estimar relações de ancestralidade entre os alelos, sendo necessário para estes casos o uso de marcadores codominantes, como isoenzimas e microssatélites (SSR) (LIMA, 1998).

Os marcadores microssatélites são capazes de identificar os dois tipos de alelos que um indivíduo diploide pode apresentar (heterozigoto e homozigoto). Os microssatélites apresentam uma série de vantagens sobre os demais, uma vez que são abundantes, cobrem extensivamente o genoma, possuem natureza multialélica, necessitam de pequenas quantidades de DNA para análise, são de fácil detecção por PCR (reação em cadeia da polimerase), têm herança do tipo mendeliana e são expressos como alelos codominantes (LIMA, 1998; MOREIRA, 1999).

O conteúdo genético informativo de um loco microssatélite é bastante alto, por se tratar de sequência de alta taxa evolutiva. Mesmo em comparações de germoplasma com estreita base genética, geralmente detecta-se um alto número de alelos em um loco microssatélite. A grande limitação do uso em larga escala de marcadores SSR é a obtenção de iniciadores utilizados na PCR para amplificar alelos em cada loco. A maior dificuldade do uso rotineiro e universal dos microssatélites como marcadores moleculares, está no desenho dos iniciadores por se tratar de uma técnica de elevado custo devido à construção de biblioteca genômica, seleção de clones positivos, desenho e teste de iniciadores, em que geralmente 10% a 20% dos iniciadores são informativos (BUSO et al., 2003). Entretanto, uma alternativa tem sido o uso de marcadores heterólogos mediante amplificações cruzadas, ou seja, a amplificação de DNA utilizando-se iniciadores desenhados a partir de espécies correlatas.

Portanto, os diversos tipos de marcadores disponíveis são diferenciados pela tecnologia utilizada, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade e, principalmente, na habilidade do parâmetro que se objetiva detectar, sejam essas diferenças entre indivíduos, estrutura genética de populações, filogenia ou filogeografia.

No Brasil, o número de trabalhos utilizando marcadores microssatélites tem se intensificado nos últimos anos e diferentes espécies de interesse ecológico, econômico e que se encontra em risco de extinção têm sido estudadas com relação aos seus aspectos genéticos. A finalidade principal é elucidar os padrões de diversidade genética, sistema reprodutivo, fluxo gênico e estrutura genética espacial. Entre os vários estudos, podem ser citados os trabalhos de Bittencourt e Sebbenn (2007), Colevatti et al. (2010), Ferreira-Ramos (2011), Abreu et al. (2007), Conson et al. (2013) e Nazareno e Reis (2014).

Para exemplificar um destes estudos, a variabilidade genética de *Luehea divaricata* (Malvaceae), uma espécie típica da Mata Atlântica encontrada em

mata ciliar, foi analisada ao longo de sua área de distribuição utilizando nove locos microssatélites. Um total de 50 alelos foi obtido com uma heterozigosidade média observada e esperada de 0,53 e 0,67, respectivamente. A maior parte da diversidade genética foi encontrada dentro das populações, enquanto que o nível de diferenciação genética foi moderado (6,84) entre as populações. Foram detectados diferentes níveis de fluxo gênico entre as populações. Os valores positivos e significativos de endogamia foram encontrados em sete populações. A presença de vários locos em desequilíbrio de ligação confirma que essas populações experimentaram uma perda de diversidade genética causada pela deriva genética. Os resultados mostraram que é necessário desenvolver estratégias de gestão para a conservação destas populações de *L. divaricata*, pois a viabilidade da espécie nas próximas gerações está severamente comprometida (CONSON et al., 2013).

Em outro estudo realizado com *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (Apocynaceae), conhecida como peroba-rosa, planta nativa da Floresta Estacional Semidecidual, foram amostradas 30 árvores reprodutivas de *A. polyneuron* em uma região que se encontra fortemente impactada pelos plantios de cana-de-açúcar localizados ao longo das bacias dos rios Pardo e Mogi-Guaçu no estado de São Paulo. A diversidade genética média foi alta ($H_E = 0,65$) e variou de 0,17 a 0,92 nas populações analisadas. Os desvios significativos do HWE podem ser devidos ao efeito Wahlund (isto é, da subestrutura da população). Apesar da endogamia detectada algumas populações apresentaram alta diversidade genética, fluxo gênico e taxa de cruzamento (FERREIRA-RAMOS et al., 2011), indicando a importância de conservar estas áreas.

Portanto, nota-se a importância dos estudos genéticos que devem ser associados aos estudos ecológicos para elaborar planos de conservação e manejo de plantas que se encontram em ambientes degradados. O conhecimento destes parâmetros contribui para a elaboração de estratégias de conservação e para uma

gestão sustentável dos recursos genéticos, principalmente para aquelas espécies que estão em paisagens fragmentadas e degradadas.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A diversidade dos seres vivos é o resultado do longo processo de evolução e constitui uma das mais importantes condições para a estabilidade do ecossistema tropical. Portanto, o empobrecimento de qualquer ecossistema por diminuição do número de espécies e/ou indivíduos de uma espécie compromete seriamente sua estabilidade.

Algumas ações naturais e antrópicas levam à fragilidade das populações, porém dentre as ações antrópicas que aceleram tal estado dos vegetais destaca-se o extrativismo. De modo que, realizado sem critérios e sem monitoramento é uma prática que contribui para o declínio da estabilidade genética devido à influência imediata na regeneração dessas populações, principalmente, estas que estão inseridas em ambientes altamente modificados diante da fragmentação vegetacional do Brasil. Portanto, o conhecimento da diversidade genética das espécies é extremamente necessário para se implementar ações conservacionistas que possam minimizar as consequências genéticas negativas às populações naturais em gerações futuras.

Análise com os marcadores SSR e ISSR podem fornecer informações altamente relevantes para implementação de ações conservacionistas e manutenção dessas populações, como tombamento provisório, pelo patrimônio ambiental, das árvores que apresentam características genéticas diferenciadas. Além deste, o enriquecimento das populações que apresentam baixa densidade populacional com indivíduos geneticamente diferenciados, favorecendo o reconhecimento dessas áreas como Unidades Operacionais (UO's), sendo estas

capazes de manter populações mínimas viáveis, evitando a perda de variabilidade genética devido à deriva ou endogamia.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. G. et al. The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 119-121, Jan. 2012.

AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Oxford, v.17, n. 24, p. 5177–5188, Dec. 2008.

ALBINO, A. M. et al. Evolution of squamata reptiles in Patagonia based on the fossil record. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 103, n. 2, p. 441–457, June 2011.

ANTONELLI, J. A. et al. Molecular studies and paleogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. In: HOORN, C.; WESSELINGH, F. **Amazonia, landscape and species evolution**. (Ed.). New York: Wiley-Blackwell, 2010. p. 386–404.

ARAGON, E. et al. Palaeogeography and palaeoenvironments of northern Patagonia from the Late Cretaceous to the Miocene: the palaeogene andean gap and the rise of the North Patagonian High Plateau. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 103, n. 2, p. 305–315, June 2011.

ARNOLD, J. E.; PÉREZ, M. R. Framing the issues relating to non-timber forest products research. In: ARNOLD, J. E.; PÉREZ, M. R. (Ed.). **Current issues in non-timber forest products**. Zimbabwe: CIFOR, 1995. Chap. 1, p. 1-18.

AS REGIÕES biologicamente mais ricas e ameaçadas do planeta. **Hotspots**, Amsterdam, p. 01-14, 2007. Disponível em: <http://www.conservacao.org/publicacoes/files/capa_hotspots.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2013.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 3–15, Jan. 2009.

AVISE, J. C. **Phylogeography**: the history and formation of species. Massachusetts: Harvard University Press, 2000.

AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, BRASIL. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 185-194, jan./mar. 2006.

BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Revista Heredity**, London, v. 99, p. 580–591, 2007.

BORBA, V. S. **Marcadores moleculares classificação e aplicações**. Viçosa: Editora da UFV, 2006. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/gmol/gmol005.htm>>. Acesso em: 02 out. 2006.

BRANDÃO, M. M.; VIEIRA, F. de A.; CARVALHO, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 957-964, set./out. 2011.

BRASIL. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2002.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Mata Atlântica**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica/mapa-da-area-de-aplicacao>>. Acessado em: 04 jun. 2014.

BRAUNISCH, V.; SEGELBACHER, G.; HIRZEL, A. H. Modelling functional landscape connectivity from genetic population structure: a new spatially explicit approach. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 17, p. 3664-3678, Sept. 2010.

BUSO, G. S. C. et al. Maracadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 30, p. 46-50, jan./jun. 2003.

BYRNE, M. Evidence for multiple refugia at different time scales during Pleistocene climatic oscillations in southern Australia inferred from phylogeography. **Quaternary Science Reviews**, Oxford, v. 27, n. 27-28, p. 2576–2585, Dec. 2008.

CABANNE, G. S. et al. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 49, n. 3, p. 760–773, Dec. 2008.

CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 35, p. 1187–1201, 2008.

CAVALLOTTO, L. J.; VIOLANTE, A. R.; HERNANDEZ-MOLINA, J. F. Geological aspects and evolution of the Patagonian continental margin. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 103, n. 2, p. 346–362, June 2011.

CHEN, J. M. et al. The extent of clonality and genetic diversity in the rare *Caldesia grandis* (ALISMATACEAE): comparative results for RAPD and ISSR markers. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 84, n. 4, p. 301–307, May 2006.

CHEVIRON, Z. A.; HACKETT, S. J.; CAPPARELLA, A. P. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian

diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 36, n. 2, p. 338–357, Aug. 2005.

COLLEVATTI, R. G. et al. Spatial genetic structure and life history traits in Cerrado tree species: inferences for conservation. **Natureza & Conservação**, Goiás, v. 8, n. 1, p. 54-59, jul. 2010.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Floresta Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília: MMA/SBF, 2000.

CONSON, A. R. et al. Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). **Genetica**, Dordrecht, v. 141, n. 4-6, p. 205-215, June 2013.

COSTA, L. P. et al. Biogeography of South America forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. **Biotropica**, Washington, v. 32, n. 4, p. 872-881, Dec. 2000.

COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 71–86, Jan. 2003.

CRANDALL, K. A. et al. Considering evolutionary processes in conservation biology. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 15, n. 7, p. 290-295, July 2000.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DANTAS, A. C. M.; NODARI, R. O. **Marcadores Genéticos**. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2006. Disponível em: <www.cca.ufsc.br/dfito/labs>. Acesso em: 21 fev. 2006.

DICK, C. W.; HEUERTZ M. The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species. **Evolution**, Lancaster, v. 62, n. 11, p. 2760–2774, Nov. 2008.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; CAMPOS, T. M. P. de; BONATTO, S. L. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 35, p. 753–763, 2008.

DINIZ-FILHO, J. A.; TELLES, M. P. C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation Biology**, Malden, v. 16, n. 4, p. 924-935, 2002.

DITCHFIELD, A. D. The comparative phylogeography of neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 9, p. 1307-1318, Sept. 2000.

EPPERSON, B. K.; MCRAE, B. H. Utility of computer simulations in landscape genetics. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 17, p. 3549-3564, Mar. 2010.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 34, p. 487–515, Nov. 2003.

FERNANDES, A. **Fitogeografia Brasileira**: fundamentos fitogeográficos: fitopaleontologia, fitoecologia, fitossociologia, fitocorologia. Ceará: Editora da UFC, 2007.

FERREIRA-RAMOS, R. et al. Microsatellite markers for *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), an endangered tropical tree species. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 98, n. 11, p. 300-302, Nov. 2011.

FOLGUERA, A. et al. A review of Late Cretaceous to Quaternary palaeogeography of the southern Andes. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 103, n. 2, p. 250–268, June 2011.

FREGONEZI, J. N. et al. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 171, n. 1, p. 140–153, Jan. 2012.

FREITAS, M. L. M. et al. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodum urundeuva* Fr. All. por marcadores dos AFLP. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 68, p. 21-28, ago. 2005.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Atlantic forest hotspots status: an overview. In: **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. de G. (Ed.). São Paulo : Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. p. 3-11.

GARRASTAZU, M. C.; MATTOS, P. P. Modelagem e distribuição geográfica. In: Gomes, L. J. et al. **Pensando a biodiversidade: aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. São Cristóvão: Editora da UFS, 2013. p. 21-35.

GASPARETTO JÚNIOR, R. A. Extrativismo vegetal no Brasil. **Info Escola**, Florianópolis, 2014. Disponível em: <<http://www.geografia/extrativismo-vegetal-no-brasil>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

GONÇALVES, M. P. M. et al. Propagação vegetativa da aroeira (*Schinus terebinthifolius*) por Alporquia. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 363-365, 2007.

GOULÃO, L. et al. M. Comparison between phenetic characterisation using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 48, p. 329–338, Mar. 2001.

GRAHAM, A. The Andes: a geological overview from a biological perspective. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 96, n. 3, p. 371–385, Sept. 2009.

HAFFER, J.; PRANCE, G. T. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos refúgios da diferenciação biótica. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 16, n. 46, p. 175-206, set./dez. 2002.

HEY, J. et al. Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 18, n. 11, p. 597-603, Nov. 2003.

HOLDEREGGER, R.; WAGNER, H. H. Landscape genetics. **BioScience**, Washington, v. 58, n. 3, p. 199, 2008.

HOLSINGER, K. E.; LEWIS, P. O.; DEY, D. A bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 7, p. 1157–1164, July 2002.

HOORN, C. et al. A. Amazonia through time: andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **Science**, New York, v. 330, n. 6006, p. 927-931, 2010.

HU, Y. P. et al. Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 264-274, June 2010.

JESUS, B. C.; GOMES, L. J. Importância socioeconômica. In: GOMES, L. J. et al. **Pensando a biodiversidade: aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. São Cristóvão: Editora da UFS, 2013. p. 56-83.

JESUS, N. B.; SANTANA, L. L.; GOMES, L. J. Extrativismo: reflexão para a gestão florestal da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no baixo São

Francisco-SE/AL. In: LUCAS, A. A. T.; AGUIAR NETTO, A. O. (Org.). **Águas do São Francisco**. São Cristóvão: Editora da UFS, 2011. p. 84-147.

JOHNSON, W. E. et al. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 79-94, Jan. 1999.

KINDT, R. et al. **Molecular markers for tropical trees: statistical analysis of dominant data**. Nairobi: World Agroforestry Centre, 2009.

KOSCINSKI, D. et al. Pleistocene climatic cycling and diversification of the Andean treefrog, *Hypsiboas andinus*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 2012–2025, Aug. 2008.

KRAMER, A. T. et al. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conservation Biology**, Malden, v. 22, n. 4, p. 878–885, Aug. 2008.

LAS PEÑAS, M. L. et al. Estudios citogenéticos en especies de *Schinus* (Anacardiaceae). **Arnaldoa**, Trujillo, v. 13, n. 2, p. 270-275, jul./dic. 2006.

LENZI, M.; ORTH, A. I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardeaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, v. 17, n. 2, p. 67-89, 2004.

LI, J. M.; JIN, Z. X. Genetic structure of endangered *Emmenopterys henryi* Oliv. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. **Genetics**, Austin, v. 133, n. 3, p. 227–234, July 2008.

LIMA, R. M. G. **Polimorfismos de microssatélites em DNA de equinos e seu uso na determinação de parentesco em animais da raça mangalarga machador**. 1998. 91 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

LINDENMAYER, D. B.; FISCHER, J. Tackling the habitat fragmentation panchreston. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 22, n. 3, p. 127-132, Mar. 2007.

LINDENMAYER, D. et al. A checklist for ecological management of landscapes for conservation. **Ecology Letters**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 78-91, Jan. 2008.

LINO, C. F. Panorama do cumprimento das metas de AICHI-CDB 2020 NA Mata Atlântica: avanços, oportunidades e desafios. **Anuário Mata Atlântica**, São Paulo, n. 2012, p. 1-90, 2012. Disponível em: <http://www.rbma.org.br/anuariomataatlantica/pdf/panorama_portugues.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2014.

LORENZEN, E. D.; HELLER; SIEGISMUND, H. R. Comparative phylogeography of African savannah ungulates. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, n. 15, p. 3656–3670, Aug. 2012.

MACE, G. M. The role of taxonomy in species conservation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: biological sciences**, Washington, v. 359, n. 1444, p. 711-719, 2004.

MANEL, S. M. K. et al. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 18, n. 4, p. 189-197, Apr. 2003.

MÁRQUEZ, A. et al. Phylogeography and pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the rio de La Plata Basin. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 7, n. 4, p. 563-575, Aug. 2006.

MARTINS, F. M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the carnival-moritz model of pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 104, n. 3, p. 499–509, Nov. 2011.

MARTINS, F. M.; DOMINGUES, M. V. Phylogeography of the Atlantic Forest. **Revista da Biologia**, Natal, nesp., p. 26-30, dez. 2011.

MARTINS, K. et al. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 7, n. 6, p. 957-969, Dec. 2006.

MCGARIGAL, K.; CUSHMAN, S. A. Comparative evaluation of experimental approaches to the study of habitat fragmentation effects. **Ecological Applications**, Tempe, v. 12, n. 2, p. 335-345, Apr. 2002.

MCKINNON, J. S. et al. Evidence for ecology's role in speciation. **Nature**, London, v. 429, p. 294-298, May 2004.

MELO, J.; AMORIM, E.; ALBUQUERQUE, U. Native medicinal plants commercialized in Brazil: priorities for conservation. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 156, n. 1-4, p. 567-580, Sept. 2009.

MILÁ, B. et al. Divergence with gene flow and fine-scale phylogeographical structure in the wedge-billed woodcreeper, *Glyphorhynchus spirurus*, a Neotropical rainforest bird. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, n. 14, p.2979-2995, July 2009.

MIYAKI, C. Filogeografia e a descrição da diversidade genética da fauna brasileira. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 5, n. 1-2, p. 96-100, dez. 2009.

MOREIRA, H. L. M. **Análise da estrutura de plantéis e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélites**. 1999. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. **Systematic Biology**, Washington, v. 51, n. 2, p. 238-254, Apr. 2002.

MOVIMENTO POPULAR ECOLÓGICO DE SERGIPE. **A Mata Atlântica no estado de Sergipe**. Sergipe: Mopec, 2008. Disponível em <<http://mopec.no.sapo.pt/mata.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 333, p. 853-858, Feb. 2000.

NARZARY, D.; RANA, T. S.; RANADE, S. A. Genetic diversity in inter-simple sequence repeat profiles across natural populations of Indian pomegranate (*Punica granatum* L.). **Plant Biology**, Stuttgart, v. 12, n. 5, p. 806–813, Sept. 2010.

NASCIMENTO, F. F. et al. Colonization process of the Brazilian common vesper mouse, *Calomys expulsus* (Cricetidae, Sigmodontinae): a biogeographic hypothesis. **Journal of Heredity**, Washington, v. 102, n. 3, p. 260-268, 2011.

NASCIMENTO, M. A. et al. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 394-397, 2010.

NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 4, p. 264–276, 1997.

NAZARENO, A. G.; REIS, M. S. Where did they come from? Genetic diversity and forensic investigation of the threatened palm species *Butia eriospatha*. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 15, n. 2, p. 441-452, Apr. 2014.

NEVILL, P. G.; BOSSINGER, G.; ADES, P. K. Phylogeography of the world's tallest angiosperm, *Eucalyptus regnans*: evidence for multiple isolated Quaternary refugia. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 179–192, Jan. 2010.

NIETO FELINER, G. Southern European glacial refugia: a tale of tales. **Taxon**, Utrecht, v. 60, n. 2, p. 365-372, Apr. 2011.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, Washington, v. 32, n. 4, p. 793–810, Dec. 2000.

PARDIÑAS, U. F. J. et al. The evolutionary history of sigmodontine rodents in Patagonia and Tierra del Fuego. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 103, n. 2, p. 495–513, June 2011.

PATTON, J. L.; SILVA, M. N. F. da; MALCOLM, J. R. Mammals of the Rio Jurua and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v. 244, n. 2, p. 1-306, 2000.

PELLEGRINO, K. C. M. et al. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 85, n. 1, p. 13–26, May 2005.

PENNINGTON, R. T. et al. Contrasting plant diversification histories within the Andean biodiversity hotspot. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 31, p. 13783–13787, 2010.

PENNINGTON, R. T.; PRADO, D. A.; PENDRY, C. Neotropical seasonally dry forests and Pleistocene vegetation changes. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 261-273, Mar. 2000.

PETERS, C. M. **The ecology and management of non-timber forest resources**. Guernsey: The World Bank, 1996.

PETIT, R. J. et al. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. **Science**, New York, v. 300, n. 5225, p. 1563-1565, 2003.

PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 80, n. 4, p. 902–927, 1993.

PRIMACK, R. B.; EFRAIM, R. **Biologia da conservação**. Londrina: Editora Efraim Rodrigues, 2001.

QIAN, W.; GE, S.; HONG, D. Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 2-3, p. 440–449, Feb. 2001.

RAMÍREZ, J. L.; CEVALLOS-FERRIZ, S. R. S. A assemblage diverso de Anacardiaceae de sedimentos Oligoceno, Tepexi de Rodriguez, Puebla, México. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 89, n. 3, p. 535–545, Mar. 2002.

REVILLA, E.; WIEGAND, T. Individual movement behavior, matrix heterogeneity, and the dynamics of spatially structured populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 49, p. 19120-19125, Apr. 2008.

RIBEIRO, R. A. et al. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Heredity**, Washington, v. 106, n. 1, p. 46–57, 2011.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1995.

SABBI, L. de B. C.; ÂNGELO, A. C.; BOEGER, M. R. Influência da luminosidade nos aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de folhas de *Schinus*

terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) implantadas em duas áreas com diferentes graus de sucessão, nas margens do Reservatório Iraí, Paraná, Brasil. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 65, n. 2, p. 171-181, 2010.

SANO, E. E. et al. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 166, n. 1-4, p. 113-124, July 2010.

SATO, T. et al. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. **Journal of Heredity**, Washington, v. 96, n. 1, p. 79-84, 2006.

SAUNDERS, D. A.; HOBBS, R. J.; MARGULES, C. R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, Malden, v. 5, n. 1, p. 18-32, Mar. 1991.

SÉRSIC, A. N.; COSACOV, A.; COCUCCHI, A. A. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 103, n. 2, p. 475-494, June 2011.

SILVA, D. L. M. **Apostila de biogeografia**. Canoas: Ulbra, 2014.

SILVA, S. M. et al. Divide to conquer: a complex pattern of biodiversity depicted by vertebrate components in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 107, n. 1, p. 39-55, Sept. 2012.

SOUZA, H. A. V.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: implications for conservation. **Biochemical and Systematics Ecology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 49-56, Feb. 2010.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Genetic structure in fragmented populations of *Chorisia speciosa* St. Hil. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 65, n. 1, p. 70-79, 2004.

STORFER, A. et al. Putting the 'landscape' in landscape genetics. **Journal of Heredity**, Washington, v. 98, n. 2, p. 128-142, 2007.

SUJII, P. S. et al. Morphological and molecular characteristics do not confirm popular classification of the Brazil nut tree in Acre, Brasil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 4018-4027, 2013.

SWOFFORD, D. L. et al. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D. M. et al. **Molecular systematics**. Massachusetts: Sinauer, 1996. Chap. 4, p. 407-514.

THOMÉ, M. T. C. et al. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 55, n. 3, p. 1018-1031, June 2010.

TRENEL, P. et al. Mid-tertiary dispersal, not Gondwanan vicariance explains distribution patterns in the wax palm subfamily (Ceroxyloideae: Arecaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 45, n. 1, p. 272-288, Oct. 2007.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 1193-1213, Mar. 2013.

TURNER, T. F. et al. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. **Journal of Fish Biology**, London, v. 64, p. 186-201, 2004.

WALLIS, G. P.; TREWICK, S. A. New Zealand phylogeography: evolution on a small continent. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, n. 17, p. 3548-3580, Sept. 2009.

WANG, C. et al. Genetic differentiation in endangered *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino based on ISSR polymorphism and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 36, n. 9, p. 699–705, Sept. 2008.

WARD, J. V. et al. Riverine landscape diversity. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 517–539, Apr. 2002.

WILLIAMS, K. J. et al. Forests of East Australia: the 35th biodiversity hotspots. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. (Ed.). **Biodiversity hotspots**. Luxembourg: Springer, 2011. p. 295–310.

WILLIS, S. C. et al. The Casiquiare river acts as a corridor between the Amazonas and Orinoco river basins: biogeographic analysis of the genus *Cichla*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 1014–1030, Mar. 2010.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods Enzymology**, New York, v. 395, p. 134–144, 2005.

WOLFE, A. D.; XIANG, Q. Y.; KEPHART, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 1107–1125, 1998.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chainreaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 2, p. 176–183, Mar. 1994.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1: Estrutura genética de populações naturais de *Schinus terebinthifolius* Raddi¹

RESUMO

Diante do elevado uso dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, a espécie encontra-se em declínio demográfico em diferentes regiões, o que poderá levar a uma diminuição de seu tamanho efetivo populacional com consequências genéticas. Para analisar a diversidade genética de populações, este trabalho teve como objetivo determinar a estrutura e diversidade genética dentro e entre populações naturais de *S. terebinthifolius* visando identificar populações com potenciais genéticos que possam auxiliar em projetos de conservação, restauração ecológica e implementação de planos de manejo para a espécie. Para isso, folhas de árvores reprodutivas foram coletadas nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Sergipe, em oito fragmentos florestais, totalizando 223 indivíduos. As reações PCR foram realizadas utilizando um conjunto de oito locos SSR descrito para a espécie, sendo estas amplificadas e visualizadas em géis de agarose de alta resolução (MetaPhor®). O valor médio estimado de f não diferiu de zero, o que mostra não ocorrer endogamia no conjunto das populações, porém, em média, as populações apresentaram nível baixo de diversidade genética ($H_E=0,30$). A análise da variância molecular inferiu que entre regiões a diversidade é zero e a diferenciação genética entre as populações tanto pela estatística R_{ST} (0,35) como para o $G_{ST}^{(Hedrick)}$ (0,41). O programa Structure evidenciou que os genótipos estão estruturados em sete agrupamentos ($\Delta K=7$). As populações amostradas de pimenta-rosa não se encontram isoladas pela distância, segundo o teste de Mantel e foi evidenciado pela presença de migrantes entre as populações de LV (Lavras) e NE (Neópolis), porém apresentaram barreiras físicas à ocorrência de fluxo gênico, o que sugere que no passado existia uma ligação entre essas populações. O Rio São Francisco funciona como barreira natural ao fluxo gênico. O terreno planáltico do estado de Minas Gerais favoreceu o rompimento do fluxo gênico entre as populações mineiras. As populações de Sergipe ainda apresentam níveis de diversidade genética que devem ser contemplados para a sua conservação em áreas de intenso extrativismo.

Palavras-chave: Diversidade Genética; Extrativismo; Fluxo gênico; Fragmentação; Microsatélites, Alelos exclusivos

¹ Artigo redigido conforme norma da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira, sendo esta uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial poderá sugerir alterações.

ARTICLE 1: Genetic structure natural *Schinus terebinthifolius* Raddi populations

ABSTRACT

In face of the elevated use of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruits, the species is found in demographical decline in different regions which may lead to a decrease in the effective population size with genetic consequences. To analyze the genetic diversity of the populations, this work had the objective of determining the genetic structure and diversity inside and between natural *S. terebinthifolius* populations aiming at identifying populations with genetic potential which may aid in conservation projects, ecological restoration and implementation of management plans for the species. For this, leaves were collected from reproductive trees in the states of Minas Gerais, Espírito Santo and Sergipe, in Brazil, in eight forest fragments, totalizing 223 individuals. The PCR reactions were performed using a set of eight SSR locus described for the species, amplified and visualized in high resolution agarose gels (MetaPhor®). The average value estimated for f did not differ from zero, which shows that endogamy does not occur in the population set, however, in average, the populations presented low genetic diversity level ($H_E=0.30$). The molecular analysis of variance inferred that between regions the diversity is zero and the genetic differentiation between the populations wither by R_{ST} statistics (0.35) as by $G_{ST(Hedrick)}$ (0,41). The Structure program evidenced that the genotypes are structured in seven groupings ($K=7$). The sampled Brazilian pepper populations are not isolated by distance, according to the Mantel test and was evidenced by the presence of migrants between the populations from LV (Lavras) and NE (Neópolis), however presented physical barriers to the occurrence of genic flow, which suggests that in the past there was a connection between these populations. The São Francisco river acts as a natural barrier to the genic flow. The highland landscape of the state of Minas Gerais favored the rupture of the genic flow between the populations of Minas Gerais. The population from Sergipe still presents genetic diversity levels which must be contemplated for its conservation in areas with intense extractivism.

Keywords: Genetic Diversity; Extractivism; Genic Flow; Fragmentation; Microsatellites; Exclusive Alleles.

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas do Quaternário ocorridas durante os últimos 2,5 milhões de anos desempenharam um papel importante na mudança geográfica e distribuição das espécies de plantas (COMES; KADEREIT, 1998). A distribuição geográfica dos organismos, tanto no passado como no presente e, os padrões e processos ocorridos na Terra estão relacionados à biodiversidade que é observada atualmente. Portanto, tais mudanças também afetaram a estrutura e organização da diversidade genética das populações naturais devido a mudanças nas taxas de migração (fluxo gênico), fragmentação e isolamento das populações (BATALHA FILHO; MIYAKI, 2011). Nesse sentido, caso haja um padrão de distribuição geográfica das diversidades genéticas entre as populações é possível identificar áreas que possam ser importantes para a conservação e, com base na estrutura genética populacional, algumas áreas devem ser prioritárias para a conservação (HEY et al., 2003).

A identificação dessas áreas é importante para delinear estratégias a serem utilizadas em programas de conservação, uma vez que várias espécies de plantas são exploradas constantemente e de forma inadequada, principalmente seus frutos e flores, e pouco se conhece sobre os processos que operam na estruturação genética espacial (VOLIS; ZARETSKY; SHULGINA, 2010), o que pode levar a danos irreversíveis no seu conjunto gênico. Dentre estas espécies, encontra-se *Schinus terebinthifolius* Raddi; conhecida comercialmente como pimenta-rosa, onde a pressão do extrativismo sobre os frutos é preocupante, pois além de promover a falta de sementes no solo, muitas destas populações apresentam baixo número de migrantes (N_m) em consequência de barreiras físicas e da elevada fragmentação na área de sua ocorrência.

A pimenta-rosa apresenta é amplamente utilizada para fins terapêuticos (MELO et al., 2009) e suas sementes são muito apreciadas como especiaria, o

que vem aumentando sua demanda nos mercados interno e externo. Por possuir madeira de qualidade, essa espécie apresenta alto valor econômico, além de ser extremamente utilizada em programas para reflorestamento de matas ciliares (DURIGAN; SILVEIRA, 1999). A espécie é exigente a luz, nativa da América Tropical e pertence à família Anacardiaceae. No Brasil, é encontrada desde o estado do Pernambuco até o Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Devido à ampla distribuição geográfica, a pimenta-rosa apresenta grande plasticidade ecológica e rápido desenvolvimento com adaptação em diferentes ambientes (LENZI; ORTH, 2004), abrangendo diferentes domínios fitogeográficos e, associado às suas características apresenta tolerância hidromórfica e boa interação biótica.

A pressão do extrativismo sobre os frutos da pimenta-rosa inviabiliza a ocorrência de bancos de sementes e ou plântulas no solo, diminuindo significativamente a regeneração da população, esta atividade pode favorecer a endogamia, ocorrendo baixa variabilidade genética nas gerações seguintes. Como resultado tem-se a diminuição da possibilidade, no longo prazo, de adaptação de novas combinações de alelos e a ocorrência de indivíduos menos vigorosos (PRIMACK; EFRAIM, 2001), por possível deriva genética. Portanto, o estudo da diversidade genética de pimenta-rosa permitirá verificar os efeitos de diferentes processos históricos e ou contemporâneos que podem ter influenciado a atual estrutura genética populacional da espécie e, com estes dados elaborar medidas de manejo mais adequadas para a sua conservação.

Diante do elevado extrativismo dos frutos de pimenta-rosa, o objetivo do trabalho foi determinar a estrutura e diversidade genética dentro e entre populações naturais de pimenta-rosa, visando identificar populações com potenciais genéticos que possam auxiliar projetos de conservação, restauração ecológica e implementação de planos de manejo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Folhas de 223 árvores adultas de pimenta-rosa foram coletadas em oito remanescentes naturais nos estados de Espírito Santo, Minas Gerais e Sergipe (Figura 1). As coordenadas geográficas de todas as árvores foram obtidas por meio de sistema de posicionamento global (GPS). As folhas coletadas foram armazenadas em saco de papel contendo sílica e mantidas em freezer até o momento da extração do DNA genômico. Todas as etapas de obtenção do DNA foram realizadas no Laboratório de Conservação Genética de Espécies Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

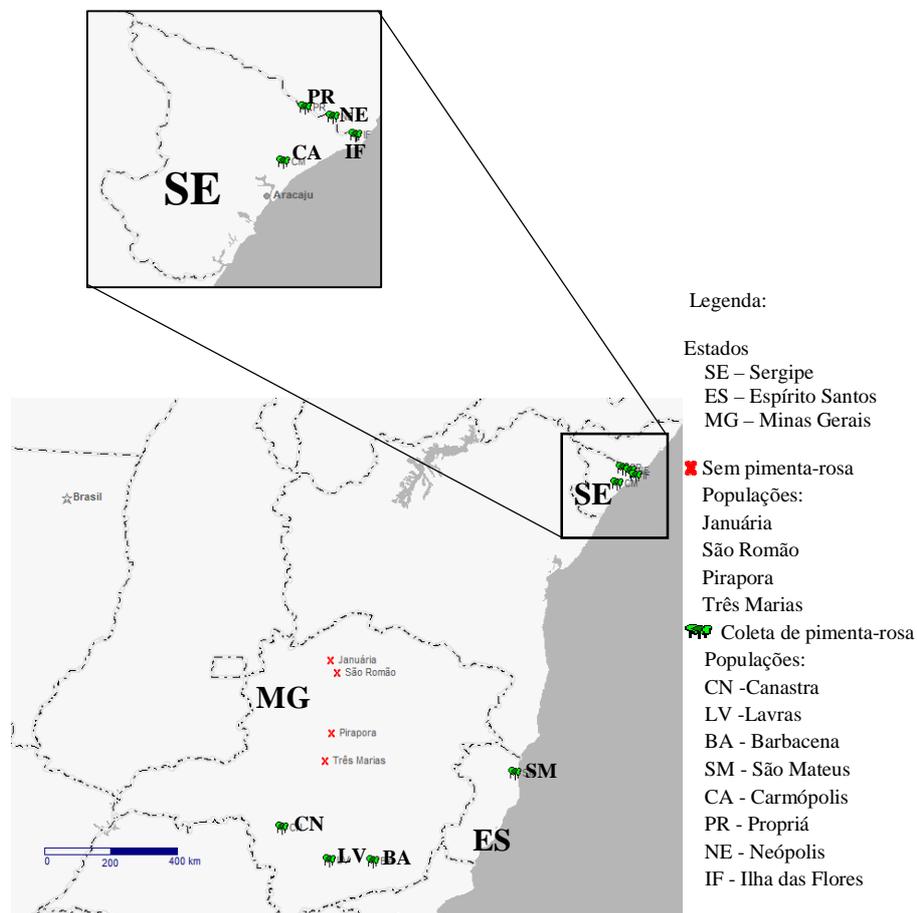


Figura 1 Localização das áreas de amostragem da pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

2.1.1 Caracterização dos locais amostrados

As populações amostradas para este estudo foram: CN (Canastra); LV (Lavras); BA (Barbacena); SM (São Mateus); (PR) Propriá; NE (Neópolis); IF (Ilha das Flores); CA (Carmópolis). As populações de *Schinus terebinthifolius* CN, LV e BA ocorrem em Minas Gerais; SM no Espírito Santo e PR, NE, CA e IF em Sergipe. Não foram encontrados indivíduos da espécie em Pirapora/MG

(17°39'21.89"S/ 44°53'50.56"W), Três Marias/MG (18°26'19.50"S/ 45° 5'22.10"W), São Romão/MG (16°34'46.52"S/ 45° 5'37.83"W) e Januária/MG (15°36'4.69"S/ 44°56'0.88"W). A seguir são apresentadas as características da paisagem na qual cada população está inserida.

Canastra (CN) - situa-se nas coordenadas 20°18' 50.64"S/46°18' 38.07"W – localiza-se próxima a Serra da Canastra, no município de São Roque de Minas, em Minas Gerais (Figura 2). A vegetação na área amostrada é típica de mata ciliar. Não foram encontrados indivíduos de pimenta-rosa dentro do Parque da Serra da Canastra. A área da coleta está a 781 m de altitude. A precipitação média anual da região é de 1.484 mm e o clima é descrito como Subtropical úmido (Classificação climática de Köppen-Geiger: Cwa). Os indivíduos de pimenta-rosa ocorrem em uma área localizada nas duas margens da rodovia MG-341. A área é um estreito corredor de vegetação ciliar interrompido pela rodovia, possui pouca vegetação arbórea, com presença de pimenta-rosa de forma agrupada em suas margens. Nesse local foram coletadas folhas de 27 indivíduos reprodutivos.



Figura 2 População de *Schinus terebinthifolius* Raddi, localizada no estado de Minas Gerais, próximo a Serra da Canastra (CN), situa-se nas coordenadas 20°18' 50.64"S/46°18' 38.07"W, no município de São Roque de Minas

Lavras (LV) - situa-se nas coordenadas 21°14'43.77"S/44°59'30.53"W – essa área está inserida dentro do *Campus* da UFLA, com altitude de 870 m (Figura 3). A classificação da vegetação é Floresta Estacional Semidecidual. A precipitação média anual da região é de 1.492 mm e o clima é descrito como Subtropical úmido (Classificação climática de Köppen-Geiger: Cwb). A maioria dos indivíduos estão distribuídos próximos um dos outros, com distância média de aproximadamente 3 m. Foram coletadas amostras de 12 indivíduos, sendo estes os únicos indivíduos adultos da espécie encontrados na área. A área apresenta-se isolada, com uma pequena vegetação arbórea cercada por construções.



Figura 3 População de *Schinus terebinthifolius* Raddi, localizada, no município de Lavras/MG (LV), situa-se nas coordenadas 21°14'43.77"S/44°59'30.53"W, inserida no *Campus* da Universidade Federal de Lavras

Barbacena (BA) - situa-se nas coordenadas 21°15'02.73"S/43°45'27.37"W - com altitude 1.100m, a área está inserida no IFET – Instituto Federal do Sudeste de Minas – *Campus* Barbacena, localizada na cidade de Barbacena/MG (Figura 4). A vegetação é classificada como Floresta Estacional Semidecidual. A precipitação média anual da região é de 1.519 mm e o clima é descrito como Subtropical úmido (Classificação climática de Köppen-Geiger: Cwb). Esse fragmento apresenta-se bastante conservado. Nessa área foram coletadas amostras de 30 indivíduos reprodutivos de pimenta-rosa.



Diego G. S. Pereira
Figura 4 População de *Schinus terebinthifolius* Raddi, localizada no estado de Minas Gerais, Barbacena (BA), inserida no IFET – Instituto Federal do Sudeste de Minas – *Campus* Barbacena

São Mateus (SM) - situa-se nas coordenadas 18°46'36.31"S/39°48'43.71"W – a área é bastante antropizada. A vegetação é um remanescente de Mata Atlântica (Figura 5). A precipitação média anual da região é de 1432 mm e o clima é descrito como Tropical com estação seca (Classificação climática de Köppen-Geiger: Aw). A área está em uma altitude de 15 m. As coletas foram realizadas em uma população localizada às margens da estrada na cidade de São Mateus/ES, com indivíduos presentes ao longo da estrada. A vegetação apresenta-se de forma arbustiva e em grande parte uma dominância de pimenta-rosa com indivíduos juvenis. Essa área apresenta um alto extrativismo da pimenta-rosa. Foram coletadas amostras foliares de 32 indivíduos reprodutivos.



Figura 5 População de *Schinus terebinthifolius* Raddi, localizada no estado do Espírito Santo, município de São Mateus (SM).

Propriá (PR) - situa-se nas coordenadas 10°13'19.67"S/36°47'35.45"W – essa área localiza-se às margens do Rio São Francisco (Figura 6). A vegetação é um remanescente da Mata Atlântica com associações da caatinga. A precipitação média anual da região é de 806,1 mm e o clima é descrito como Tropical com estação seca (Classificação climática de Köppen-Geiger: Cw). A área está em uma altitude de 10 m. É uma área bastante antropizada e sem ocorrência de mata ciliar na região. As coletas foram realizadas em ilhas, que além de apresentarem-

se fragmentadas, ainda sofrem pressão de extrativismo dos frutos de pimenta-rosa. Na área é comum a presença de pastagens, fluxo de pessoas, gado e poucos indivíduos de pimenta-rosa foram encontrados. Foram coletadas amostras foliares de 30 indivíduos reprodutivos distantes por mais de 50 m uns dos outros.



Figura 6 População de *Schinus terebinthifolius* Raddi, localizada no estado de Sergipe, município de Propriá (PR), situada às margens do Rio São Francisco

Neópolis (NE) - situa-se nas coordenadas $10^{\circ}17'45.02''S/36^{\circ}35'42.93''W$ – a área localiza-se às margens do Rio São Francisco (Figura 7). A classificação da vegetação é remanescente da Mata Atlântica com associações da caatinga. A precipitação média anual é de 1.200 mm e o clima é descrito como Tropical, com estação seca (Classificação climática de Köppen-Geiger: Cw). A área está em uma altitude de 11 m. A região apresenta intensa atividade de extrativismo. Nessa área são encontrados muitos indivíduos de pimenta-rosa nas margens do rio São Francisco e em ilhas, porém inseridas em ambientes fragmentados. Na área é comum a presença de pastagens, agricultura e construções. A área ainda apresenta atividade de extração de argila e madeira para lenha e estacas. Foram coletadas amostras foliares de 30 indivíduos reprodutivos



Figura 7 População de *Schinus terebinthifolius* Raddi, localizada no estado de Sergipe, município de Neópolis (NE), situadas às margens do Rio São Francisco

Ilha das Flores (IF) - situa-se nas coordenadas 10°25'58.63"S/36°26'09.38"W – A área localiza-se próximo a Foz do Rio São Francisco (Figura 8). A classificação da vegetação é remanescente da Mata Atlântica com associações de restinga e manguezais. A precipitação média anual é de 1200 mm e o clima é descrito como Tropical com estação seca (Classificação climática de Köppen-Geiger: Cw). A área está em uma altitude de 10 m. e encontra-se bastante antropizada. Apresenta indivíduos isolados no meio de pastagens e áreas sob alagamento. Foram coletadas amostras foliares de 47 indivíduos reprodutivos.



Figura 8 População de *Schinus terebinthifolius* Raddi, localizada no estado de Sergipe, município de Ilha das Flores (IF), situada próxima a Foz do Rio São Francisco

Carmópolis (CA) - situa-se nas coordenadas 10°38'46.76"S/36°56'53.97"W – Com 11 m de altitude, está inserida em uma área da Petrobrás. A classificação da vegetação é remanescente da Mata Atlântica. A precipitação média anual é de 1.400 mm e o clima é descrito como Tropical com estação seca (Classificação climática de Köppen-Geiger: Cw). Apresenta considerável nível de conservação, porém alguns pontos apresentam áreas abertas para retirada de petróleo. Nessa área a pimenta-rosa apresenta elevada densidade, porém só foi possível amostrar 12 indivíduos reprodutivos, devido aos problemas burocráticos para liberação de licença para as coletas.

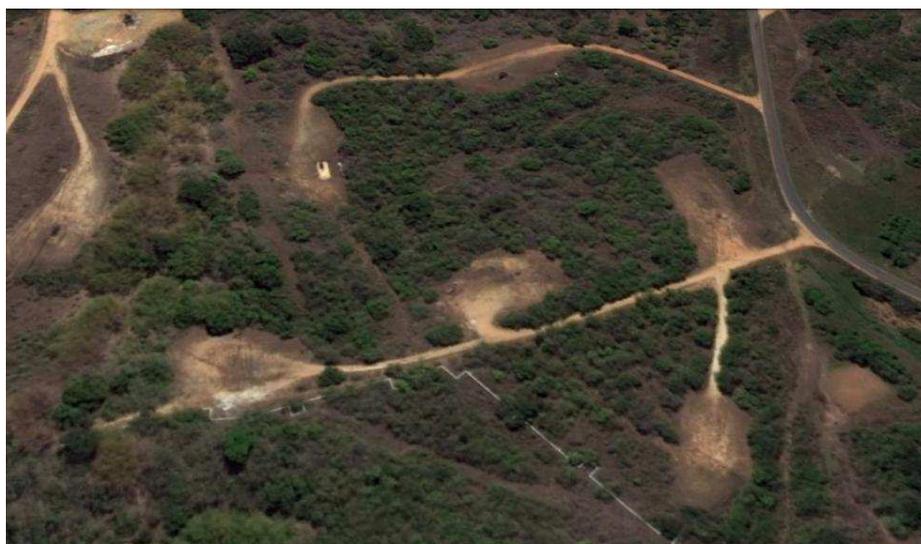


Figura 9 População de *Schinus terebinthifolius* Raddi, localizada no estado de Sergipe, município de Carmópolis (CA), situadas nas coordenadas 10°38'46.76"S/36°56'53.97"W. Fonte: Google Earth

2.2 Extração do DNA genômico

As amostras foliares foram maceradas utilizando-se PVP e 1000 µL tampão de extração CTAB 2% (100 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de EDTA 0,5

M pH 8,0; 500 mM de NaCl 5 M) O material macerado foi colocado em tubos tipo eppendorf e levados ao banho-Maria a 65°C por 40 minutos, fazendo leve agitação a cada 10 minutos. Após o período de incubação, 1.000 µL de cada amostra foram colocados em novos tubos contendo 1.000 µL da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados levemente até obtenção de uma emulsão e, posteriormente, centrifugados a 15.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi pipetado em um novo tubo contendo 750 µL de isopropanol gelado e acondicionado em freezer (-20°C) por 24 horas para precipitação do DNA. Após a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos, sendo assim possível descartar o sobrenadante e secar o precipitado. Após a secagem, o DNA foi solubilizado com 50 µL de TE (1 mM de Tris e 0,1 mM de EDTA) (DOYLE; DOYLE, 1987).

Após a extração foi feita a quantificação do DNA em gel de agarose 1,5%, por comparações com padrões de lambda DNA em concentrações de 5 ng, 10 ng, 25 ng e 50 ng.

2.3 Reação PCR

O volume total de cada amostra amplificada correspondeu à 16,5 µl: 3 µl de DNA adicionados a 13,5 µl de mix de reação [3,0 µl de tampão PCR 10X, 1,5 µl de dNTP (2,5 mM), 0,2 µl de Taq polimerase (5 U/µl) e 0,75 µl de cada iniciador (2 µM) e volume final foi completado com água ultrapura].

2.4 Obtenção dos marcadores de DNA

Um conjunto de oito iniciadores microssatélites descritos anteriormente para pimenta-rosa (WILLIAMS et al., 2002) foi utilizado para amplificação do

DNA de todas as amostras. As reações para amplificação do DNA foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700, onde foram efetuados 31 ciclos de amplificação constituídos de uma etapa de iniciação de 2 minutos a 94°C, seguido por uma etapa de desnaturação a 94°C por 15 segundos, uma etapa de ligação dos iniciadores SSR ao DNA molde (pareamento) em temperatura compatível para cada um dos oito iniciadores SSR (Tabela 1) por 15 segundos, e uma etapa de extensão a 72°C, por 30 segundos. Ao final, ocorreu a etapa de extensão a 72°C, por 5 minutos.

Tabela 1 Características de oito pares de microssatélites de *Schinus terebinthifolius* Raddi desenvolvidas por Willians et al. (2002) e utilizadas nas amplificações de *Schinus terebinthifolius* localizados nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Sergipe

<i>Locos</i>	<i>Sequencias iniciadoras 5'-3'</i>	<i>Sequencias repetidas</i>	<i>Tamanho (pb)</i>	<i>T^om (°C)</i>	<i>K</i>	<i>H_O (H_E)</i>
<i>Saat</i> T1 (AF404279)	AAGGGTGAGAATCTGAAATTTA GGCAAACCATTAGTGAGTTTAT	(AAT) ₂₁	173	60	6	1,0 (0,79)
<i>Saat</i> T9 (AF404280)	ATTTGGTGAATAGGAGATGTTTTA ATTGAAATGTTTGGTTCATAGATA	(AAT) ₈	202	55	3	0,50 (0,65)
<i>Saat</i> T16 (AF404282)	AACAGCCCACCATTTTAAACA TGGGTAGGTGATGCAGTTCTA	(AAT) ₁₀	200	65	4	0,70 (0,73)
<i>Saat</i> T17 (AF404283)	TTGGGTTAAATTGGTAGGTTGT AGGGGTAATGAAATCATCTTAT	(AAT) ₁₃	137	60	4	0,30 (0,44)
<i>Saat</i> T25 (AF404285)	GATCATTGGAAAATAATAATAA CGTGCAGAACTTCAATTT	(AAT) ₁₀ (AAT) ₉	83	50	4	0,50 (0,59)
<i>Saat</i> T47 (AF404287)	CCTCTTAAGGAACCTTTTATTATT TTGCTTTTCATTTGTTTATCTTA	(AAT) ₈	100	50	2	0,30 (0,52)
<i>Saat</i> T54 (AF404288)	AAAATAAAAAATGTTAATAATAATA TGGATATAAATAATCAATGTG	(AAT) ₉	161	50	3	0,40 (0,48)
<i>Saat</i> T55 (AF404289)	AAGGGGTTAAAAAATAATCAAAA ACTGGGAAGATAGATTACTTAGAA	(AAT) ₁₀	167	55	3	0,70 (0,51)

K (número de alelos); H_O (heterozigosidade observada; H_E (heterozigosidade esperada)

2.5 Eletroforese e coloração

Os produtos amplificados foram separados em géis de agarose de alta resolução (MetaPhor®) a 3% de concentração durante 3 h e coradas com brometo de etídio. Para a determinar o tamanho dos alelos foram utilizados marcadores de peso molecular (ladder) 20 e 50 pb (pares de bases).

2.6 Análises estatísticas

2.6.1 Genotipagem e detecção de alelos nulos

Em estudos genéticos utilizando marcadores microssatélites frequentemente são encontrados alelos nulos. A não detecção destes alelos nulos provoca erros de genotipagem (interpretações dos géis) que podem levar a desvios nas proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a uma deficiência de heterozigotos (SHAW et al., 1999). Para identificar possíveis erros de genotipagem foi utilizado o programa Micro Checker Versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). A frequência de alelos nulos em cada loco foi estimada usando o estimador Brookfield n° 1: $r = (He - Ho) / (1 + He)$. As frequências alélicas corrigidas foram usadas posteriormente para análise da diversidade genética.

2.6.2 Caracterização da diversidade genética

A diversidade genética foi caracterizada utilizando o programa GDA (LEWIS; AZYKIN, 2002), a partir dos seguintes parâmetros: riqueza alélica ou número médio de alelo por locos (A), o número de alelo efetivo por locos (Ae),

heterozigosidade observada (H_O), e a heterozigosidade esperada segundo expectativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E);

A máxima diversidade possível em cada loco foi estimada a partir do número de alelos observados, segundo a fórmula:

$$h_{max} = (\bar{A} - 1) / \bar{A}$$

A aderência das frequências genótípicas às proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada por meio do teste exato de Fisher. As probabilidades exatas menores que o nível de significância (0,05 ou 0,01) indicam desvios significativos.

2.6.3 Distância genética e divergência entre populações

A distância genética entre as populações foi caracterizada pela análise da variância hierárquica das frequências alélicas com base em Weir e Cockerham (1994). As estimativas de parâmetros genéticos obtidos foram: índice de fixação médio dentro de populações (f), índice de fixação total para o conjunto das populações (F) e divergência entre populações (θ_p). Essas estimativas foram calculadas usando o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2002). O intervalo de confiança a 95% dessas estimativas foi obtido por 10.000 reamostragens sobre os locos.

Em locos microssatélites, o processo mutacional não está de acordo com o que se admite no modelo de alelos infinitos. Por esse motivo, além da estimativa do (θ_p), foi calculada uma análoga a esta, denominada R_{ST} para o conjunto de populações e entre pares de populações utilizando o programa GenAlEx (PEAKALL; SMOUSE, 2006). A significância da estimativa foi obtida por meio de 1000 permutações e o intervalo de confiança a 95% por 10.000 reamostragens.

Adicionalmente, a diferenciação genética entre populações foi estimada usando G_{ST} , segundo método de Hedrick (2005) utilizando o programa GDA_NT (DEGEN, 2006).

As divergências genéticas entre pares de populações (R_{ST}) foram utilizadas para construir o dendrograma de acordo com o método UPGMA (método da média aritmética não ponderada) com o auxílio do programa NTSYS 2.0 (ROHLF, 2001). Para identificar padrões que expressam a diversidade genética foi realizada a análise das coordenadas principais (PCoA) (SMITH, 2002) utilizando-se o programa GenAEx (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

A variação genética dos indivíduos dentro e entre populações foi avaliada por análise de variância molecular (AMOVA) com auxílio do programa GenAEx (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

O teste de Mantel foi aplicado para avaliar se há correlação positiva entre a matriz de diferenciação genética entre pares de populações (R_{ST}) e a matriz de distância geográfica entre as populações, com uso do programa NTSYS-pc 2.0 (ROHLF, 2001). A comparação das matrizes foi realizada com o intuito de verificar se existe correlação entre diferenciação genética e distância geográfica.

Estimativas de diferenciação genética também foram calculadas usando o método de estimativas de alelos nulos (ENA) (10.000 permutações) implementado pelo programa FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007), que corrige a presença de alelos nulos.

2.6.4 Aderência ao Equilíbrio de Mutação e Deriva

Os desvios significativos do Equilíbrio de Mutação e Deriva (efeitos de gargalo) são importantes de serem detectados porque a condição deste equilíbrio é um dos pressupostos requeridos em vários modelos para análises de genética

de populações (MORAES et al., 2003). O teste de aderência ao Equilíbrio entre Mutação e Deriva genética baseia-se no princípio de que populações que experimentaram uma recente redução de seu tamanho efetivo populacional apresentam uma redução do número de alelos e da heterozigosidade esperada (H_E) pelas proporções de EHW o que faz com que H_e se torne maior do que a heterozigosidade esperada sob Equilíbrio entre Mutação e Deriva (H_{eq}) porque H_{eq} é calculada a partir do número de alelos (CORNUET; LUIKART 1996; PIRY et al., 1999).

Para verificar se as populações de pimenta rosa passaram por uma redução recente na diversidade genética foi utilizado o programa BOTTLENECK versão 1.2.02 (CORNUET; LUIKART, 1996) utilizando os modelos de mutação: IAM (Modelo de Alelos Infinito), onde supõe que cada mutação cria um novo alelo; SMM (Modelo simples de mutação), onde em cada mutação ocorre o ganho ou a perda de um repetição; e TPM (modelo de duas fases de mutação), que é intermediário aos modelos anteriores. Esses testes estimam valores esperado de heterozigosidade considerando a premissa de que, em um gargalo evolutivo recente e rápido, o efeito é maior sobre o número de alelos e menor sobre a heterozigosidade. A significância do excesso de diversidade genética ($H_e > H_{eq}$) foi avaliada por meio do teste de Wilcoxon por ser robusto quando utilizado para poucos locos (< 20 ; PIRY et al., 1999), baseando-se em 10.000 replicações. Para estimar as taxas de migração foi utilizado o programa GeneClass2 (v2, PIRY et al., 2004).

2.6.5 Estrutura genética

Foi realizada análise de estrutura genética populacional fundamentada no modelo de agrupamento bayesiano com o auxílio do programa STRUCTURE v. 2.3.3 (HUBISZ et al., 2009). Os indivíduos são probabilisticamente agrupados

de acordo com seus genótipos em k populações. Além da estruturação, o modelo é capaz de identificar a proporção de genótipos proveniente de outros grupos. O conjunto de parâmetros assumiu o modelo 'admixture' com frequências de alelos correlacionadas, e as simulações foram executadas em *burn-in* de 100.000 repetições, com valores de k variando de 1 a 10 agrupamentos. O número de agrupamentos (ΔK) foi determinado de acordo com STRUCTURE HARVESTER Evano (EARL E VONHOLDT, 2012).

2.6.6 Descontinuidades genéticas

Para identificar a descontinuidade dos dados genéticos (R_{ST}) no espaço geográfico foi utilizado o programa BARRIER (MANNI; GUERARD; HEYER, 2004). Nesse programa, as populações amostradas são conectadas pelo método de triangulação de Delaunay de acordo com suas coordenadas geográficas. As barreiras são identificadas a partir do algoritmo de Monmonier (MANNI; GUERARD; HEYER, 2004).

3 RESULTADOS

3.1 Genotipagem e detecção de alelos nulo

Neste estudo foram incluídos apenas indivíduos que apresentaram mesmo padrão de ampliações em todos os locos para eliminar resultados tendenciosos causados pela presença de alelos nulos. Inicialmente foram testados oito iniciadores microssatélites, porém um iniciador *SaatT54* não foi utilizado para a análise final devido a presença de grande número de falhas de amplificação. Locos considerados adicionais (stutter) foram excluídos das

análises. A figura 10 ilustra os produtos de amplificação de amostras de DNA genômico de *S. terebinthifolius* com os iniciadores *SaaT1* e *SaaT16*.

O teste para a presença de alelos nulos não revelou presença significativa de alelos nulos para os locos StAA 9 e StAA 55 e o loco StAA 25 foi o que apresentou maior número de alelos nulos.

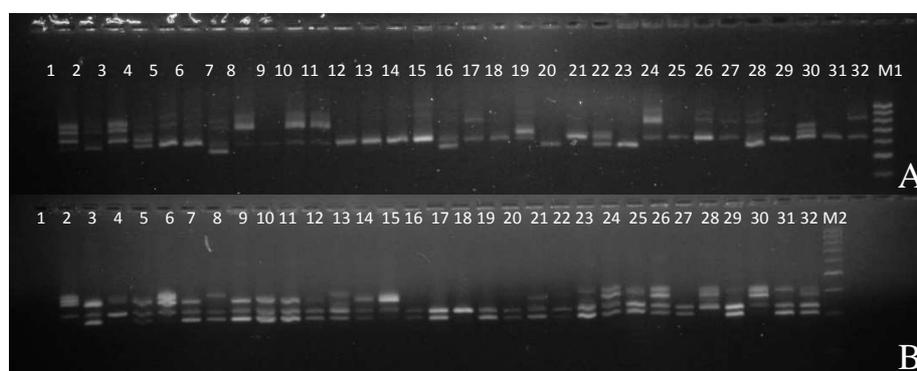


Figura 10 Produtos da amplificação de DNA de indivíduos de *Schinus terebinthifolius* Raddi em gel MetaPhor® a 3% de concentração a partir do marcador SSR *SaaT1* (A) e *SaaT16* (B). M1-Ladder 20 e M2 Ladder 50 pb

A frequência média estimada de alelos nulos foi alta para o loco *SaaT17* (32,42%) variando de 8,7% (CA) a 64,12% (PR) e baixa para o loco *Staa47* (10,94%), variando de 0,1% (LV, NE e CA) a 44,72% (PR). A presença significativa de alelos nulos foi observada no loco *Saat25* em quatro das oito populações avaliadas (SM, IF, NE e CA) e, nos locos *Saat17* e *Saat47* para a população CN.

A média geral de heterozigotos observada após as estimativas de alelos nulos (EAN) apresentou acréscimo significativo e variou entre 0,38 (IF) e 0,68 (PR, NE e CA) e a $He_{(Corr)}$ variou de 0,19 (CA) a 0,42 (LV) (Tabela 2).

Os valores do coeficiente de endogamia (f) foram positivos e significativos para a população de LV (0,538), CN (0,362), IF (0,154) e SM (0,102). Após a correção das estimativas de alelos nulos (EAN) todas as

populações apresentaram excesso de heterozigotos. A diferenciação genética total entre as populações (F_{ST}) realizada com o auxílio do programa GenAlEx foi de 0,22 e esta não foi afetada pela correção ENA ($F_{ST} = 0,22$). Entretanto, a estatística F_{ST} , desenvolvida por Wright (1931) é baseada no modelo de alelos infinitos (IAM), que supõe que cada mutação cria um novo alelo. Considerando a dinâmica de produção de novos alelos, Slatkin (1995) propôs um modelo estatístico análogo ao modelo de Wright, o Rst, em que a cada mutação ocorre o ganho ou a perda de uma repetição, baseada no modelo por passos de mutação (SMM) (bottleneck). Diante desse fato todas as análises genéticas foram realizadas pela estatística R (R_{ST}) por apresentar resultados mais robustos.

3.2 Caracterização da diversidade genética

Para os sete locos analisados nas populações de pimenta-rosa não foi observada redução do número de alelos por locos (K) em relação ao número de alelos efetivos (A_e) (Tabela 2). O número médio de alelos (K) e número de alelos efetivos (A_e) apresentaram em média 3,14 por loco. A diversidade genética (H_E) média encontrada foi de 0,40. O loco Saat55 foi o que apresentou maior valor de diversidade genética ($H_E=0,57$) e o menor valor foi de 0,1 no loco Saat1. Os maiores valores de diversidade máxima foram observados no loco Saat25, indicando que a diversidade genética representou 81,81% da diversidade máxima possível para este loco na mesma frequência ($1/3=0,33$). A diversidade genética reduzida para o loco Staa1 foi devida à elevada ocorrência do alelo 2 em todas as populações (Tabela 2).

Tabela 2 Parâmetros genéticos dos locos microssatélites dos indivíduos de *Schinus terebinthifolius* localizados nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Sergipe. N= número de indivíduos amostrados, K = número de alelos, Ae= número efetivo de alelos por loco, H_E= diversidade genética, h_{max}= diversidade máxima, H_E/h_{max} = proporções de diversidade máxima (%)

Loco	N	K	Ae	H _E	h _{max}	H _E /h _{max}
Saat1	212	3	3	0,10	0,66	15,15%
Saat9	200	3	3	0,41	0,66	62,12%
Saat16	150	3	3	0,53	0,66	80,30%
Saat17	183	3	3	0,42	0,66	63,63%
Saat25	213	3	3	0,54	0,66	81,81%
Saat47	214	3	3	0,27	0,66	40,90%
Saat54	211	4	4	0,57	0,75	76,00%
Média	197,5	3,14	3,14	0,40	0,67	59,98%

As frequências alélicas apresentaram uma pequena variação entre as populações, especialmente entre as populações BA, SM, CN, IF e as demais. Nessas populações foi detectada a presença de alelos exclusivos e raros (Tabela 3). Os locos Saat9 e Saat47 nos indivíduos da população CN apresentaram-se exclusivos e em baixa frequência (0,04).

Tabela 3 Frequências dos alelos nos sete locos microssatélites nucleares de *Schinus terebinthifolius* localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis). N- número total de indivíduos amostrados. n – número de indivíduos heterozigotos (...continua...)

Loco	Amostra/ Alelo	Populações							
		BA	CN	SM	LV	PR	IF	NE	CA
	N	62	54	64	28	60	94	60	24
SAAT1	(n)	60	54	64	26	48	88	60	24
	1	-	-	0,12	-	-	-	-	-
	2	1,00	0,85	0,78	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	3	-	0,15	0,09	-	-	-	-	-
SAAT9	(n)	40	50	58	28	58	84	58	24
	1	-	0,04	-	-	-	-	-	-
	2	0,72	0,72	0,71	0,78	0,81	0,68	0,69	0,62

	3	0,27	0,24	0,29	0,21	0,19	0,32	0,31	0,37
SAAT16	(n)	54	52	64	22	28	94	58	22
	1	-	-	-	-	-	1,00	-	-
	2	-	0,11	-	0,36	-	-	-	-
	3	1,00	0,25	0,41	0,36	0,82	-	0,5	0,45
	4	-	0,63	0,59	0,27	0,18	-	0,5	0,54
SAAT17	(n)	44	52	62	22	38	64	60	24
	1	0,23	0,44	0,53	1,00	1,00	0,80	0,93	1,00
	2	0,75	0,56	0,47	-	-	0,20	0,07	-
	3	0,02	-	-	-	-	-	-	-
SAAT25	(n)	62	54	58	24	54	94	60	
	1	0,06	0,13	0,33	0,58	0,81	0,5	0,33	0,6
	2	-	-	-	-	-	0,27	-	-
	3	0,93	0,87	0,67	0,41	0,18	0,23	0,66	0,4
SAAT47	(n)	62	54	64	28	60	94	44	22
	1	0,57	0,15	0,17	0,18	0,02	-	-	0,5
	2	-	0,038	-	-	-	-	-	-
	3	0,48	0,81	0,83	0,82	0,98	1,00	1,00	0,5
SAAT55	(n)	62	54	60	20	58	86	60	22
	1	-	-	-	-	0,02	0,01	-	-
	2	-	-	-	0,95	0,64	0,84	0,72	0,59
	3	1,00	0,74	0,75	0,05	0,34	0,15	0,28	0,41
Total		12	16	14	13	13	13	12	12
Exclusivos		1	2	1	0	0	2	0	0

3.2.1 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As probabilidades do teste exato de Fisher mostraram que os sete locos microssatélites nucleares utilizados neste estudo apresentaram desvios significativos das proporções esperadas pelo modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$), evidenciando a possível presença de deficiência de heterozigotos em todas as populações (YÜCEDAĞ; GAILING, 2012). O loco Saat 25 apresentou desvios significativos de EHW em quase todas as populações, exceto BA e PR (Tabela 4).

Tabela 4 Probabilidade exatas (Teste Exato de Fisher) dos desvios das proporções de Hardy-Weinberg em locos microssatélites nucleares nas populações de *Schinus terebinthifolius* localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis)

	Saat1	Saat9	Saat16	Saat17	Saat25	Saat47	Saat55
BA	1,000	0,600	1,000	0,265	1,000	0,00**	1,000
CN	0,073	0,011*	0,026*	0,000**	0,037*	0,00**	0,643
SM	0,002**	0,190	0,001**	0,134	0,022*	0,557	1,000
LV	1,000	0,480	0,002**	1,000	0,001**	1,000	1,000
PR	1,000	0,560	1,000	1,000	0,557	1,000	0,006**
IF	1,000	0,003*	1,000	0,000**	0,000**	1,000	0,640
NE	1,000	0,0312*	0,000**	1,000	0,000**	1,000	0,063
CA	1,000	0,0965	0,0193*	1,000	0,001**	0,003*	0,067

Significância *P<0,05. **P<0,01

Cinco dos setes locos avaliados apresentaram desequilíbrio de ligação, sendo que apenas os locos Saat1 e Saat47 não estão em desequilíbrio de ligação. Nas populações CN, SM, IF e NE foram detectados desequilíbrio de ligação em dois locos associados (Tabela 5), sugerindo a presença de populações subestruturadas (WILLIANS et al., 2005), ou seja, parcialmente isoladas.

Tabela 5 Associações de desequilíbrio de ligações em locos microssatélites nucleares nas populações de *Schinus terebinthifolius* localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: NE (Neópolis) e IF (Ilha das Flores)

CN	SM	IF	NE
0,016 (Saat16/Saat47)	0,025 (Saat17/ Saat55)	0,000 (Saat9/ Saat17)	0,013 (Saat9/ Saat17)
0,040 (Saat17/ Saat25)	0,023 (Saat25/ Saat55)	0,031 (Saat25/ Saat55)	0,001 (Saat9/ Saat55)

Significativo $p < 0,05$.

3.3 Distância genética e divergência entre populações

O número de alelos por loco (K) variou de 1,18 (Saat1) a 2,3 (Saat55) com número médio de 1,8 alelos por loco. As populações BA, NE e CA foram as que apresentaram os menores números de alelos por loco (K) (1,71) e a população CN apresentou maior riqueza alélica 2,42 (Tabela 2). O maior valor de diversidade genética ($H_E = 0,415$) foi observado na população SM e o maior valor da heterozigosidade observada foi encontrada na população CA ($H_o = 0,496$). Entretanto, para o conjunto das populações, os valores de H_o e H_E foram muito próximos evidenciando a ausência nos desvios de panmixia, indicado pelo baixo valor do coeficiente de endogamia ($f = 0,03$) (Tabela 6).

Tabela 6 Estimativa de número de indivíduos (N), número de alelos por loco (K), heterozigosidade observada (H_o), diversidade genética (H_E), máxima diversidade (h_{max}) e índice de fixação (f) para as populações de *Schinus terebinthifolius* localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis)

Pop	N	K	H_o	H_E	h_{max}	H_E/h_{max}	f
BA	27,43	1,71	0,25	0,20	0,41	49,13%	-0,22
CN	26,43	2,42	0,25	0,38	0,59	64,76%	0,35
SM	30,71	2,14	0,37	0,41	0,53	77,90%	0,10
LV	12,14	1,85	0,13	0,28	0,46	60,72%	0,53
PR	24,57	1,86	0,26	0,20	0,99	20,51%	-0,30
NE	28,57	1,71	0,33	0,28	0,41	66,47%	-0,20
IF	42,5	2,0	0,24	0,28	0,50	56,56%	0,15
CA	11,28	1,71	0,49	0,36	0,41	87,52%	-0,39
Total	25,45	1,93	0,29	0,30	0,99	30,07%	0,03

A população CA apresentou maior percentual de diversidade máxima (87,52%), seguida pela população SM (77,9%). A população PR apresentou menor percentual de diversidade máxima (20,52%), indicando que esta população possui o maior número de alelos com baixa frequência. A média geral

encontrada para a distribuição das frequências alélicas nas populações de pimenta-rosa foi baixa (Tabela 7).

O índice de fixação para a média das populações para os locos (f) estatisticamente não difere de zero (Tabela 7). Os maiores índices de fixação para o conjunto de populações (F_{ST}) foram obtidos pelos locos *SaaT17* e *SaaT25*. Entretanto, o valor médio entre locos para este parâmetro ($F = 0,291$) não difere estatisticamente de zero, sugerindo ausência de endogamia.

A diferenciação genética utilizando o G_{ST} de Hedrick (2005) apresentou um maior valor de diferenciação genética entre as populações (0,41) quando comparada com o valor encontrado utilizando-se as análises segundo Weir e Cockerham ($\theta_p=0,28$). A estatística de Hedrick considera as frequências alélicas e os diferentes tipos de alelos existentes na população, além de ser mais apropriado quando o número de locos utilizados é menor que 20.

Tabela 7 Estimativa do índice de fixação para o loco (f); índice de fixação total para o conjunto das populações (F); divergência genética entre as populações (θ_p) e divergência genética entre as populações ($G_{ST(Hedrick)}$) para as populações de *Schinus terebinthifolius* localizadas nos estados de Minas Gerais, Espírito Santos e Sergipe

Locos	f	F	θ_p	$G_{ST(Hedrick)}$
SaaT1	0,474	0,535	0,116	0,1394
SaaT9	-0,1847	-0,186	-0,001	0,0279
SaaT16	-0,3888	-0,011	0,272	0,7284
SaaT17	0,524	0,691	0,3509	0,5448
SaaT25	0,4913	0,635	0,2823	0,4398
SaaT47	-0,2659	0,088	0,279	0,3291
SaaT55	-0,276	0,336	0,479	0,6743
Média	0,008	0,291	0,286	0,412
(IC) ¹	(-0,268 a 0,327)	(0,036 a 0,536)	(0,160 a 0,388)	

¹ Intervalo de confiança a 95% obtido por 10.000 reamostragens *bootstrap* sobre os locos

A análise da variância molecular (AMOVA, Tabela 8) indicou que 65% da variabilidade genética encontram-se dentro das populações e 35% entre as populações; não foi detectada estrutura genética entre regiões amostradas (entende-se por região o conjunto de população de cada Estado).

Tabela 8 AMOVA realizada para as populações de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis)

Fontes	GL	SQ	QM	%	P
Entre Regiões	2	783282,461	391641,231	0%	0,001
Entre Populações	5	1667487,789	333497,558	35%	0,001
Dentro de Populações	438	5054175,687	11539,214	65%	0,001

A diferenciação genética total entre as populações (R_{ST}) de 0,349 é considerada alta para populações naturais de espécies arbóreas. A menor diferenciação foi observada entre as populações de CN /LV (0,004) e a maior foi entre IF e NE (0,613) (Tabela 9).

Tabela 9 Matriz de diferenciação genética de *Schinus terebinthifolius* Raddi após correção de alelos nulos (abaixo da diagonal) e distâncias espaciais (Km) entre pares de populações (acima da diagonal) localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis); ns (não significativo)

	BA	CN	SM	LV	PR	IF	NE	CA
BA	-	285	495	128	1.430	1.430	1.434	1.381
CN	0,161	-	703	171	1.513	1.522	1.521	1.466
SM	0,201	0,243 ^{ns}	-	607	1.001	992	1.000	951
LV	0,141	0,004	0,155	-	1.503	1.509	1.507	1.455
PR	0,204	0,306	0,273	0,136	-	61	23	10
IF	0,450	0,597	0,562	0,412	0,182	-	23	61
NE	0,223	0,067	0,049	0,243	0,333	0,613	-	55
CA	0,190	0,080	0,017*	0,081	0,226	0,533	0,046	-

O dendrograma gerado pelo método de UPGMA, com base na diferenciação genética entre as populações (*Rst*), evidenciou o maior distanciamento da população de IF com as demais (Figura 11) e a formação de dois agrupamentos. O primeiro formado pelas populações BA, CN, SM, NE e CA, porém como maior similaridade entre as populações de CN e SM e o segundo formado pelas populações de LV e PR.

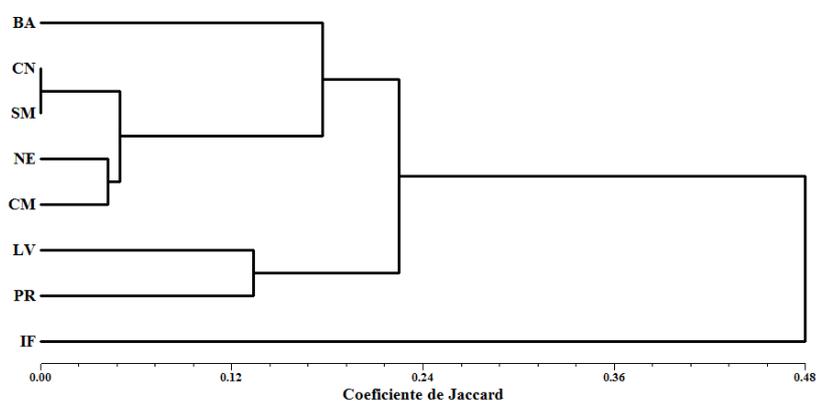


Figura 11 Dendrograma do agrupamento entre pares das populações de *Schinus terebinthifolius*, localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis), de acordo com a distância genética de Nei (1978)

Ressaltando que a população LV, localizada na região Sudeste do país, apresentou similaridade genética com as populações de Sergipe, localizadas no Nordeste, sendo estas distanciadas em 1.500 Km. Contudo, não houve correlação significativa entre a distância geográfica e a diferenciação genética, obtida pelo teste de Mantel ($r = -0,079$; $p = 0,38$).

A análise das duas primeiras coordenadas principais explicou 62,15% e 15,80% da diferenciação genética entre as populações de *S. terebinthifolius*. Os dados apontam uma tendência de isolamento entre as populações, entretanto foi

possível observar um discreto agrupamento entre as populações SM, NE e CA (Figura 12), evidenciando maior proximidade genética entre elas.

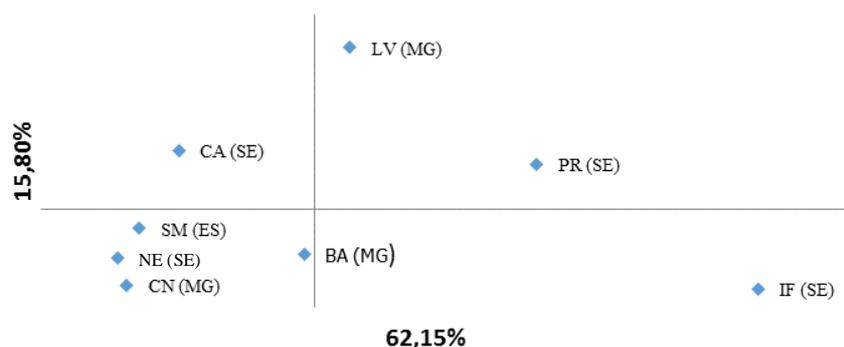


Figura 12 Análise das Coordenadas Principais das populações de *Schinus terebinthifolius* localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis)

A análise da presença de migrantes pelo programa GeneClass2 (PIRY et al., 2004) revelou a presença de 17 indivíduos migrantes pelo teste de máxima verossimilhança entre as populações (Tabela 10), utilizando informações dos sete locos microssatélites. O maior número de migrantes ocorreu de NE, com 8 migrantes, para PR. A migração ocorreu em maiores proporções de forma unilateral, houve troca de alelos apenas entre de NE e LV, ressaltando que as referidas populações apresentam distância espacial de 1.500 Km.

Tabela 10 Identificação de migrantes pela análise de máxima verossimilhança a partir de sete locos microssatélites de *Schinus terebinthifolius* em populações localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis) (...continua...)

Migrantes	Pop. de origem	Pop. de destino	Valor de P*
CN1**	CN	PR	0,0008

CN11	CN	BA	0,0008
CN12	CN	BA	0,0079
CN24	CN	PR	0,0092
SM2	SM	BA	0,0453
SM26	SM	BA	0,0265
LV11	LV	NE	0,0041
NE3	NE	PR	0,0233
NE5	NE	PR	0,0237
NE6	NE	PR	0,0256
NE10	NE	PR	0,0239
NE11	NE	PR	0,0251
NE12	NE	PR	0,0238
NE15	NE	PR	0,0227
NE19	NE	LV	0,0139
NE24	NE	PR	0,0369
NE25	NE	LV	0,0145

* Significativo $P < 0,05$; ** a numeração se refere à identificação do indivíduo de cada população; Pop (População)

3.3.1 Aderência ao Equilíbrio de Mutações e Deriva

O teste de Wilcoxon indicou que as populações de pimenta-rosa LV, IF e CA passaram por uma redução recente no tamanho da população para TPM (Modelo duas fases de mutação), IAM modelos (Modelo de alelo infinito) e SMM modelo (Modelo simples de mutação) (Tabela 11).

TABELA 11 Análises de *bottleneck* (gargalo genético) realizada em populações de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis) (...continua...)

		Pop	BA	CN	SM	LV	PR	IF	NE	CA
TESTE DE WILCOXON	IAM	P	0,09	0,22	0,89	0,05*	0,11	0,03*	0,06	0,01*
	SMM	P	0,15	0,42	1,0	0,04*	0,31	0,03*	0,09	0,01*
	TPM	P	0,09	0,22	0,95	0,04*	0,31	0,03*	0,06	0,01*

P: Probabilidade <0,05, significativo excesso de heterozigosidade detectado pelo teste de Wilcoxon, teste de classificação sob os modelo IAM (Modelo de alelo infinito), SMM (Modelo simples de mutação) e TPM (Modelo de duas fases de mutação)

3.4 Estrutura genética

O número de agrupamento gerados pela análise Bayesiana com todas as populações inferiu que a melhor subdivisão obtida usando o StructureTM corresponde a sete conjuntos ($\Delta K = 7$), com algumas misturas observadas em todas as populações (Figura 13).

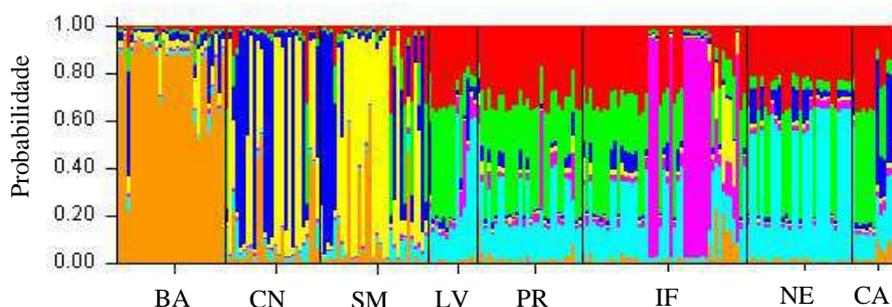


Figura 13 Estrutura genética de populações de *Schinus terebinthifolius* localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis), obtida por análise Bayesiana. O eixo y indica o percentual de participação em cada um dos grupos K estimados

Apenas a população BA (localizada em Minas Gerais) apresenta probabilidade > 50% de pertencer ao agrupamento 1 (82% - K=1). As populações CN (MG) e SM (ES) pertencem ao agrupamento 3 (37 e 23% respectivamente) e ao agrupamento 4 (37,8 e 45% respectivamente). Todas as populações de Sergipe (PR, IF, NE e CA) e uma população de Minas Gerais (LV) tiveram probabilidades entre 18 a 30% de pertencerem aos agrupamentos

1, 2 e 6. A população IF foi a única que apresentou probabilidade significativa de pertencer ao agrupamento 7 (Figura 14).

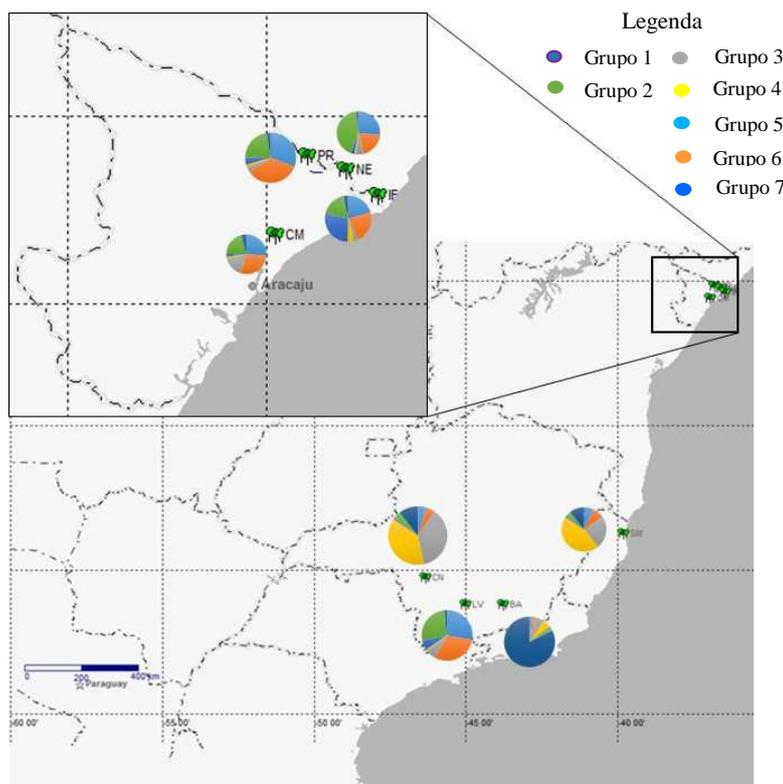


Figura 14 Estrutura genética de populações de *Schinus terebinthifolius* localizadas nos estados de Minas Gerais: CN (Canastra), LV (Lavras) e BA (Barbacena); Espírito Santos: SM (São Mateus); e Sergipe: PR (Propriá), NE (Neópolis), IF (Ilha das Flores) e CA (Carmópolis), inferida por análise Bayesiana. As cores nos *circulos* indicam o percentual de participação dos grupos

3.5 Descontinuidades genéticas

Com auxílio do programa BARRIER (MANNI; GUERARD; HEYER, 2004), cinco prováveis barreiras ao rompimento do fluxo gênico foram detectadas. Na Figura 15 pode-se observar que a primeira barreira (a) ao fluxo gênico isola duas populações de Sergipe (PR e NE) em relação às demais e a

segunda barreira (b) ao fluxo gênico isola a população CN, localizada no estado de Minas Gerais. Esses resultados corroboram com os obtidos anteriormente pelo UPGMA (Figura 11) e Structure (Figura 13), onde evidencia uma maior proximidade entre as populações de PR e LV, além de justificar o maior distanciamento entre as populações de Sergipe pela análise PCoA (Figura 12).

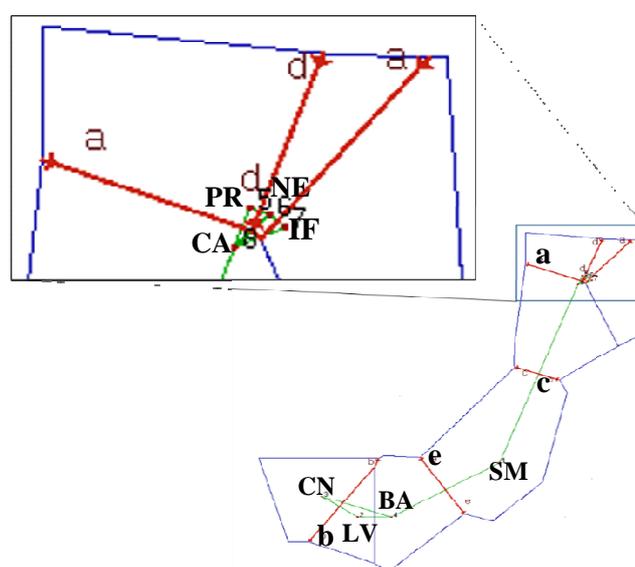


Figura 15 Mapa gerado pelo programa Barrier, onde as descontinuidades genéticas de *S. terebinthifolius* são representadas pelas linhas segundo ordem alfabética (a - e). As populações estão identificadas de acordo com as numerações e siglas: 1-SM (São Mateus); 2-LV (Lavras); 3- CN (Canastra); 4-BA (Barbacena); 5- (PR) Propriá; 6-NE (Neópolis); 7-IF (Ilha das Flores); 8- CA (Carmópolis)

4 DISCUSSÃO

As populações de pimenta-rosa, principalmente as localizadas no Baixo São Francisco (SE) e São Mateus (ES) apresentam fortes tendências ao declínio genético, pois estão inseridas em áreas com elevada fragmentação e exploração de seus frutos por meio do extrativismo sem manejo adequado. Esse declínio

genético poderá levar à extinção local de algumas populações, considerando ainda a ausência ou baixa regeneração natural nas áreas estudadas, caso não seja tomada medidas de conservação e aumento da variabilidade genética nessas populações.

4.1 Genotipagem e detecção de alelos nulos

Foi detectada a presença de alelos nulos nas populações SM, IF, NE e CA e após correção (EAN) estes não influenciaram os resultados obtidos. Essas correções são extremamente importantes, pois em locos microssatélites a ocorrência de alelos nulos pode causar desvios no EHW, levando a conclusões viesadas com relação à diversidade genética das populações (MARTINS, 2008). Essa redução da diversidade genética é devida a maior quantidade de genótipos homocigotos nas populações (ALDRICH et al., 1998; WHITE et al., 1999; CHAPUIS; ESTOUP, 2006).

4.2 Caracterização da diversidade genética

O número de alelos por loco (K) variou de 1,71 a 2,42 (Tabela 6), sendo considerado baixo quando comparado aos valores encontrados por Willians et al. (2005) em populações de pimenta-rosa localizadas no Sul do Brasil e Argentina (5 a 25 alelos por locos). Esse maior número de alelos encontrado pelos autores supracitados indica que as populações apresentam alta diversidade (0,58) comparada com a diversidade genética aqui encontrada (0,30). Essa maior diversidade nas populações de *S. terebinthifolius* no Sul e Argentina pode ser devida à proximidade do centro de diversificação da espécie, na região do Chaco da Argentina (RAMÍREZ; CEVALLOS-FERRIZ, 2001).

A diversidade genética média (H_E) foi de 0,30, valor considerado baixo comparado aos valores descritos para a mesma espécie e para outras espécies arbóreas tropicais, utilizando marcadores microssatélites. Collevatti *et al* (2001), estudando *Caryocar brasiliense*, encontraram H_E de 0,856; Lemes *et al* (2003) encontraram H_E de 0,85 em populações de *Swietenia macrophylla*; Degen *et al* (2004) evidenciaram uma diversidade genética (H_E) de 0,87 em *Symphonia globulifera*; Dick *et al* (2003) estudando *Dinizia excelsa* detectaram H_E de 0,73, um valor alto de diversidade genética, mesmo com o baixo valor de riqueza alélica (2,87); o estudo de Raposo *et al* (2007) evidenciou H_E de 0,60 em *Carapa guianensis*. A comparação de diversidade genética com espécies de famílias diferentes mostra que no geral as populações de espécies arbóreas apresentaram maior diversidade genética que as populações de *S. terebinthifolius*, analisadas neste estudo. Fica evidente que os valores da diversidade genética podem ser diferentes, pois dependem de fatores intrínsecos à espécie, como sistema de cruzamento e tamanho efetivo populacional, e também de fatores extrínsecos, como número de indivíduos amostrados, fragmentação e isolamento das áreas amostradas, entre outros (KRAMER, 2008). Para relatar essas diferenças, o estudo realizado com a mesma espécie (*S. terebinthifolius*), provenientes da região Sul e Sudeste do Brasil (Irati, Curitiba, Balneário Camboriú e Palmital), mostrou um valor mais alto de diversidade genética ($H_E = 0,62$; Williams *et al.*, 2005) quando comparado ao encontrado neste trabalho (0,30), utilizando o mesmo conjunto de marcadores microssatélites. Entretanto, a heterozigosidade observada no estudo de Williams *et al.* (2005) foi de 0,39, com significativa deficiência de heterozigotos ($f = 0,37$), mesmo as populações apresentando uma elevada riqueza alélica (11,8 alelos). Apesar das populações de pimenta-rosa, aqui estudadas, não apresentarem alto índice de diversidade genética como descrita para outras espécies arbóreas tropicais, assim como para a pimenta-rosa, as populações não apresentaram

cruzamentos endogâmicos ($f=0,03$), evidenciando que as mesmas possuem potencial genético para a conservação *in situ* e *ex situ*.

A diversidade genética máxima (h_{\max}) representa o valor máximo teoricamente esperado da diversidade genética (H_E) de acordo com o número observado de alelos e, considerando o modo como esses parâmetros (H_E e h_{\max}) são calculados, constata-se que a ocorrência de muitos alelos com baixa frequência em uma população ocasiona um aumento proporcionalmente maior na estimativa de h_{\max} (RAPOSO et al., 2007). Esse fato foi constatado nas populações de pimenta-rosa, aqui estudadas, pois as populações de PR apresentaram cinco locos com alelos de baixa frequência, variando de 0,07 a 0,19, o que ocasionou a h_{\max} de 20,51%.

Na análise da diversidade genética realizada separadamente para cada população percebeu-se a redução da heterozigiosidade (H_E) e elevado coeficiente de endogamia (f) variando de -0,393 a 0,535 e, apenas as populações SM e IF apresentam coeficiente de endogamia mais baixos (0,1 e 0,15 respectivamente). Possivelmente as populações de pimenta-rosa estão passando por gargalos genéticos e, neste caso, as localizações das populações devem ser consideradas, pois algumas encontram-se em paisagens planálticas, como as populações CN, BA e LV, outras ocorrem em ambientes modificados (ES e SE) onde a exploração da vegetação é elevada (JESUS; GOMES, 2013) e com alta degradação como SM, PR, NE, CA e IF. Apesar da existência de algumas barreiras naturais como presença cursos d'água e elevações montanhosas, provavelmente a retirada da cobertura florestal para a agricultura, a pecuária e o surgimento das cidades favoreceu a um maior isolamento de algumas populações, levando ao cruzamento entre indivíduos aparentados, o que ocasiona deficiência ou excesso de heterozigotos nas populações subsequentes (LOWE et al., 2005). Resultados negativos da fragmentação sobre a diversidade genética das populações foram encontrados por Conson et al. (2013), onde os autores

concluíram que a fragmentação do bioma Mata Atlântica, derivado dos ciclos recorrentes de corte e queima, pode ser considerada o principal fator responsável pela redução da heteroziguidade em *Luehea divaricata* (Malvaceae).

Corroborando com esses resultados, os desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) nos sete locos analisados evidenciam uma deficiência de heterozigotos em todas as populações e a ocorrência de desequilíbrio de ligação nas populações da CN, SM, IF e NE. Essas informações indicam a presença de associações não-aleatórias entre o polimorfismo, uma vez que altos valores de f são responsáveis pela manutenção de tal desequilíbrio nas populações (FUTUYAMA, 2005) e, segundo Willians et al. (2005), a presença de desequilíbrio de ligação sugere que as populações se encontram isoladas. Os dados aqui obtidos dos desvios significativos no equilíbrio de mutação-deriva nos modelos analisados (IAM, TPM e SMM) evidenciam a presença de gargalo genético recente nas populações LV, IF e CA. Portanto, apesar de níveis altos de diversidade genética encontrados na atualidade, os dados apontam que estas populações se encontram em declínio genético. Provavelmente na próxima geração ocorrerá uma diminuição da diversidade genética, uma vez que os efeitos de cruzamentos endogâmicos são observados imediatamente após algum distúrbio e o declínio na diversidade genética ocorre lentamente ao longo de gerações sucessivas (AGUILAR, et al., 2008; KRAMER, et al., 2008). Da Silva et al. (2012), estudando *Luehea divaricata*, espécie com vida útil de 60 anos, inferiram que depois de 100 anos, se não forem tomadas medidas para a recuperação das populações estudadas, uma redução drástica na variabilidade genética será observada. No entanto, em se tratando de pimenta-rosa, espécie do grupo ecológico das pioneiras, com ciclos de vida entre 10-15 anos (MARCIEL et al., 2003), a redução da diversidade genética já está ocorrendo e, provavelmente em pouco mais de 10 anos respostas negativas mais acentuadas desses distúrbios ecológicos poderão ser confirmadas.

4.3 Distância genética e divergência entre populações

A análise do dendrograma (Figura 11) percebe-se que as populações CN, SM, NE e CA estão mais agrupadas em relação as demais. Estes resultados foram confirmados pela análise das coordenadas principais (CPoA) (Figura 12), onde as populações SM, CN e NE tendem a formar um discreto agrupamento entre elas. Além disso, ficou evidente o maior distanciamento da população de IF em relação as demais. Esses resultados apoiam os resultados encontrados pelo teste de Mantel, onde as correlações entre distâncias genéticas e geográficas foram negativas e não significativas. Resultados semelhantes aos obtidos para pimenta-rosa foram encontrados por Yücedağ e Gailing (2012) em um estudo com *Juniperus excelsa* M. Bieb, na Turquia, onde não foi encontrada correlação significativa entre as distâncias genética e geográfica e as populações mais próximas geneticamente encontram-se separadas por cadeias de montanhas. Os autores associaram estas diferenças genéticas em uma pequena distância geográfica ao fluxo gênico restrito e ou a diferentes históricos de colonização dessas populações durante as migrações glacial e pós-glacial.

A análise da variância molecular (AMOVA, Tabela 3) mostrou que não houve estrutura genética entre as regiões (MG, ES e SE), sendo que a diversidade entre as populações foi alta (35%). Esse alto valor de diversidade genética encontra-se acima do relatado para populações fragmentadas (0,15) (NYBOM, 2004). Para as espécies arbóreas, os níveis de diferenciação genética são descritos em torno de 0,22 a 0,36, devido à polinização que é realizada por pequenos insetos e a sua dispersão efetuada, principalmente pelas aves, apresentado um padrão de isolamento por distância (NYBOM, 2004). Entretanto, as populações de pimenta-rosa apresentaram um padrão diferenciado, pois, de acordo com o teste de Mantel não houve uma correlação significativa entre valores de diferenciação genética e as distâncias geográficas,

sugerindo que as populações de pimenta-rosa não estão estruturadas em um padrão de isolamento por distância. A análise da variância molecular (AMOVA) mostrou que não houve estrutura genética entre as regiões. Assim, os níveis de diferenciação genética entre essas populações provêm de outros fatores que não seja o distanciamento espacial, uma vez que correlações negativas indicam a ausência de fluxo gênico, e pela análise histórica de migrantes foi evidenciada imigração a longa distância (1.500 Km) entre as populações LV (MG) e NE (SE). Portanto, diante desses fatores, pode-se sugerir que houve o rompimento do fluxo gênico devido às barreiras geográficas contemporâneas evidenciando o isolamento das populações.

A divergência genética entre as populações diferiu estatisticamente de zero ($\theta_p = 0,286$; com intervalo de confiança de 0,160 a 0,388), indicando que 28,6% da diversidade genética encontra-se entre as populações. Utilizando-se outra estimativa de divergência genética, os valores foram mais elevados $R_{ST} = 0,35$ ($P > 0,05$), indicando que 35% da diversidade genética encontra-se entre as populações. Entretanto, utilizando a estimativa $G_{ST(Hedrick)}$, o valor obtido também foi elevado ($G_{ST(Hedrick)} = 0,42$) e, considerando a estimativa de $G_{ST(Hedrick)}$ observou-se que 58% da divergência genética encontra-se dentro das populações.

A diferenciação genética entre as populações obtidas pelo método de Hedrick (2005) foi alta e superior à estimativa obtida pelo método de Weir e Cockerham (1984), confirmando as diferenças genéticas entre as populações. A superioridade na estimativa obtida para diferenciação entre as populações pelo método de Hedrick (2005) se deve às peculiaridades do método, que considera as frequências dos alelos e o tipo de alelo (raros) presente nas populações. Já o método de Weir e Cockerham (1984) e a estatística F_{ST} de Wright (1978) são dependentes dos níveis de heterozigosidade presentes dentro das populações e independentes do tipo de alelo. Sendo assim, o uso da estatística F_{ST} e o cálculo

θ_p , que são dependentes da variação genética dentro das populações, tendem a subestimar a real diferenciação genética entre as populações (HEDRICK, 2005).

A alta diferenciação genética entre as populações de pimenta-rosa pode ser explicada pela presença de alelos exclusivos encontrados nas populações BA, CN, SM e IF. Na análise de divergência genética entre duas populações de *Carapa guianensis* Aubl. (RAPOSO et al., 2007), foi evidenciado um valor moderado de diversidade genética entre as populações, onde os autores justificaram esse valor de diversidade ($R_{ST} = 0,093$) como consequência da presença de alelos exclusivos com frequências relativamente altas em ambas populações. Seoane et al. (2000) citam ainda que a presença de alelos exclusivos em algumas populações é indicativo de fluxo gênico restrito, o que pode levar ao aumento da divergência entre as populações.

Moura et al. (2011) encontraram significativa divergência genética em populações de *Solanum lycocarpum* com cinco marcadores microssatélites nucleares ($Gst = 0,147$) e obtiveram a estimativa do fluxo gênico histórico 0,36 (Baixo; $Nm < 1$). Esse valor foi próximo ao encontrado neste estudo com as mesmas estimativas, onde o número de migrantes por geração foi de 0,49. Portanto, devido aos resultados significativos das estimativas de divergência genética entre as populações pode ser sugerido a ocorrência de deriva genética em cada população, pela ausência de fluxo gênico, e devido aos processos estocásticos ocasionou modificação aleatória das frequências alélicas ao longo do tempo.

4.4 Estrutura genética

Os resultados da análise Bayesiana sugerem uma subdivisão em sete agrupamentos (Figura 13), indicando que estes agrupamentos representam a estrutura genética do conjunto das populações estudadas de forma mais

consistente. Foi possível identificar que a população de pimenta-rosa BA (1) é a que mais se distanciou das demais, reforçando os resultados obtidos por meio do R_{ST} (Tabela 4). Os dados obtidos indicaram que a população de pimenta-rosa LV (4) apresentou maior similaridade genética com as populações de Sergipe. Portanto, os resultados obtidos indicam que a população LV partilha o mesmo conjunto genético (agrupamentos 1, 2 e 6) em probabilidades semelhantes, com variação de 18 a 30%, apresentadas pelas populações de Sergipe (PR, IF, NE e CA). Estes resultados corroboram a presença de migrantes entre LV e NE (Tabela 5), sugerindo que no passado a vegetação da área de estudo apresentavam conexões entre essas populações (FERNANDES, 2007). Essa evidência possivelmente esclarece a baixa diversidade genética das populações LV e NE, devido a um caráter ancestral conservado dessas populações. Douaihy et al. (2012), trabalhando com *Juniperus excelsa* M.Bieb, uma espécie importante da floresta montanhosa da parte oriental do Mediterrâneo e das regiões submediterrânicas, evidenciaram semelhança entre as populações da Turquia, Criméia e Grécia, onde a semelhança das duas populações da Criméia no grupo das populações da Turquia pode ser resultado de uma origem comum, o que parece ser muito possível quando a história da biota em torno do Mar Negro durante a glaciação é considerada. O nível do Mar Negro foi muito menor durante o período glacial do que é no presente tornando as migrações de plantas ao longo da costa da Anatólia para a Crimeia, e vice-versa, muito mais possível (DOUAIHY et al., 2012). Entretanto, para o presente estudo, essa hipótese somente poderá ser confirmada com estudos posteriores utilizando marcadores de cpDNA (DNA citoplasmático) devido principalmente ao caráter conservativo dos mesmos.

4.5 Descontinuidades Genéticas

Os resultados obtidos pelo programa Barrier, utilizando as diversidades Bayesianas e as coordenadas geográficas evidenciaram a ocorrência de barreiras geográficas entre as populações de pimenta-rosa estudadas. A primeira barreira (a) ao fluxo gênico evidenciando o distanciamento genético entre as populações foi descrita no curso do Rio São Francisco (Figura 15), separando as duas populações de Sergipe (PR e NE) das demais. O maior distanciamento da população de PR pode ter sido influenciado por efeito fundador, uma vez que os indivíduos dessas populações estão presentes em ilhas localizadas entre os estados de Sergipe e Alagoas. A segunda barreira (b) ao fluxo isola a população CN das demais e de acordo com a geografia da região, esta barreira pode ser devido ao relevo mineiro caracterizado por terrenos montanhosos cuja altitude varia de 100 a 1.500 metros. A barreira (c) apresenta uma descontinuidade entre as populações de Sergipe e SM, ocorrendo na faixa litorânea, onde, além das interrupções e modificações naturais da Mata Atlântica, nas áreas encontra-se a cidade de Ilhéus/BA e Itabuna/BA e mais no interior encontra-se a Chapada Diamantina que provavelmente interrompe o fluxo gênico entre essas populações.

A interrupção do fluxo gênico entre as populações é um fator já evidenciado diante do alto nível de degradação da Mata Atlântica, onde foi necessário intensificar os esforços de conservação implementando o corredor de biodiversidade no *hotspot* Mata Atlântica: o Corredor Central (Figura 16), com o objetivo de assegurar a conectividade da paisagem e de seus habitantes favorecendo o fluxo gênico.

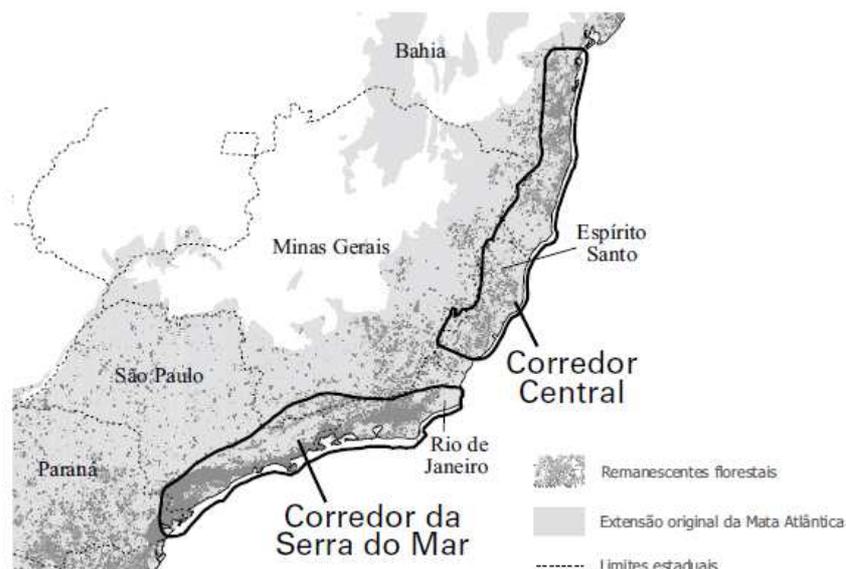


Figura 16 Duas regiões da Mata Atlântica foram reconhecidas como corredores de biodiversidade

Fonte: Galindo-Leal; Câmara, (2005)

A quarta barreira (d) apresenta isolamento entre as populações PR e NE, justificando o fato comentado anteriormente, que as populações de PR apresentam-se distribuídas em ilhas e o Rio São Francisco é uma barreira natural ao fluxo gênico.

5 CONCLUSÃO

As populações de Minas Gerais, Espírito Santo e Sergipe apresentam basicamente o mesmo conjunto genético. Dessa forma pode-se inferir que as populações presentes em regiões com alto nível de degradação como as populações de Sergipe ainda mantem significativo índice de diversidade genética, entretanto evidenciam a presença de gargalo genético recente nas populações LV, IF e CA. Assim, cuidados especiais nessas populações são

necessários, pois a redução no tamanho populacional em função da fragmentação ou práticas predatórias e exploração pode reduzir a variabilidade genética e, conseqüentemente, aumentar a endogamia.

As populações SM, CN e CA são áreas prioritárias para conservação devido sua maior diversidade, presença de alelos exclusivos e descontinuidades genéticas devido ao rompimento do fluxo gênico.

A população de IF (Ilha das Flores) conserva um agrupamento genético que o distancia das demais populações sergipanas. Assim, sugere que a população de IF é uma população chave para auxiliar nos projetos de conservação, restauração de áreas degradadas e implementação de plano de manejo para pimenta-rosa no estado de Sergipe. Além da conservação *in situ*, esta população também deve ser conservada *ex situ*, devido à ocorrência de alguns alelos exclusivos e a sua localização numa paisagem muito antropizada corroboram para perdas significativas da sua diversidade intraespecífica.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH L.; DIEGO, Y. H.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches **Molecular Ecology**.v.17, 5177–5188, 2008.

BATALHA FILHO, H.; MIYAKI C. Y. Phylogeography of the Atlantic Forest. **Revista da Biologia**. Vol. Esp. Biogeografia: 31-34, 2011.

CHAPUIS, M.-P.; ESTOUP, A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621-631, March 1, 2007. Disponível em: <
<http://mbe.oxfordjournals.org/content/24/3/621.abstract> >.

COLLEVATTI, R. G; GRATTAPAGLIA, D; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, Sheffield, v. 86, n. 1, p.60-67, 2001.

COMES, H. P.; KADEREIT, J. W. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. **Trends in Plant Science**, v.3, p. 432–438, 1998.

CONSON, A. O. et al. Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). **Genetica**, v. 141, n. 4-6, p. 205-215, 2013.

CORNUET J.M.; LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1997.

DA SILVA, D. C. G.; DE CARVALHO, M. C.; MEDRI, C.; MEDRI, M. E.; RUAS, C. F.; RUAS, E. A.; RUAS, P. M. Genetic structure and diversity of Brazilian tree species from fragments and riparian woods. In: Çaliskan M,

editor. **Genetic Diversity in Plants**, 1st edition. Tech Open Sci; Croacia: p. 319–412, 2012.

DEGEN, B., BANDO, E., CARON, H. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. **Heredity**, v. 93, p. 585–591, 2004.

DEGEN, B. 2006. GDA_NT. **Genetic data analysis and numerical tests**. Grosshansdorf, Institute for Forest Genetics. 2006

DICK, C.W.; ETCHELECU, G.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of Neotropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 12, n. 753–764, 2003.

DOUAIHY, B.; SOBIERAJSKA, K.; JASINSKA, A. K.; BORATYNSKA, K.; OK, T.; ROMO, A.; MACHON, N.; DIDUKH, Y.; BOU DAGHER-KHARRAT, M.; BORATYNSKI, A. Morphological versus molecular markers to describe variability in *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa* (Cupressaceae). **AoB Plants**. 2012.

DURIGAN, G; SILVEIRA, E R. Recomposição da mata ciliar em domínio de cerrado, Assis, SP. Riparian forest restoration in cerrado, Assis, SP, Brazil. **Scientia Forestalis**, v. 56, p. 135-144, 1999.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v 4, n. 2, p.359-361, 2012.

FERNANDES, A. **Fitogeografia Brasileira** – Fundamentos Fitogeográficos: fitopaleontologia, fitoecologia, fitossociologia, fitocorologia. 1ª Parte - 3. editora UFC, 2007. 183p.

FUTUYMA, D. J. 2005. **Evolution**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. ISBN 0-87893-187-2

HAMRICK, M. W. Leptin, Bone Mass, and the Thrifty Phenotype. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 10, p. 1607-1611, 2004. ISSN 1523-4681. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1359/JBMR.040712> >.

HEDRICK, P. W. A Standardized Genetic Differentiation Measure. **Evolution**, v. 59, n. 8, p. 1633-1638, 2005.

HEY, J.; WAPLES, R. M. S.; ARNOLD, M. L.; BUTLIN, R. K.; HARRISON R. G. Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 597-603, 2003.

HOLSINGER, K. E.; LEWIS, P. O.; DEY, D. K. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 7, p. 1157-1164, 2002.

HUBISZ, M. J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 5, p. 1322-1332, 2009.

JESUS, N. B.; SANTANA, L. L.; GOMES, L. J. **Extrativismo: Reflexão para a gestão florestal da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no baixo São Francisco-SE/AL**. In: Lucas AAT, NETTO AOA. (ed) Águas do São Francisco. São Cristóvão, Editora UFS, 2011, p. 85-126.

JESUS, B. C.; GOMES, L. J. **Importância socioeconômica**. In: Pensando a biodiversidade: aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) / Laura Jane Gomes ... [et al.,]. – São Cristóvão: Editora UFS, 2013. 372 p.

KRAMER, A. T.; ISON, J. L.; ASHLEY, M. V.; HOWE, H. F. The Paradox of Forest Fragmentation **Genetics. Conservation Biology**, v. 22, n. 4, p. 878-885, 2008.

LEMES, M. R. et al. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 2875-2883, 2003.

LENZI, M.; ORTH, A. I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardeaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v.17, n. 2, p. 67-89, 2004.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. GDA. Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT. (2002). Disponível em
<<http://www.lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>> Acesso em maio de 2011.

LOWE, A. J.; BOSHIER, D; WARD, M; BACLES, C. F. E; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**. v. 95, p. 255–273, 2005.

MACIEL, M. N. M; WATZLAWICK, L. F.; SCHOENINGER, E. R; YAMAJI, F. M. Classificação Ecológica das Espécies Arbóreas. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, Curitiba, v.1, n.2, p. 69-78, 2003.

MANNI, F.; GUERARD, E; HEYER, E. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) Lhickovariation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. **Human Biology**, v. 76, n. 2, p.173-190. 2004.

MARTINS, K. et al. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 31, p. 61-69, 2008.

MELO,J; AMORIM, E; ALBUQUERQUE, U. Native medicinal plants commercialized in Brazil - priorities for conservation. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.156, p. 567-580, 2009.

PRIMACK, R. B.; EFRAIM, R. **Biologia da conservação**. Londrina, 2001. 327p.

MORAES, P. L. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. C. Diferenciação Genética e Diversidade em Populações Naturais de *Cryptocarya Aschersoniana* Mez (LAURACEAE). **Biota Neotropica**, v. 3, n. 1, 2003.

MOURA, T. M. de et al . Allelic diversity in populations of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) in a protected area and a disturbed environment. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 25, n. 4, 2011.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Vancouver, v.13, n.5, p.1143-1155, 2004.

PEAKALL, R. O. D, SMOUSE, P. E. **GenAlex 6: genetic analysis in Excel**. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v.6, n.1, p.288-295, 2006.

PIRY, S; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. **BOTTLENECK**: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, v.90, p.502-503, 1999.

PIRY, S.; ALAPETITE, A.; CORNUET, J. M.; PAETKAU, D.; BAUDOUIN, L.; ESTOUP, A. **GeneClass2**: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, v. 95, p.536-539, 2004.

RAMÍREZ, J. L; CEVALLOS-FERRIZ, S. R. S. A assemblage diverso de Anacardiaceae de sedimentos Oligoceno, Tepexi de Rodriguez, Puebla, México. **American Journal of Botany**, v.89, n.3, p.535-545, 2002.

RAPOSO, A.; MARTINS, K.; CIAMPI, A.Y.; WADT, L. H. de O.; VEASEY, E. A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1291-1298, 2007.

ROHLF, F. J. (2001) **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter Software. 38 p

SHAW, P. W.; PIERCE, G. J.; BOYLE, P. R. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**, v.8, n.3, p.

SHINDE, D.; LAI, Y.; SUN, F.; ARNHEIM, N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 3, p. 974-980, 2003.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBEN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, v.57, p.123-139, 2000.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, n. 1, p. 457-462, 1995.

SMITH, L. I. A tutorial on Principal Components Analysis. **University of Otago, New Zealand**, v. 26, 2002. Disponível em: <
http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf>

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBEN, A. M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombacaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v.26, p.113-121, 2003.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. **MICRO-CHECKER**: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535–538, 2004.

VOLIS S.; ZARETSKY, M.; SHULGINA, I. Fine-scale spatial genetic structure in a predominantly selfing plant: role of seed and pollen dispersal. **Heredity**, v.105, p.384–393, 2010.

WANDELER, P.; SMITH, S.; MORIN, P. A.; PETTIFOR, R. A.; FUNK, S. M. Patterns of nuclear DNA degeneration over time — a case study in historic teeth samples. **Molecular Ecology**, v.12, p.1087–1093, 2003.

WATTIER, R.; ENGEL, C. R.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; VALERO, M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). **Molecular Ecology**, v.7, p.1569–1573, 1998.

WEIR, B. S., COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370, 1984.

WILLIAMS, D. A.; OVERHOLT, W. A.; CUDA, J. P.; HUGHES, C. R. Chloroplast and microsatellite DNA diversities reveal the introduction history of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida. **Molecular Ecology**, v.14, p.3643–3656, 2005.

WILLIAMS, D. A.; STERNBERG, L. D. S. L.; HUGHES, C. R. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the invasive Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolius*. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 3, p. 231-232, 2002.

WRIGHT, S. The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. **Evolution**, v.19, n.3, p. 395-420, 1965.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Tree**, v.11, n.10, p.413-418, 1996.

YÜCEDAĞ, C.; Gailing, O. Genetic variation and differentiation in *Juniperus excelsa* M. Bieb. populations in Turkey. **Trees**, v.27, p.547–554, 2013.

ARTIGO 2 - *Schinus terebinthifolius*: population structure and implications for its conservation²**Abstract**

The high demand for *Schinus terebinthifolius* fruits, known as the Brazilian pepper, has generated attention from various researchers involved in vegetation studies in the São Francisco River Basin, Sergipe State, Brazil. The fruits are heavily exploited and the genetic consequences of their exploitation are currently unknown. As such, the objective of this study was to analyze the genetic diversity of three distinct populations of *S. terebinthifolius* (Caatinga, Atlantic Forest, and the Ecotone between them) and define priority areas for conservation of the species throughout the river basin. The study area is located along 81.52 km of the São Francisco River Basin. To address our research questions, 162 individuals were sampled and 11 ISSR primers were used, generating 157 polymorphic bands. The results showed recent genetic bottlenecks in the analyzed populations, while the genetic differentiation among populations was $F_{st}=0.27$. Results from the sampled population in the Caatinga and Atlantic Forest biomes presented a low level of genetic divergence (0.14). There was no correlation between genetic and spatial distance in the studied populations. We detected the existence of genetic barriers and nine distinct genetic groups ($K=9$). The presence of exclusive loci in each studied population provides convincing evidence to support the definition of these populations as potential management units.

Keywords: Exclusive loci; Genetic discontinuities; Genetic structuring; Management units; *Schinus terebinthifolius*; STRUCTURE.

² Artigo redigido conforme norma da revista Biochemical Systematics and Ecology, sendo esta uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial poderá sugerir alterações.

RESUMO

A alta demanda por frutas *Schinus terebinthifolius*, conhecida como a pimenta brasileira, gerou a atenção de vários pesquisadores envolvidos em estudos de vegetação na Bacia do Rio São Francisco, estado de Sergipe, Brasil. Os frutos são intensamente explorados e as consequências genéticas da sua exploração são desconhecidas atualmente. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética de três populações de *S. terebinthifolius* (Caatinga, Mata Atlântica e a região de Ecótono entre elas) e definir áreas prioritárias para a conservação da espécie em toda a bacia hidrográfica. A área de estudo está localizada ao longo 81,52 km da Bacia do Rio São Francisco. Para análise, 162 indivíduos foram amostrados e foram utilizados 11 primers ISSR, gerando 157 bandas polimórficas. Os resultados evidenciaram gargalos genéticos recentes nas populações analisadas, enquanto que a diferenciação genética entre as populações foi $F_{st} = 0,27$. Os resultados da população amostrada nos biomas Caatinga e Mata Atlântica apresenta um baixo nível de divergência genética (0,14). Não houve correlação entre a distância genética e espacial nas populações estudadas. Foi detectada a existência de barreiras genéticas e formação de nove grupos genéticos distintos ($K = 9$). A presença de locos exclusivos em cada população estudada fornece evidências convincentes para sugerir a definição dessas populações como potenciais unidades operacionais.

Palavras-chave: Loco exclusivo; Descontinuidades genéticas; Estruturação genética; Unidades Operacionais; *Schinus terebinthifolius*; STRUCTURE

1 Introduction

The effects of habitat loss on a population's viability are significant for biodiversity conservation studies. After decades of study, research has shown that changes to habitat and climate have negative impacts on ecological and genetic aspects of natural plant populations; such changes are considered the main drivers behind the loss of diversity (Lindenmayer and Fischer 2007; Lindenmayer et al., 2008).

The key challenge in recent years has been to assess population viability and the role of environmental heterogeneity in the functional connectivity of populations (Lindenmayer and Fischer 2007; Revilla and Wiegand, 2008). Therefore, current studies assess the response to landscape heterogeneity based on the life-history traits of a species. Depending on the environmental pressures experienced by the species and if the population size is decreasing, the species may be severely threatened (Miyaki 2009). To ensure its conservation and long-term viability in the environment it is necessary to identify populations that have retained a set of distinct genetic characteristics (Avice 2000).

According to Moritz (1994), Evolutionary Significant Units (ESU's) are populations that demonstrate significant divergence in allele frequencies. In conservation biology, ESUs have emerged as an important aspect of conservation and they are understood as a key target for conservationist strategies that coincide (or not) with recognized interspecific limits (Crandall et al., 2000; Hey et al., 2003; Mace 2004). ESU's are also appropriate for defining *in situ* conservation strategies or even in the sampling of individuals for germplasm banks. In order to ensure the management and viability of ESUs, strategies must be optimized through the identification of Management Units (MUs). In this approach, MUs are geographically distinct populations that

demonstrate divergence in the allelic frequencies, thus assuring the maintenance of ESUs (Diniz-Filho and Telles 2002; Manel et al., 2006).

In Sergipe State, located in the Northeast of Brazil, around 90% of the region's natural ecosystems have been converted to grassland and intensive agricultural activities. As such, it has been severely devastated, with only a few remaining areas of original coastal forest, restinga and riparian vegetation, arboreal/shrub and dry Caatinga forest, all of which continue to experience pressure from anthropogenic activities (MOPEC 2008). Currently some cities located on the banks of the São Francisco River (the main river of the Brazilian Northeast), such as Santana do São Francisco, Brejo Grande, Ilha das Flores and Pacatuba in Sergipe and Piaçabuçu in Alagoas State, have been the target of intense exploitation of *Schinus terebinthifolius* Raddi. The fruits of this species, popularly known as the Brazilian pepper, are exported to Europe, USA, Canada and Argentina and used as culinary seasoning and in the production of essential oils. This species occurs naturally in the region and the remaining natural populations have been heavily exploited for the past ten years.

The pressure of extractivism on this species is worrisome because harvesting the fruits reduces the amount of seeds in the soil, hampering its natural distribution and propagation, leading to differential seedling distribution over time. Furthermore, the creation of seed/seedling banks with low genetic variability may arise due to inbreeding, which is the result of a decrease in the effective number of individuals (Peters 1996). Consequently, there could be long-term reductions in the adaptation of new allelic combinations and an increased incidence of less vigorous individuals (Primack and Efraim 2001) due to inbreeding and genetic drift.

Information about the genetic diversity levels of natural populations allows us to gain an understanding of a species' ecological characteristics and the distribution of genetic variability. In this context, our study hypothesizes

that, since the studied populations are located within geographical proximity, genetic differentiation is expected to be limited as a result of high levels of gene flow between populations. Moreover, due to the fact that populations are located on the banks of the São Francisco River, the river could act as a secondary disperser of *S. terebinthifolius* seeds which would result in a homogenization of the gene flow and, thus, a decrease in the genetic differentiation. Therefore, the objective of this study was to analyze the genetic diversity of several populations of *S. terebinthifolius* and considering the context of intense extractivism, define priority areas for species conservation in the São Francisco River Basin.

2 Material and Methods

The study area covers a range of 81.52 km and it is located in the lower São Francisco River region, in the Northeast of Brazil (Figure 1).

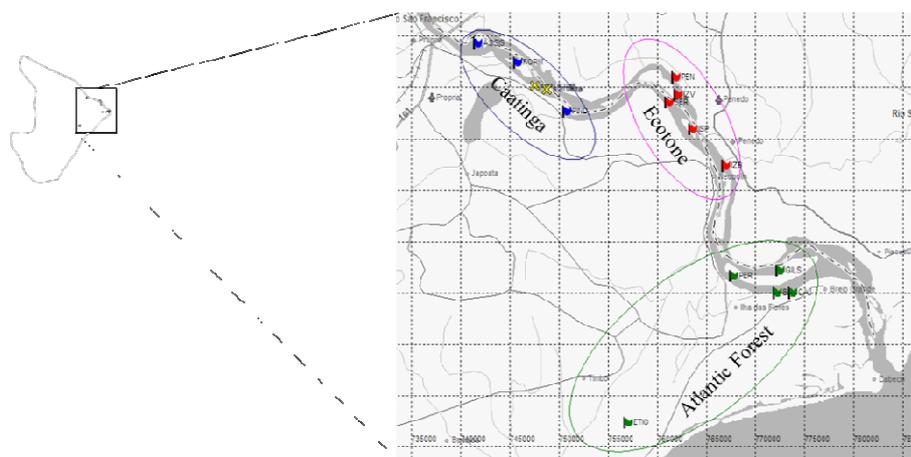


Fig1. Study area of *Schinus terebinthifolius* populations; blue represents the Caatinga; red represents the Ecotone; and green represents the Atlantic Forest

This area was chosen due to the high demand for Brazilian pepper locally and the study aimed to collect samples from several ecosystems where intense exploitation occurs: 30 individuals from the Caatinga Domain, 47 from the

Atlantic Forest, and 85 from the Ecotone between the two. All sampled individuals were geo-referenced and identified.

Genomic DNA was extracted from young leaves (2.0 g), which were crushed following the optimized CTAB method, and 0.2% b-mercaptoethanol (v/v) was added to the CTAB extraction buffer (Nienhuis et al., 1995). The analysis of the optimal number of polymorphic fragments was performed using the GENES software (Cruz 2006). The genetic analysis was conducted with AFLP-SURV version 1.0 (Vekemans 2002), using Bayesian analysis with non-uniform distribution for the estimate of frequencies based on Zhivotovsky (1998). After the transformation of binary data of allele frequencies, the data was used to analyze the following genetic parameters: number of loci; number of polymorphic loci; Nei's genetic diversity (\hat{H}_e) (NEI 1973); and genetic differentiation between populations (F_{st}). Gene flow was obtained through the POPGENE 1.31 software (Yeh et al 1997) and we used the BOTTLENECK 1.2.02 software (Cornuet and Luikart 1996) to test for significant recent decreases in the effective population size (N_e), based on the assumption that populations that have experienced a severe and recent genetic bottleneck show fewer alleles than the result found for \hat{H}_e (Luikart et al 1998). The number of exclusive loci and analysis of molecular variance (AMOVA) were obtained using GenAlEx software (Peakall and Smouse 2006).

In order to analyze the spatial patterns of genetic variability in a multivariate context, geographical distance classes were defined (first class with upper limit of 3.7 m and final distance class with limits of 33.6 to 40.4 m), grouped in matrices of spatial connectivity and correlated with genetic distance. The significance of the matrix correlation coefficients was evaluated by Mantel's Z statistic (Mantel 1967) using NTSYS 2.0 (Rohlf 2000). The intercept of spatial correlograms was used as a parameter to define the minimum distance

among populations which are genetically independent and this was subsequently used to define management units (MU's) (Diniz-Filho and Telles 2002).

Genetic diversity, θ^B , was estimated using Bayesian analysis, performed by HICKORY v. 1.1 (Holsinger and Lewis 2003), where the value of θ^B was obtained from the average of the four different models used in HICKORY, with Markov Chain Monte Carlo simulation. The four models include: the full model, which estimates values for θ^B and f ; models θ^B and f both of which assume θ^B and f are equal to zero; and the *free f* model, which chooses random values for f (Holsinger et al., 2002). The identification of discontinuity in genetic data across geographical space was performed in the software BARRIER (Manni et al., 2004). The sampled populations were connected by Delaunay's triangulation method according to geographical coordinates and barriers were identified using the Monmonier's algorithm (Manni et al., 2004). Based on Bayesian grouping, the analysis of the population genetic structure was performed using STRUCTURE v. 2.3 (Pritchard et al., 2000; Hubisz et al., 2009). This model is capable of identifying the structure and proportion of genotypes from other groups following the Evanno et al (2005) method ($\Delta K = m \left| L''(K) \right| / s[L(K)]$) using the Structure Harvester software (Earl et al., 2012).

The effective population size (N_e) was calculated according to the methodology presented by Vencovsky (1997) for a simple population and for multiple populations.

Management units were identified based on the intercept of spatial correlograms, genetic discontinuities, and effective population size, with the goal of helping to conserve genetic variability, as assessed by ISSR markers, of the Brazilian pepper in the studied area.

3 Results

Using the sampled 162 individuals of Brazilian pepper, the amplification of genomic DNA with 11 ISSR primers resulted in 181 bands, 86.7% of which were polymorphic, totaling 157 polymorphic bands. The number of bands per study area was: 145 in Caatinga, 150 in the Ecotone, and 153 in Atlantic Forest. Thirty exclusive loci were identified across all populations, of which 19 were detected only in the Ecotone population with frequencies ranging from 0.01 to 1.0. However, from the Ecotone population, two fixed loci were observed and five loci showed frequencies less than 5%. In the Atlantic Forest population, we found nine exclusive loci with frequencies ranging from 0.04 to 0.68. In the Caatinga, two exclusive loci were identified, one with a frequency of 0.10 (present in three individuals) and the other with a frequency of 0.43 (found in 12 individuals). Considering both the Ecotone and Atlantic Forest, the majority of exclusive loci occurred at high frequencies (greater than 10%). Common loci in the sampled areas were not detected (Table 1).

Table 1. Frequency of exclusive loci in the natural habitat of *S. terebinthifolius* in the São Francisco River Basin

Locus	Areas of natural occurrence			Locus	Areas of natural occurrence		
	Caatinga	Ecotone	Atlantic Forest		Caatinga	Ecotone	Atlantic Forest
Locus 014	0.000	0.120	0.000	Locus 076	0.433	0.000	0.000
Locus 018	0.000	0.060	0.000	Locus 088	0.000	0.000	0.277
Locus 021	0.000	0.131	0.000	Locus 090	0.000	0.000	0.128
Locus 031	0.000	0.000	0.383	Locus 095	0.000	1.000	0.000
Locus 034	0.000	0.000	0.319	Locus 104	0.000	0.047	0.000
Locus 035	0.000	0.012	0.000	Locus 111	0.000	0.000	0.340
Locus 038	0.000	0.000	0.681	Locus 117	0.000	0.012	0.000

Locus 046	0.000	0.435	0.000	Locus 120	0.000	0.071	0.000
Locus 047	0.000	0.094	0.000	Locus 121	0.000	0.282	0.000
Locus 052	0.000	0.118	0.000	Locus 137	0.000	0.459	0.000
Locus 061	0.000	0.000	0.106	Locus 142	0.000	0.024	0.000
Locus 064	0.000	0.435	0.000	Locus 150	0.000	0.000	0.277
Locus 065	0.000	0.141	0.000	Locus 162	0.000	0.035	0.000
Locus 070	0.100	0.000	0.000	Locus 176	0.000	0.012	0.000
Locus 073	0.000	0.000	0.000	Locus 181	0.000	1.000	0.000

The genetic diversity (\hat{H}_e) presented an average of 0.204 (0.201-0.206) with the Atlantic Forest population presenting the highest diversity index (0.206) in comparison with the other sampled populations. According to AMOVA, the majority of the genetic variability occurred within populations (61%).

The genetic differentiation between populations (F_{st}) was 0.27 and the greatest differentiation was found between Ecotone/Atlantic Forest (0.33), with a rate of gene flow of 1.7, and between Ecotone/Caatinga (0.33), with gene flow of 1.6. The genetic differentiation between Caatinga/Atlantic Forest was 0.14 and the gene flow was higher than 4.0, even though these two populations have the greatest geographic distance, approximately 29.56 km. There was no significant correlation between the genetic and the geographic distance matrices (Figure 2).

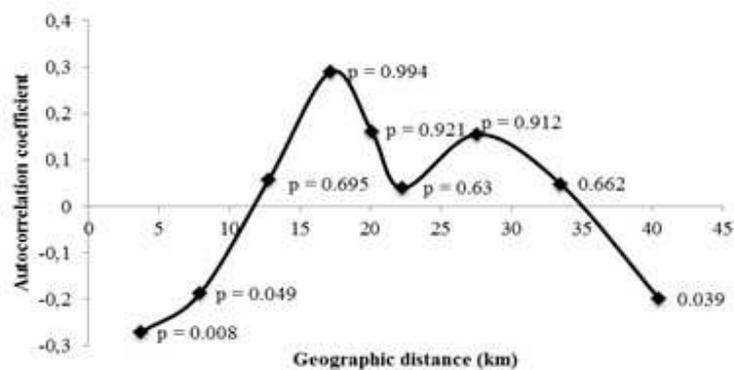


Fig2. Mantel correlograms based on the correlation between θ^B (Bayesian distances) and geographical distance classes found for *S. terebinthifolius* populations located in the São Francisco River Basin

The Bayesian analysis using the $f = 0$ model was the most adequate for estimating the genetic distance between the pairs of populations due to the lower DIC value (3831.23). The map of the genetic distance (θ^B) through Delaunay's triangulation confirmed the existence of genetic discontinuity among the sampled Brazilian pepper populations (Figure 3).

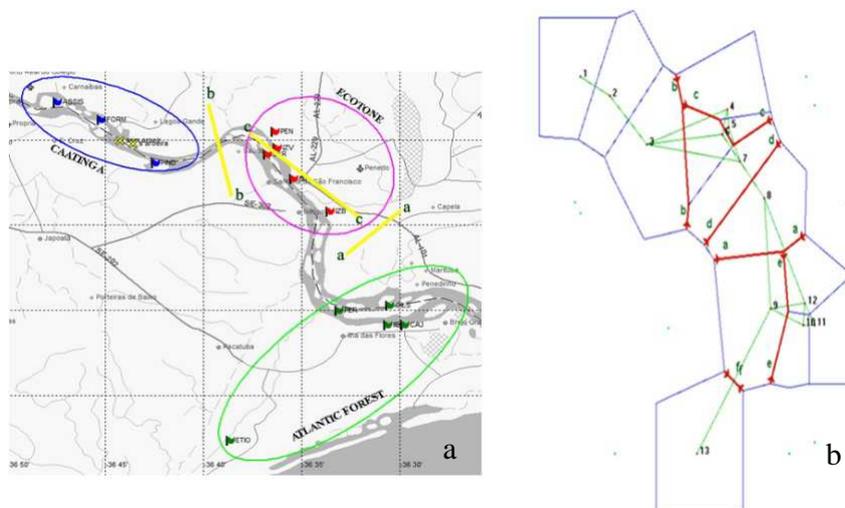


Fig3. Sampled *S. terebinthifolius* populations (a) and Delaunay's networks (b). The genetic discontinuities between the populations are identified according to the numbering and represented by red lines

Furthermore, *a posteriori* probabilities calculated with the Bayesian cluster method implemented in STRUCTURE identified 9 genetic clusters (Figure 4).

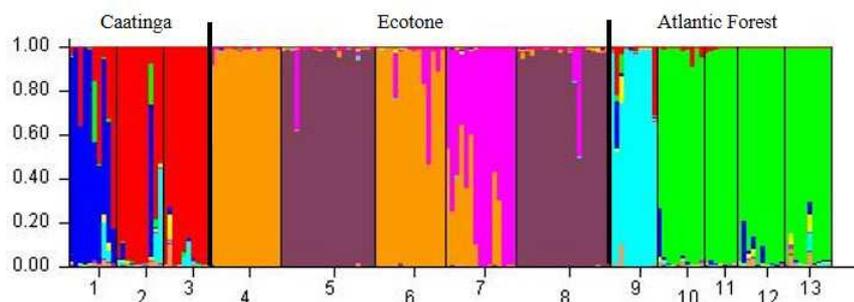


Fig4. Association of individuals of the three *S. terebinthifolius* populations within the 9 genetic clusters ($\Delta K=9$) located in the São Francisco River Basin

Tests of adherence to the model of infinite alleles resulting from mutation showed no equilibrium indicating the occurrence of recent bottlenecks ($p < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test). The three sampled populations also showed an excess of heterozygosity indicating a loss in effective population size.

The effective population size (N_e) was 15 individuals in the Caatinga, 42 in the Ecotone, and 23 in the Atlantic Forest; the N_e/n ratio for the three populations was 0.5.

4 Discussion

S. terebinthifolius has a high index of importance (4.19) across all distribution areas in Brazil. Beyond its ecological importance, it has been widely utilized for therapeutic purposes (Melo et al., 2009) and in the food industry (Jesus et al., 2011). Significant exploitation of this species occurs throughout the lower São Francisco River region in Sergipe State. In the Caatinga, the species has a low population density of 13 ind/ha. In the other regions studied herein,

even with significant densities of 208 ind/ha (Ecotone) and 80 ind/ha (Atlantic Forest), individuals showed signs of modifications to the structure of the trees, such as removed and broken branches, and a lack of regeneration.

Although the allelic frequencies are very similar among the three populations, most of the genetic diversity is distributed within populations (61%). This pattern is expected as diversity values within populations are generally higher in perennial and outcrossing species than in annual and autogamous species (Hu et al., 2010; Shao et al., 2009). However, this level of genetic diversity (61%) is considered low when compared to other studies on Neotropical species. For example, Ruas et al. (2011), in a study of the same species in two riparian forest fragments along the Tibagi River Basin in Paraná State, Brazil, found a genetic diversity of 86.3% within populations and 13.7% between populations. In the same study, the results showed a Wright fixation index of $F_{st}=0.1372$ which is considered a moderate level of divergence. In our study, the F_{st} (0.27) was high, indicating the possible presence of barriers that prevent gene flow.

According to Wright (1965), the level of genetic differentiation between populations (F_{st}) can be categorized as follows: values between 0 and 0.05 indicate a low level of genetic differentiation; values between 0.05 and 0.25 indicate moderate genetic differentiation; and values above 0.25 indicate high genetic differentiation. From this, our results suggest that the sampled Brazilian pepper populations show high genetic differentiation among them. The F_{st} of 0.27 observed here is similar to the values found for other tree species. Several studies indicate that F_{st} values between 0.22 and 0.36 are often found for outcrossing species or for those species classified as pioneers (Nybom 2004).

The occurrence of exclusive loci in each population contributed to the increased differentiation among populations (F_{st}). Although the number of exclusive loci is significant, the species may experience an immediate reduction

in exclusive loci if the genotypes with these loci are removed from the population.

The similarity between the Caatinga/Atlantic Forest populations ($F_{st}=0.14$) was higher than Ecotone/Caatinga and Ecotone/Atlantic Forest (both with $F_{st}=0.33$) which can be explained by the high number of exclusive loci found in the Ecotone population (Table 1). According to Seoane et al (2000), the presence of exclusive loci can in some cases indicate restricted gene flow.

The high frequencies of exclusive loci (up to 30%) may indicate that the observed migration rates reflect long-term rather than short-term gene flow (Astolfi et al 2012). This highlights the possibility of considering these studied populations as a metapopulation (Astolfi et al 2012). This fact is also demonstrated by the F_{st} value (0.14) between the Caatinga and Atlantic Forest populations, which indicates a low subdivision between them and resulted in rates of gene flow equal to 4.0. Therefore, gene flow was approximately four times the rate required to avoid divergence due to genetic drift (Wang 2004). Our data do not support the hypothesis that due to the proximity of populations, the migration ratio of pollen and seeds is high as the populations located in close proximity show the lowest rate of gene flow, while the populations separated by greater distances show high rates of gene flow.

There was no significant correlation between the genetic distance and the geographic distance matrices (Figure 1); this result suggests that there is no spatial pattern of genetic distance and gene flow. The lack of spatial patterning can indicate the existence of geographic barriers that lead to an absence of correlation between analyzed parameters (Mohsen and Ali 2008). This fact was demonstrated through Delaunay's triangulation where the map of genetic distance, θ^B , showed the existence of genetic discontinuity (barriers), separating the studied populations. The first two barriers (a and b) isolate the three populations (16.5 km), while a third barrier isolates the population located in

Alagoas State with the Zé Viana island population (located at a distance of only 1.7 km). Therefore, the existing genetic discontinuities are the result of factors beyond the geographical. In a study performed to verify the effect of fragmentation on the genetic structure in populations of *Chorisia speciosa*, Souza et al (2004) observed that Nei's genetic distance and the geographic distance were not associated; Souza suggested that the most probable cause for the difference in bands between populations could not be explained by the geographic distance, but by genetic drift. This is similar with the results found herein for *S. terebinthifolius* as the genetic differentiation cannot be explained by geographic distance. In the sampled populations we found a significant number of loci with excess heterozygosity in relation to expected heterozygosity, which is based on the assumption of equilibrium between mutation and drift (Cornuet and Luikart 1996), suggesting a bottleneck in the studied area. Furthermore, Gois et al., (2009) found similar results for *Spondias lutea* L., which is located in the same region of *S. terebinthifolius* (in the lower course of the São Francisco River, Sergipe State). The studied *S. lutea* population showed a tendency toward an excess of heterozygotes relative to the Hardy-Weinberg equilibrium (EHW) ($f_{\pm} -0.065$).

Although the nine genetic groups identified using the Structure program is significant, these groupings emphasize the homogeneity of alleles at each collection point, since the sample areas are on islands located along the river and each group is essentially restricted to each island, with few representative alleles from between the island groups. Beyond this, the analysis of the effective population size (N_e) showed a high degree of relatedness between individuals in the Brazilian pepper populations, demonstrating that the conservation of this species in the study area requires special attention. Based on the results obtained from the Mantel test, genetic discontinuities, bottleneck and effective size of the populations, it is necessary to delimit the three studied Brazilian pepper

populations as Management Units, since the MU's must be capable of maintaining minimum viable populations, avoiding the loss of genetic variability due to drift or endogamy. Therefore, considering the N_e obtained for the species, a minimum viable population of 300 individuals is necessary in the short-term and 3000 in the long-term to conserve this species in the study area.

According to Garza and Williamson (2001), if the population experiences a drastic and continuous decline, it may take hundreds of generations to recover. Thus, the current unsustainable exploitation of the Brazilian pepper is making long-term recovery unfeasible for the studied populations.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) (Process n° 476477/2008-5) for financial support and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the doctoral scholarship of S. V. A. Carvalho. We also thank Dr. Evelyn R. Nimmo for editing the English of the manuscript.

References

- Astolfi P, Reynoso MM, Ramirez ML, Chulze SN, Alves TCA, Tessmann DJ, Del Ponte EM (2012) Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *Plant Pathol* 61 (2):289-295. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02515.x
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 447 p.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144 (4):2001-2014
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol Evol* 15 (7):290-295. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01876-0

- Cruz CD (2006) Genes versão 98.2.0: Programa para análise e processamento de dados baseado em modelos de genética e estatística experimental. UFV Viçosa MG:
- Diniz-Filho JAF, Telles MPdC (2002) Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. *Conserv Biol* 16 (4):924-935
- Earl DA, VonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4 (2):359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14 (8):2611-2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Garza JC, Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol* 10 (2):305-318. doi:10.1046/j.1365-294X.2001.01190.x
- Gois, I. B. Silva-Mann, R. Ferreira, R. A. (2009) Variabilidade genética de *Spondias lutea* L. em uma população do baixo São Francisco sergipano, por meio de isoenzimas. *Sci. For* 37 81:055-060
- Hey J, Waples RS, Arnold ML, Butlin RK, Harrison RG (2003) Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends Ecol Evol (Personal edition)* 18 (11):597-603
- Holsinger KE, Lewis PO, Dey DK (2002) A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Mol Ecol* 11 (7):1157-1164
- Holsinger KE, Lewis PO (2003) Hickory v. 1.1. Department of Ecology & Evolutionary Biology, The University of Connecticut
- Hu Y, Wang L, Xie X, Yang J, Li Y, Zhang H (2010) Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. *Biochem Syst Ecol* 38 (3):264-274. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2010.01.006
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resour* 9 (5):1322-1332. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x
- Jesus NB, Santana LL, Gomes LJ (2011). Extrativismo: Reflexão para a gestão florestal da aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) no baixo São Francisco-SE/AL. In: Lucas AAT, NETTO AOA. (ed) Águas do São Francisco. São Cristóvão, Editora UFS, pp. 85–126
- Lindenmayer D, Hobbs RJ, Montague-Drake R, Alexandra J, Bennett A, Burgman M, Cale P, Calhoun A, Cramer V, Cullen P, Driscoll D, Fahrig L, Fischer J, Franklin J, Haila Y, Hunter M, Gibbons P, Lake S, Luck G,

- MacGregor C, McIntyre S, Nally RM, Manning A, Miller J, Mooney H, Noss R, Possingham H, Saunders D, Schmiegelow F, Scott M, Simberloff D, Sisk T, Tabor G, Walker B, Wiens J, Woinarski J, Zavaleta E (2008) A checklist for ecological management of landscapes for conservation. *Ecol Lett* 11 (1):78-91. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01114.x
- Lindenmayer DB, Fischer J (2007) Tackling the habitat fragmentation panchreston. *Trends Ecol Evol* 22 (3):127-132. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.006
- Luikart G, Allendorf F, Cornuet J-M, Sherwin W (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J Hered* 89 (3):238-247. doi:10.1093/jhered/89.3.238
- Mace GM (2004) The role of taxonomy in species conservation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359 (1444):711-719. doi:10.1098/rstb.2003.1454
- Manni F, Guerard E, Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Hum Biol* 76 (2):173-190
- Manel, S. Schwartz, M. K. Luikart, G. Taberlet, P. (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends ecol evol.* 18(4): 189-197
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27 (2 Part 1):209-220
- Melo J, Amorim E, Albuquerque U (2009) Native medicinal plants commercialized in Brazil – priorities for conservation. *Environ Monit Assess* 156 (1-4):567-580. doi:10.1007/s10661-008-0506-0
- Miyaki C (2009) Filogeografia e a descrição da diversidade genética da fauna brasileira. *Megadiversidade Belo Horizonte* 5:96-100
- MOPEC (2008). A Mata Atlântica no estado de Sergipe. Disponível em <http://mopec.no.sapo.pt/mata.htm>. Accessed 15 de March de 2008
- Moritz C (1994) Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends Ecol Evol* 9 (10):373-375. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(94)90057-4
- Mohsen H, Ali F (2008) Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers. *AJB, Nairobi* (7) 1:44-50
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci* 70 (12):3321-3323
- Nienhuis J, Tivang J, Skroch P, dos Santos JB (1995) Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. *J Am Soc Hortic Sci* 120 (2):300-306
- Nybohm H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol* 13 (5):1143-1155. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x

- Peakall ROD, Smouse PE (2006) genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6 (1):288-295. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Peters CM (1996) The ecology and management of non-timber forest resources (1996). The World Bank. doi:doi:10.1596/0-8213-3619-3
- Primack RB Efraim R (2001) Biologia da conservação. Londrina. 327p
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155 (2):945-959
- Revilla E, Wiegand T (2008) Individual movement behavior, matrix heterogeneity, and the dynamics of spatially structured populations. Proc Natl Acad Sci U S A 105 (49):19120-19125
- Rohlf. F. J. (2000) Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York: Exeter Software. 38 p.
- Ruas EA, Ruas CF, Medri OS, Medri C, Medri ME, Bianchini E, Pimenta JA, Rodrigues, LA, Ruas PM (2011) Anatomy and genetic diversity of two populations of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) from the Tibagi River basin in Paraná, Brazil. Genet. Mol. Res. 10 (1), 526-36
- Seoane CES, Sebbenn AM, Kageyama PY (2000) Efeitos da fragmentação florestal em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. Sci. For 57:123-139
- Shao JW, Chen WL, Peng YQ, Zhu GP, Zhang XP (2009) Genetic diversity within and among populations of the endangered and endemic species *Primula merrilliana* in China. Biochem Syst Ecol 37 6:699-706. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2009.12.001
- Souza L M F I, Kageyama PY, Sebbenn AM (2004) Genetic structure in fragmented populations of *Chorisia speciosa* St. Hil. Sci. For 65:70-79
- Vekemans X (2002) AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Écologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium [Available at <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html>]
- Vencovsky, R. (1997) Biometrical approaches for molecular markers: estimation of effective population size. In International Workshop on Agricultural Biotechnology
- Wang J (2004) Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. Conserv Biol 18 (2):332-343. doi:10.1111/j.1523-1739.2004.00440.x
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19 (3):395-420. doi:citeulike-article-id:3289946
- Yeh, R.C. Yang, R. C. Boyle, T. (1997) POPGENE. Version 1.21: Software Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta, Canadá

Zhivotovsky LA (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Mol Ecol* 8 (6):907-913.
doi:10.1046/j.1365-294x.1999.00620.x