

PROD. TEC. ITV DS – N022/2020
DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2020.22.Correa

PRODUÇÃO TÉCNICA ITV DS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *PILOCARPUS MICROPHYLLUS* NA FLONA DE CARAJÁS - PA.

Waléria Pereira Monteiro Corrêa (UFPA)

Jeronymo Dalapicolla (ITVDS)

Rodolfo Jaffé (ITVDS)

Cecílio Frois Calderia (ITVDS)

Belém - Pará

Julho/2020

Título: Diversidade genética de <i>Pilocarpus microphyllus</i> na Flona de Carajás-PA.	
PROD. TEC. ITV DS - N022/2020	Revisão 00
Classificação: () Confidencial () Restrita () Uso Interno (x) Pública	

Informações Confidenciais - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

Informações Restritas - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

Informações de Uso Interno - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

Informações Públicas - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C824 Corrêa, Waléria Pereira Monteiro.

Estudo da diversidade genética de *Pilocarpus microphyllus* na Flona de Carajás-PA. / Waléria Pereira Monteiro Corrêa, Jeronymo Dallapicola Rodolfo Jaffe, Cecílio Frois Caldeira. -- Belém, 2020.
29 p. : il.

1. Extrativismo. 2. Diversidade genética. 3. BAGS. 4. Conservação.
5. CNCFlora. I. Corrêa, Waléria Pereira Monteiro. II. Dalapicola, Jeronymo. III. Jaffé, Rodolfo. IV Caldeira, Cecílio. Título

CDD 23. ed. 581.3098115

Bibliotecária responsável: Nisa Gonçalves / CRB 2 – 525

RESUMO EXECUTIVO

O jaborandi, sobretudo a espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth, além de sua importância econômica e medicinal, desempenha papel significativo na geração de renda para inúmeras famílias nos Estados do Pará, Maranhão e Piauí, onde ocorre naturalmente. O extrativismo desordenado e o avanço do desmatamento reduziram fortemente a ocorrência do jaborandi e o colocaram na lista de espécies brasileiras em perigo de extinção. A determinação da diversidade genética natural do jaborandi na FLONA de Carajás, área sugerida como uma das suas maiores reservas naturais remanescentes, permitirá aprimorar planos de manejo e uso, além de ser a base para o estabelecimento de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) para espécie na região. Neste estudo, foram avaliados indivíduos adultos de jaborandi em 21 áreas de ocorrência no interior da FLONA de Carajás. Utilizando marcadores genômicos do tipo SNPs (single nucleotide polymorphism), nossos resultados sugerem uma alta diversidade genética e a presença de quatro populações espacialmente distintas. A diferenciação genética (F_{st}) entre as populações foi elevada em apenas uma população, o tamanho efetivo populacional (N_e) foi maior que 50 sugerindo que não há risco de a espécie sofrer uma depressão endogâmica à curto prazo. Encontramos uma endogamia levemente positiva em apenas uma população. Por fim, resultados preliminares apontam que um BAG composto a partir de indivíduos propagados de pelo menos 60 matrizes de cada população poderia evitar a perda significativa de diversidade genética da espécie à longo prazo. Nossos resultados fornecem informações importantes de diversidade genética, estrutura genética que pode auxiliar na elaboração de planos e de ações de conservação e manejo do jaborandi.

Palavras-chave: Extrativismo, diversidade genética, BAGS, conservação, CNCFlora.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1. LOCAL DE ESTUDO	8
3.2. AMOSTRAGEM.....	8
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA, SEQUÊNCIA NEXTRAD E IDENTIFICAÇÃO DE SNPs ..	9
3.4. SELEÇÃO DE SNPs NEUTROS	10
3.5. ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA POPULACIONAL	11
3.6. BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA	12
4. RESULTADOS	13
4.1. DADOS NEUTRAIS.....	13
4.2. ESTRUTURA POPULACIONAL	13
4.3. DIVERSIDADE GENÉTICA.....	14
4.4. BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA	18
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÕES	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
ANEXO	30

1. INTRODUÇÃO

Embora sejam conhecidos os efeitos nocivos da degradação ambiental para a conservação da biodiversidade e para a sustentabilidade da produção de bens e alimentos, fortes avanços sem planos de manejo e acentuada devastação ainda são observados sobre diferentes áreas/ecossistemas em todo o planeta. Os números recentes de aumento do desmatamento na região Amazônica, juntamente com imagens de incêndios que tiveram suas cinzas e fumaças carregadas pelo vento até a cidade de São Paulo, voltaram a receber atenção global (LOVEJOY; NOBRE, 2019). As florestas tropicais representam quase 2/3 da biodiversidade do planeta e a Amazônia é reduto de grande parte destas espécies (MIGUEL, 2007). Além da perda de diversidade, a derrubada destas florestas acarreta em redução de estoque de carbono e alteração do ciclo hidrológico, como já observado em determinadas bacias da região que sofreram forte substituição da floresta por pastagens destinadas a pecuária (SOUZA-FILHO *et al.*, 2016). A consequente redução da precipitação e aumento de temperatura acentua os efeitos de secas, cada vez mais frequentes na região, e a tendência de savanização em áreas onde as condições ambientais já operam no limite de sustentação da floresta (NOBRE *et al.* 2016; LOVEJOY; NOBRE, 2019).

A fragmentação e/ou rápida alteração das condições ambientais tem provocado a redução ou perda de habitats e colocado em perigo a sobrevivência de várias espécies. Estas perdas são ainda maiores em espécies exploradas através de extrativismo intensivo, onde não há um plano de manejo eficiente. Espécies medicinais da flora brasileira têm sido assim exploradas nos diferentes biomas e, apesar da redução de populações, erosão genética e perda da capacidade de coleta em ambiente natural detectada para muitas destas espécies em décadas anteriores (PINHEIRO, 1997, 2002; DE OLIVEIRA; MARTINS, 2002; SOUZA; MARTINS, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2010; MARIOT; BARBIERI, 2007), pouco tem sido feito para sua conservação, perfazendo em elevado número de espécies de interesse e uso medicinal na lista vermelha de espécies ameaçadas da flora do Brasil (CNCFlora, 2020).

O jaborandi é a única fonte natural e comercialmente viável para obtenção de pilocarpina, princípio ativo extraído de suas folhas que compõem vários medicamentos, usado sobretudo no tratamento de glaucoma e prevenção de xerostomia (MOURA *et al.*, 2005; ABREU *et al.*, 2011; CALDEIRA *et al.*, 2017). Com ocorrência natural descrita para os Estados do Pará, Maranhão e Piauí (PIRANI, 2015; SKORUPA, 2000a), desempenha também papel significativo na geração de renda para inúmeras famílias que dependem do extrativismo de produtos florestais. Associado ao desmatamento na região, o aumento da demanda por pilocarpina acentuou o extrativismo desordenado e reduziram fortemente a população natural desta espécie e, conforme os critérios do Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFLORA), o *P. microphyllus* encontra-se sob ameaça de extinção na categoria “Em Perigo”. Estes critérios ressaltam a redução do tamanho da população, havendo um declínio na área de ocupação, qualidade do hábitat e no número de populações naturais em aproximadamente 50% nos últimos 10 anos (MARTINELLI, G.; MORAES, 2013). De acordo com Pinheiro (2002), Caldeira *et al.* (2017) e Grabher (2015) houve uma redução na coleta de folhas de 1300-1500 t ano⁻¹ na década de 1970 para 200 t ano⁻¹ nos anos 2000, enquanto que, em algumas regiões há relatos do completo desaparecimento da espécie. Ações visando à conservação e ao manejo sustentável do jaborandi em condições naturais são emergenciais, especialmente na FLONA de Carajás, área sugerida como uma das maiores reservas naturais desta espécie (COSTA, 2012). Com este objetivo, uma série de atividades estão sendo executadas por diversas instituições públicas e privadas em parceria com a Cooperativa dos Extrativistas da FLONA de Carajás (CoEx-Carajás) visando ampliar o conhecimento sobre a espécie, possibilitar o manejo sustentável e realizar o monitoramento do *P. microphyllus* para assegurar que a atividade extrativista não gere impactos negativos sobre a diversidade remanescente.

Apesar de o intenso desmatamento até as bordas da FLONA de Carajás, seu interior tem sofrido menor pressão de perda de cobertura vegetal (SOUZA-FILHO, 2016), o que tem proporcionado a manutenção e exploração do *P. microphyllus*, que ocorre comumente no sub-bosque da floresta. Dominada sobretudo por uma floresta ombrófila densa, a FLONA de Carajás possui um relevo acidentado e também abriga uma cadeia de montanhas ricas em minerais (maior reserva mundial de Ferro) conhecidas como Serras de Carajás. Os topos destas serras são cobertos por uma

vegetação mais esparsa típica de campos rupestres, as cangas, ou campos rupestres ferruginosos abrigam uma enorme diversidade vegetal (MOTA *et al.* 2018), incluindo o *P. microphyllus* (PIRANI; DEVECCHI, 2018). Portanto, o *P. microphyllus* pode ser encontrado em diferentes fitofisionomias da FLONA de Carajás, desde áreas mais abertas como as cangas, quanto ao sub-bosque mais fechado da floresta ombrófila.

Pilocarpus microphyllus é um arbusto ou arvoreta de sub-bosque bastante ramificada com flores hermafroditas, perene e alógama. As folhas são compostas de folíolos sésseis e pequenos que liberam um cheiro forte quando esmagados (SKORUPA, 2000; PIRANI; DEVECCHI, 2018). Seus frutos são do tipo mericarpo, com a dispersão feita por deiscência explosiva, como em outras espécies do gênero *Pilocarpus* (SKORUPA *et al.*, 2005). A reprodução geralmente ocorre sexualmente e seus principais polinizadores são moscas e abelhas (SILVA *et al.*, 2000). Estudos de divergência genética para a espécie *P. microphyllus*, com amostras dos estados onde ocorre naturalmente, revelou que a similaridade genética é influenciada pelos mecanismos de dispersão e também que a menor diversidade genética encontrada está correlacionada com intenso extrativismo das folhas (MOURA, 2003; MOURA *et al.*, 2005). No entanto, esses trabalhos não avaliaram a estrutura geográfica da diversidade genética e não estimaram outros índices de diversidade, como a diversidade de nucleotídeos e tamanho efetivo da população para esta espécie. Essas informações são essenciais para o desenvolvimento de estratégias para o plano de manejo da espécie.

Diante disso, utilizamos dados genômicos para compreender como o extrativismo influencia os padrões de diversidade e estrutura genética nas populações de jaborandi da FLONA de Carajás. Considerando que o jaborandi sofre uma pressão antrópica pela exploração da pilocarpina, nós esperaríamos que houvesse uma (a) baixa diversidade genética; (b) aumento dos níveis de endogamia intrapopulacional; (c) redução do fluxo gênico; d) tamanho efetivo populacional baixo; e) Marcada estruturação genética, gerando populações diferenciadas.

2. OBJETIVOS

Avaliar a diversidade genética de *P. microphyllus* na FLONA de Carajás e fornecer subsídios para o plano de manejo e conservação da espécie.

Os objetivos específicos são:

- 1) Determinar as populações de *P. microphyllus* geneticamente diferenciadas na FLONA de Carajás;
- 2) Avaliar os níveis de variabilidade genética destas populações naturais;
- 3) Analisar o fluxo genético entre as populações;
- 4) Estimar um número mínimo de matrizes a serem amostradas em cada população para criação de banco de germoplasma para o *P. microphyllus* na FLONA de Carajás.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de estudo

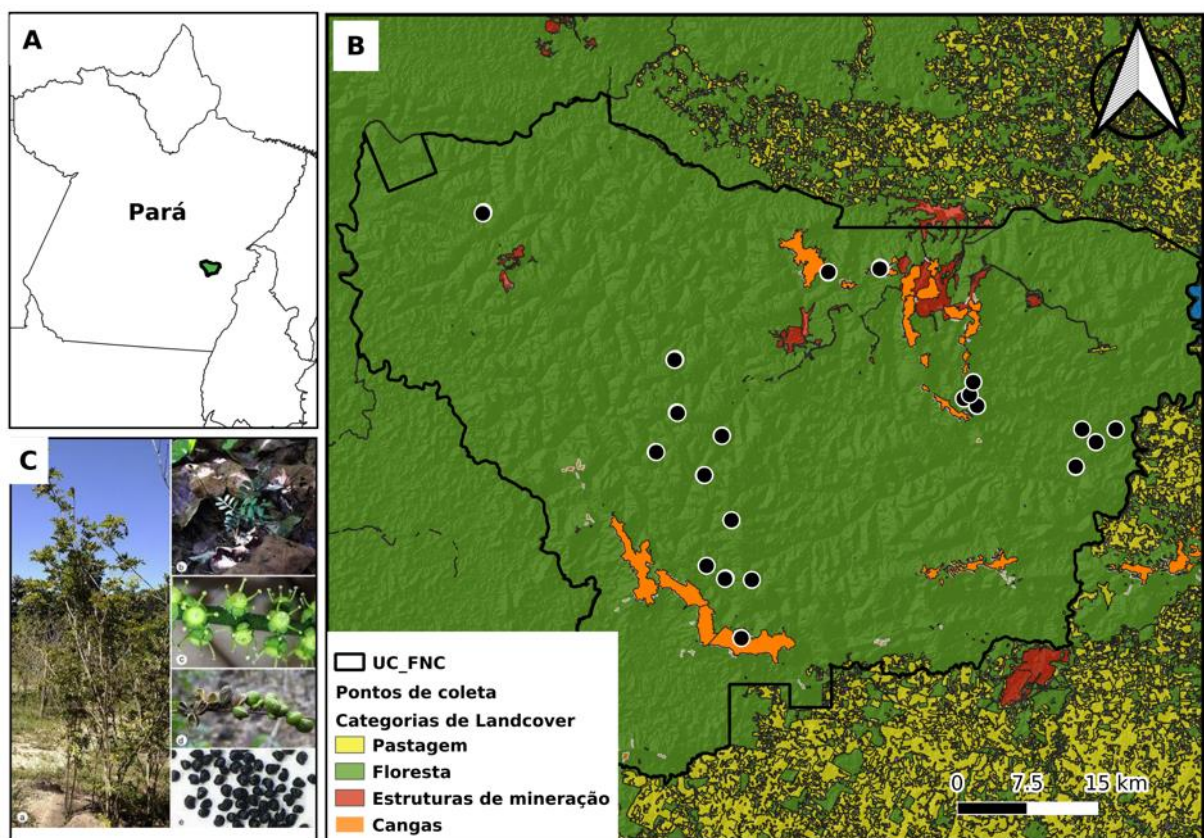
A Floresta Nacional de Carajás (FLONACA), localizada no Sudeste do Estado do Pará, na Amazônia Brasileira (Figura 1), abrange os municípios de Marabá, Parauapebas, Canaã dos Carajás e Água Azul do Norte e possui uma área de 411.949 hectares (ha) (LAGE VIANA *et al.*, 2016). A FLONACA é constituída por floresta ombrófila, floresta semicaducifolia e vegetação rupestre em substrato de canga hematítica ou campos ferruginosos (NUNES, 2009; VIANA; LOMBARDI, 2007). Na região de Carajás, o jaborandi ocorre principalmente em áreas de floresta ombrófila aberta com afloramentos rochosos, ou solo arenoso e pedregoso bem drenado, e em regiões de canga ou savana metalófila, uma formação vegetal de porte reduzido que se desenvolve sobre afloramentos rochosos com alto teor de ferro (SILVA, 1991; COSTA, 2005; GUMIER-COSTA *et al.*, 2016). Na FLONA de Carajás, as populações do jaborandi são restritas à região da Serra Norte mais precisamente nas Cangas alteradas dos blocos N1, N2, N3, N4, N5, N6 e em áreas florestadas (PIRANI; DEVECCHI, 2018). As populações dessa planta formam agregados denominados popularmente de “reboleiras ou bolas”, formações de alta densidade da espécie, com áreas que variam de 1 até 100 hectares (GUMIER- COSTA; JESUS, 2007; GRABHER, 2015).

3.2. Amostragem

Foram coletadas amostras de folhas frescas completamente expandidas, do solo na rizosfera da planta pertencentes a 420 indivíduos da espécie *P. microphyllus* (Jaborandi). As coletas foram realizadas em 21 parcelas demarcadas nas áreas de ocorrência da espécie no interior da Floresta Nacional de Carajás de forma a obter indivíduos nas diferentes fisionomias, desde floresta ombrófila densa a indivíduos nas

margens dos campos rupestres ferruginosos (cangas) (Figura 1) (autorização de coleta do SISBIO N. 48272-6). Em cada parcela foram demarcadas 20 plantas adultas (presença de estruturas reprodutivas e maiores de 1 metro), distantes de ao menos dois metros entre si, as quais receberam lacre numerado e foram georreferenciadas. De cada planta foram coletadas amostras de folhas e solo do entorno. Parte das folhas foram acondicionadas em saco de papel e outra coleta de dois folíolos acondicionados em brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) para posterior extração e quantificação de DNA. O tecido foliar das amostras coletadas foram armazenadas em tubos Falcon de 15 mL com CTAB (2%) (ROGSTAD, 1992) e depositadas no Instituto Tecnológico Vale de Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS).

Figura 1 - Mapa de cobertura de solo da área de estudo. A) Localização da Floresta Nacional de Carajás, estado do Pará, Brasil. B) Localização da área onde foram coletadas as amostras. Os pontos em preto são as 21 áreas coletadas para amostragem do estudo de diversidade genética natural do jaborandi. Linha em preto representa Floresta Nacional de Carajás (FLONA Carajás). C) Estágios de crescimento e reprodução de plantas de *Pilocarpus microphyllus* (Fonte: Caldeira et al., 2017).



Fonte: Os autores (2020)

3.3. Extração de DNA, Sequência NextRAD e identificação de SNPs

O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo do DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do DNA extraído foi realizada com a utilização do “Qubit™ Assay” (Invitrogen) e para verificar a integridade do DNA correram-se géis de Agarose 1,2%. Após essas etapas, 279 amostras de *Pilocarpus microphyllus* foram selecionadas para o sequenciamento (Tabela S1). Essas amostras foram enviadas a empresa SNPSaurus (Institute of Molecular Biology, Eugene, OR, USA, <http://snpsaurus.com/>), nos Estados Unidos, na concentração final de 5 ng/μL em 30 μL de volume para sequenciamento e processamento bioinformático.

O sequenciamento foi realizado utilizando a metodologia nextRAD (Nextera-fragmented, reductively amplified DNA) (RUSSELLO *et al.*, 2015)□. As bibliotecas genômicas foram sequenciadas utilizando Nextera DNA Flex Reagent (Illumina, Inc.) em um HiSeq 4000 com quatro faixas de 150 bp e a análise de genotipagem seguiu scripts personalizados (SNPsaurus, LLC), onde as *reads* foram cortadas utilizando a ferramenta *bbduk* do software BMap (<http://sourceforge.net/projects/bbmap/>): `bbmap/bbduk.sh in = $file out = $outfile ktrim= r k = 17 hdist = 1 mink = 8 ref = bbmap/resources/nextera.fa.gz minlen = 100 ow = t qtrim = r trimq = 10`. Um arquivo FASTA com sequências de referência foi criado coletando 10 milhões de *reads* uniformemente das amostras e eliminando as *reads* com contagens inferiores a 10 ou mais de 400 e alinhadas *de novo* (SILVA *et al.*, 2020)□. Os lócos restantes foram então alinhados entre si para identificar alelos. A empresa SNPsaurus enviou um arquivo VCF, contendo os SNPs identificados em cada indivíduo. O arquivo VCF passou por uma filtragem prévia para remover alelos com uma frequência populacional abaixo de 3% e loci que eram heterozigotos em todas as amostras ou tinham mais de dois alelos em uma amostra (CARVALHO *et al.*, 2020)□.

3.4. Seleção de SNPs neutros

Antes das análises de estrutura e diversidade genética serem realizadas, foi realizado o controle de qualidade final utilizando um conjunto de funções que estão disponíveis no VCFtools (DANECEK *et al.*, 2011)□ executadas através do pacote “r2vcftools” (<https://github.com/nspope/r2vcftools>) utilizando o programa R versão 3.6.2 (R Development Core Team 2019). Para avaliar a estrutura genética e a

diversidade genética, empregamos alguns critérios com o objetivo de obter um subconjunto de locos neutros e independentes. Os critérios de filtragem incluíam qualidade na identificação dos nucleotídeos durante o sequenciamento (minQ=30), cobertura que representa o número de cópias por *read* (min.meanDP=20, max.meanDP=200), frequência alélica mínima (MAF=0.05), equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE, $p < 0.0001$), equilíbrio de ligação (limiar de r^2 de 0.4) e loci com menos do que 30% de dados faltantes. Adicionalmente foram removidos loci que potencialmente estavam sob seleção, detectados através de uma análise de *genome scans* com testes de F_{ST} outliers. Este foi aplicado após ser feito o ajuste das taxas de falsos positivos, com base na distribuição de p-valores e no fator de inflação genômica (λ) utilizando o algoritmo de Benjamini-Hochberg (FRANÇOIS *et al.*, 2016)□. De acordo com o trabalho de (SILVA *et al.*, 2020)□ essa análise compara estimativas de locus único de diferenciação populacional com o contexto geral em todo o genoma, enquanto contabiliza a estrutura da população. A estatística F_{ST} outliers foi estimada com a função sNMF do pacote "LEA" (FRICHOT; FRANÇOIS, 2015)□.

3.5. Estrutura e Diversidade genética populacional

O subconjunto de locos neutros foi então utilizado para avaliar a estrutura genética populacional utilizando três abordagens de clusterização de agrupamento genético: i) a função "sNMF" do pacote LEA, o qual fornece estimativas de mínimos quadrados de proporções de ascendência (FRICHOT; FRANÇOIS, 2015)□; ii) Análise Discriminante de Componentes Principais - DAPC do pacote *adegenet*, onde identifica e descreve grupos de indivíduos geneticamente relacionados (JOMBART *et al.*, 2008)□; e iii) o pacote TESS3 no programa R (CAYE *et al.*, 2016)□ que calcula estimativas de ancestralidade incorporando informações sobre coordenadas geográficas individuais em seu algoritmo (MARTINS *et al.*, 2016)□. Para o sNMF, foram realizadas dez corridas para cada valor de clusters (K) de 1 - 10, com um *burn in* de 200 iterações sob diferentes valores de *alpha* ($\alpha = 10, 100, 500, 1000, 2000, 4000$). A determinação do valor ótimo de K foi estimada utilizando-se o mínimo valor de *cross-entropy* (FRANÇOIS, 2016)□. No DAPC, também testamos valores de clusters (K) de 1 - 10, inferindo o número ideal a partir do menor valor do Critério de Informação Bayesiano (BIC). Enquanto que no TESS3, assumimos valores de K de 1-10 com 5 réplicas para cada valor de K , com *mask* de 0.05 e diferentes valores de

lambda (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5), escolhendo o mais provável valor de lambda com base no mínimo valor de validação cruzada, e o melhor valor de K seguindo a primeira quebra na linha de tendência, como indicado por CAYE *et al.* (2016)□.

Considerando os coeficientes de ancestralidade atribuídos pelo SNMF, calculamos a heterozigosidade esperada (H_e), diversidade nucleotídica (π : número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências) e coeficiente de endogamia (F) para cada agrupamento genético. Além dessas métricas, calculamos o tamanho efetivo populacional (N_e), empregando o método de desequilíbrio de ligação implementado no NeEstimator 2.1 e considerando a frequência alélica mínima de 0.05 (DO *et al.*, 2014), a diferenciação genética (F_{ST}) entre os grupos genéticos e Tajima's D , representando a diferença entre o número médio de diferenças aos pares e o número de sítios segregantes. Todas as métricas foram calculadas utilizando funções disponíveis no VCFtools implementadas no pacote "r2vcftools" (DANECEK *et al.*, 2011)□.

3.6. Banco Ativo de Germoplasma

A criação de um banco de germoplasma para o jaborandi requer a manutenção de um grupo de plantas formando um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) devido à acentuada perda de viabilidade de sementes observada em estudos desenvolvidos pelo ITV (comunicação pessoal) e em outras espécies do gênero (CALIL *et al.* 2008). Para estimar o número mínimo de plantas a serem amostradas para a criação de BAG para o Jaborandi da FLONA de Carajás, utilizamos a abordagem de Vencovsky (1987). Essa abordagem pode ser aplicada para plantas monoicas ou hermafroditas, alógamas e em condições de panmixia. Para respeitar essas premissas no caso do Jaborandi, os cálculos foram realizados ao nível populacional e vale ressaltar que a espécie é hermafrodita e alógama (SKORUPA *et al.*, 2000b). Essa metodologia não leva em conta a diversidade genética ou o fluxo gênico, apenas o tamanho efetivo populacional (N_e), o número de sementes coletadas por árvore e número de árvores amostradas. Para os cálculos, nós consideramos o número de 20 sementes por planta, um número factível já que um indivíduo de Jaborandi pode produzir até mais de 100 sementes por planta (C. Caldeira, comunicação pessoal). Além disso, calculamos o número de plantas necessário para alcançar um N_e de 50, para

minimizar problemas de endogamia e um N_e de 500 para manter o potencial evolutivo (JAMIESON; ALLENDORFF, 2012; FRANKLIN *et al.*, 2014).

Verificamos se o número de plantas selecionados pela abordagem de Vencovsky (1987), além de representar o N_e , representaria também a diversidade genética da população. Para isso, seguimos a metodologia de Hoban *et al.* (2020): a partir dos dados genéticos das populações naturais *in situ*, re-amostramos computacionalmente esse conjunto de dados para diferentes números de indivíduos (mínimo 2 e no máximo 150 indivíduos), representando os diferentes tamanhos amostrais que poderiam ser usados para o BAG. A cada nova reamostragem, calculamos a heterozigosidade esperada (H_e), como uma medida de diversidade genética (SMITH *et al.*, 2020), e a comparamos ao valor da população natural *in situ* a fim de avaliar a relação entre o tamanho potencial da coleção *ex situ* e a diversidade genética capturada. Como as populações tinham originalmente menos de 150 indivíduos, nós permitimos a duplicação de indivíduos aleatoriamente para alcançar esse número. Para cada reamostragem, nós repetimos a seleção de indivíduos e o cálculo da H_e 100 vezes com a técnica de *bootstrap*. Essas análises foram feitas com scripts customizados no programa R baseados em Hoban *et al.* (2020). Salientamos que estas são abordagens preliminares para estimar o número mínimo de plantas a serem amostradas para a criação do BAG. Assim, as estimativas aqui fornecidas devem ser consideradas primeiras aproximações, até métodos mais robustos serem implementados.

4. RESULTADOS

4.1. Dados Neutrais

Os 279 indivíduos sequenciados geraram um total de 36.672 SNPs. Após as filtrações (baseadas em qualidade, cobertura, dados faltantes, desequilíbrio de ligação, HWE e F_{ST} outliers) obtivemos um subconjunto com 277 indivíduos e 5.268 SNPs independentes para as análises de diversidade e estrutura de população.

4.2. Estrutura populacional

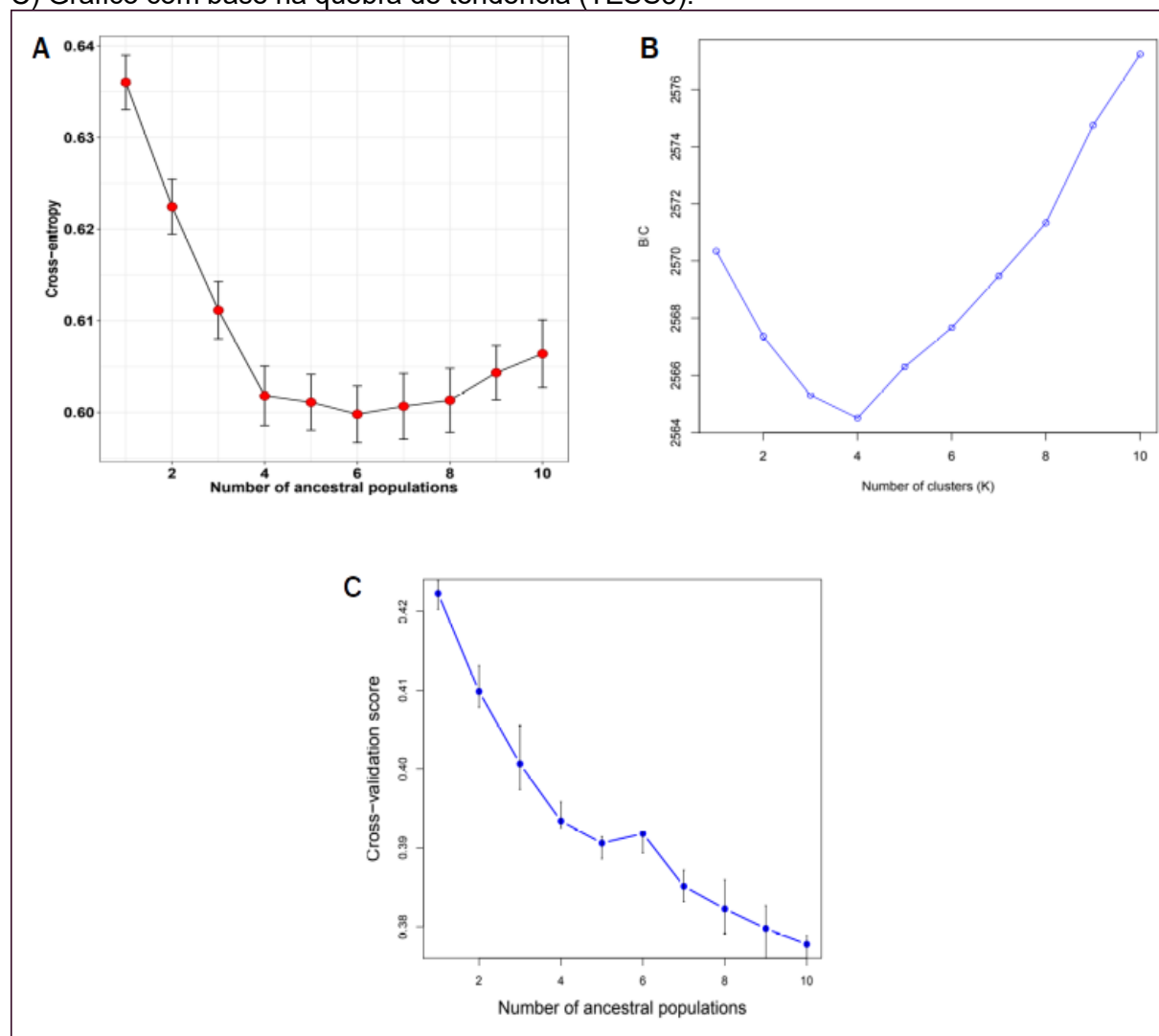
As análises de estrutura populacional avaliadas pelas três abordagens (sNMF, DAPC, TESS3) indicaram a presença de 4 populações (Figura 2 e 3). Todos os indivíduos foram associados às populações genéticas (denominadas como população A, B, C e D) da mesma forma nos três métodos. A pop_A agrupou os indivíduos de

apenas uma área (VP5); pop_B foi composta por 4 áreas (Traquar, Grotão, Gelo e Cari); pop_C agrupou amostras de 4 áreas (VP5-P1, VP5-P2, VP5-P3, VP5-P4) e a pop_D foi composta por 6 áreas (N1, N3, Porcão, Alemão, 29 e Macapá) (Figura 4). A diferenciação genética (F_{st}) entre as populações de *P. microphyllus* foi mais alta entre as populações A e B (Tabela 1).

4.3. Diversidade genética

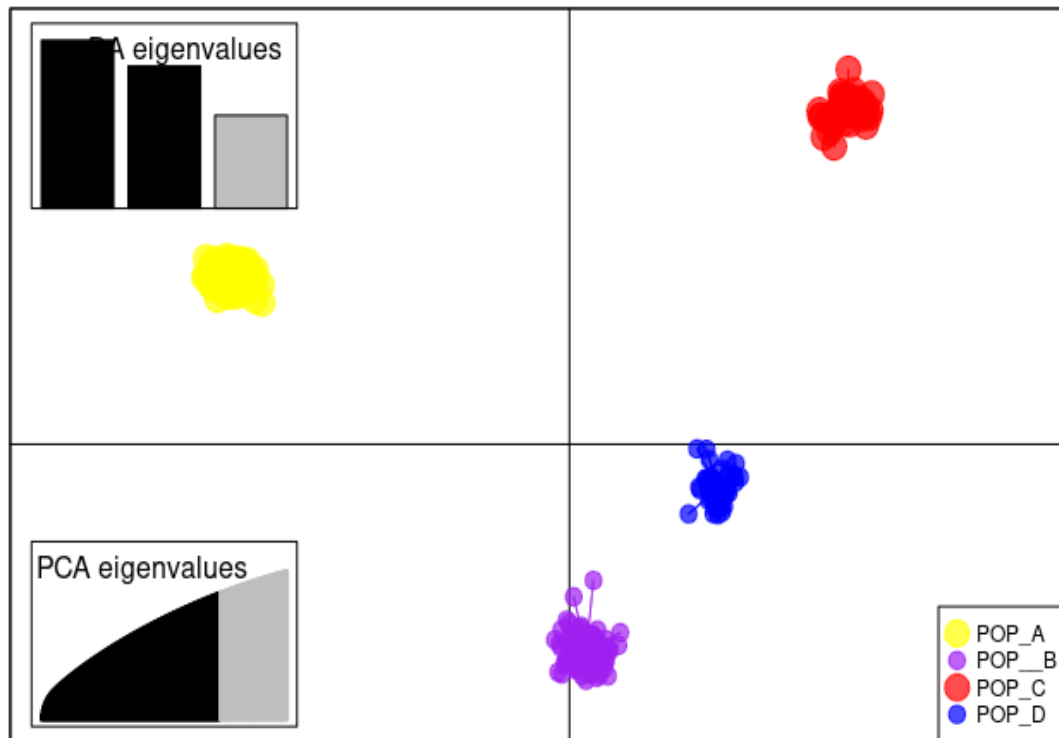
Observa-se que os valores de heterozigosidade esperada e diversidade nucleotídica são similares em todas as populações. Entretanto, a pop_D foi a que apresentou maior diversidade nucleotídica ($\pi = 0.24$) quando comparada com as demais (Tabela 2). Em relação ao coeficiente de endogamia, a pop_C apresentou valores negativos significativos, enquanto que a pop_D indicou baixa endogamia, porém significativa (Tabela 2). O tamanho efetivo populacional foi maior na pop_C quando comparado com as demais populações, enquanto as populações A e D demonstraram os menores valores (Tabela 2). Por fim, as populações B e D mostraram valores de Tajima's D negativos, indicativos de expansão populacional após um gargalo recente, e as populações A e C recuperaram intervalos de confiança que incluem o valor zero, demonstrando estabilidade no tamanho populacional (Tabela 2).

Figura 2 - Número ótimo de clusters genéticos (K) para *Pilocarpus microphyllus*. A) Gráfico com base na entropia cruzada (snmf); B) Gráfico com base no menor valor de BIC (DAPC); C) Gráfico com base na quebra de tendência (TESS3).



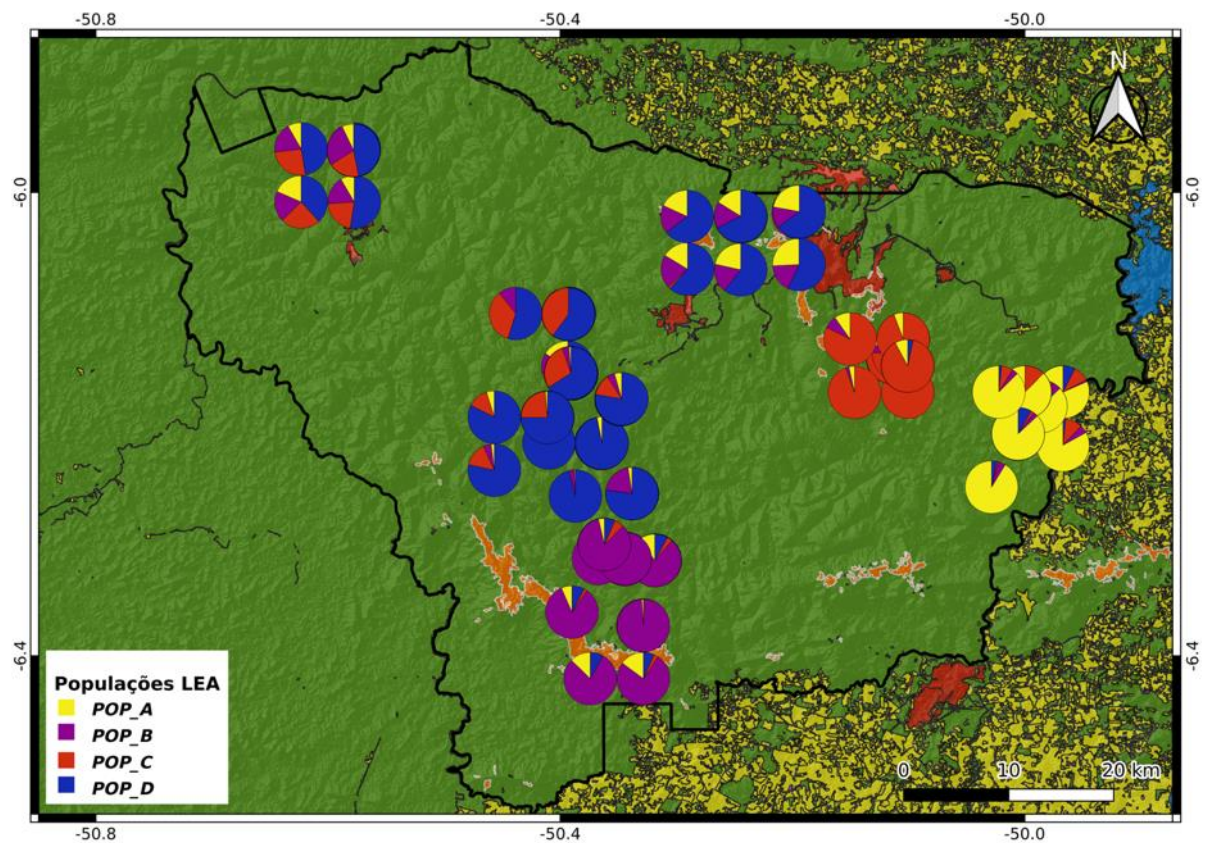
Fonte: Os autores (2020)

Figura 3 – Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) indicando a formação de quatro subgrupos de *P. microphyllus*. O gráfico acima à esquerda indica a variância explicada pelos autovalores das duas funções discriminantes utilizadas no *scatterplot*, enquanto que o gráfico abaixo à esquerda representa a contribuição dos autovalores (eigenvalues) dos componentes principais selecionados para o DAPC.



Fonte: Os autores (2020)

Figura 4 - Distribuição das amostras de *P. microphyllus* a 4 clusters genéticos sobrepostos em um mapa de cobertura de solo e elevação. Os gráficos de pizza representam os coeficientes de ancestralidade determinados usando o pacote LEA. As serras são mostradas em laranja e as áreas mineradas em vermelho (adaptado de Souza-Filho et al., 2016). As coordenadas são mostradas em graus decimais.



Fonte: Os autores (2020)

Tabela 1 - Valores médios do índice de diferenciação genética entre populações (*F*_{st}) de *P. microphyllus*. Em destaque (negrito) estão os valores mais altos e mais baixo de *F*_{st} entre as populações.

	POP_A	POP_B	POP_C
POP_A			
POP_B	0,106		
POP_C	0,091	0,088	
POP_D	0,090	0,056	0,052

Tabela 2 - Diversidade genética das populações de *P. microphyllus* estimadas pelas análises de SNPs: tamanho amostral (N), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F), estimativa do

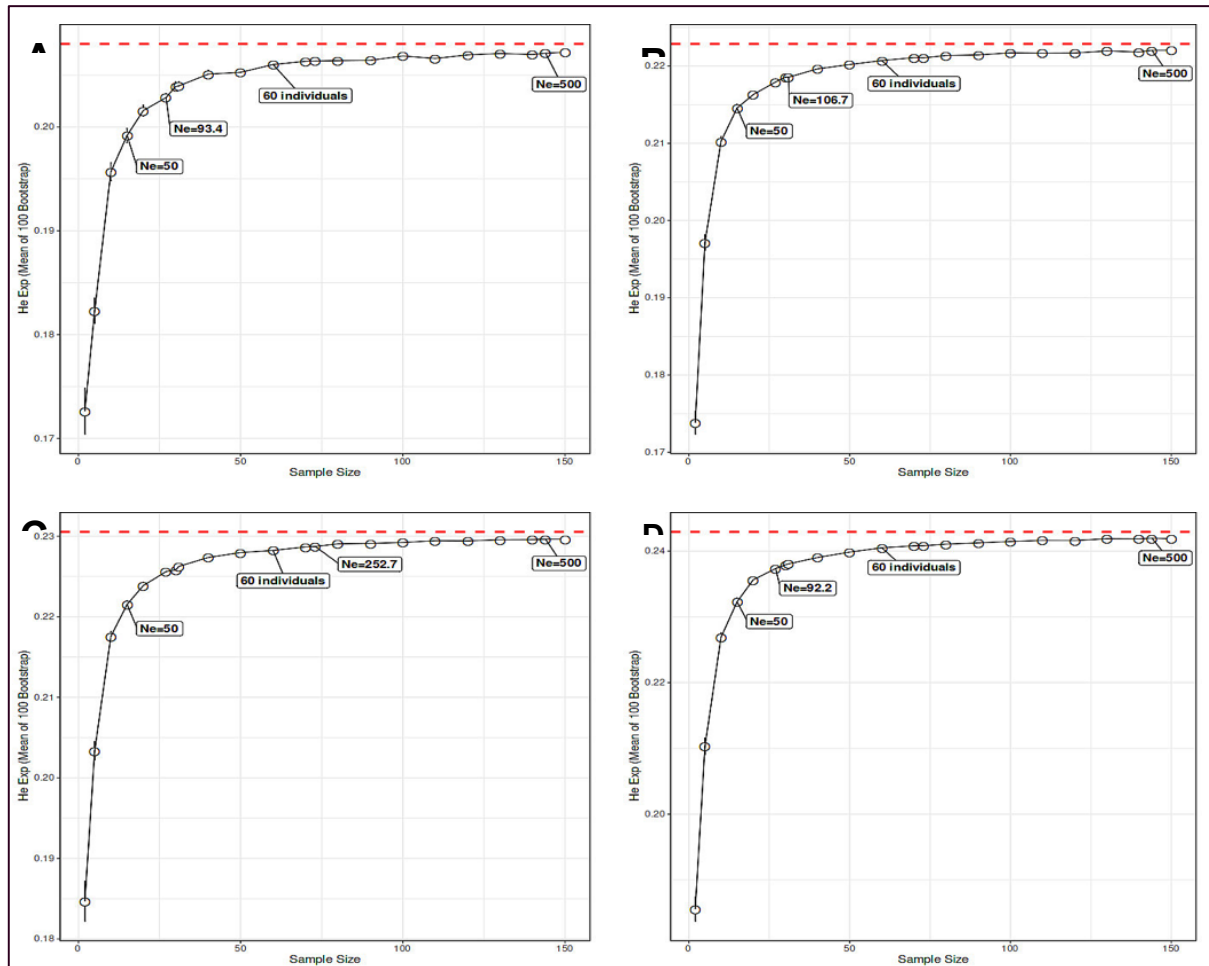
polimorfismo nucleotídeos (π), Tajima's D e tamanho efetivo populacional (N_e). Todas as estimativas são mostradas com seus intervalos de confiança de 95% (IC). Valores em negrito representam os valores significativos.

População	N	He [CI]	F [CI]	π [CI]	Tajima's D	Ne[CI]
Pop_A	47	0.24 [0.24/ 0.24]	0.02 [-0.008/0.05]	0.21 [0.20/0.21]	-0.02 [-0.05/ 0.09]	93.4 [92.3/94.5]
Pop_B	65	0.23 [0.23/ 0.23]	0.002 [-0.01/0.02]	0.22 [0.22/0.22]	-0.21 [-0.24/-0.10]	106.7 [105.9/107.5]
Pop_C	47	0.24 [0.24/0.25]	-0.02 [-0.04/-0.002]	0.23 [0.22/0.23]	-0.05 [-0.10/0.05]	252.7 [246.8/258.9]
Pop_D	118	0.24 [0.24/ 0.24]	0.06 [0.05/0.08]	0.24 [0.24/0.24]	-0.34 [-0.38/-0.23]	92.2 [91.8/92.5]

4.4. Banco ativo de germoplasma

Presumindo a coleta de 20 sementes por árvore, o método de Vencovsky indicou a amostragem de 15 plantas genitoras (matrizes) por população para alcançar o tamanho efetivo populacional (N_e) de 50. Para um N_e de 500, o método indicou a coleta de 144 matrizes por população. A randomização por população (Figura 5) mostrou que o valor de diversidade genética (H_e) atingiu o seu platô a partir de 60-70 matrizes para propagação para a Pop_A, (Figura 5A), 50-70 indivíduos para Pop_B (Figura 5B), 40-60 para Pop_C (Figura 5C) e 50-70 para Pop_D (Figura 5D). Dessa forma, a coleta de mais de 60 indivíduos por população traria pouco acréscimo à diversidade genética do BAG, especialmente se compararmos à amostragem de 144 plantas genitoras, que representaria o $N_e = 500$. Em resumo, um BAG constituído representantes de no mínimo 60 matrizes de cada população representaria a maior parte da diversidade genética da espécie, contemplando o $N_e > 50$ para a sobrevivência da espécie e uma diversidade genética comparada ao N_e de 500 pelo método de Vencovsky.

Figura 5 - Randomização para as 4 populações de *P. microphyllus*, mostrando que a diversidade genética (H_e) atingiu o seu platô a partir de 60-70 indivíduos amostrados para Pop_A (A); 50-70 indivíduos para Pop_B (B); 40-60 para Pop_C (C) e 50-70 para Pop_D (D).



Fonte: Os autores (2020)

5. DISCUSSÃO

Os resultados indicaram a presença de quatro populações espacialmente separadas para *P. microphyllus*, sugerindo a existência de fluxo mais restrito ao longo de sua área de ocorrência. A localização geográfica dos agrupamentos genéticos mostra que existe uma maior diferenciação genética (F_{st}) na pop_A. O padrão de estruturação pode ser explicado pelo fato da espécie ser polinizada por moscas e abelhas (Meliponinae) (SILVA *et al.*, 2000), os quais possuem como característica um curto raio de voo, pois o forrageamento ocorre principalmente a curtas distâncias (ARAÚJO *et al.*, 2004; ROUBIK; ALUJA, 1983). Dessa maneira, é possível que *P.*

microphyllus tenha a sua estruturação genética configurada no potencial de dispersão dos seus polinizadores. Por exemplo, um trabalho recente encontrou uma única população para *I. cavalcantei*, sugerindo que a estruturação encontrada seja provavelmente devido à sua polinização ser por beija-flores (LANES *et al.*, 2018), os quais possuem um raio de voo muito mais longo quando comparado ao realizado por insetos como moscas e abelhas.

Ao contrário do esperado, os valores de diversidade genética encontrados para o jaborandi foram altos. Por exemplo, a heterozigosidade e a diversidade nucleotídica foi maior em *P. microphyllus* do que em *Citrus reticulata*, *Citrus maxima* e *Citrus medica*, plantas nativas pertencentes à mesma família do jaborandi, *Rutaceae*, utilizando SNPs (GARCIA-LOR *et al.*, 2013). Os níveis de diversidade genética para o jaborandi foram geralmente mais altos ou semelhantes aos observados para outras espécies, *I. maurandioides* e *B. carajensis*, da região. Porém, quando comparado com *I. cavalcantei*, espécie ameaçada de extinção com ocorrência na região de Carajás, nossos valores se mostraram elevados (LANES *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020). Neste estudo, a endogamia foi levemente positiva em uma população de *P. microphyllus*, sugerindo que está ocorrendo algum nível de autopolinização (SILVA *et al.* 2000; PIRANI; DEVECCHI, 2018) ou acasalamento entre indivíduos aparentados (TURCHETTO *et al.*, 2016).

Nossos resultados de Tajima' D demonstraram valores não diferentes de zero nas populações A e C, indicando que as populações estão de acordo com o modelo neutro de mutação, ou seja, os tamanhos populacionais estão se mantendo constantes ao longo do tempo (TAJIMA, 1989). Além disso, os resultados também mostraram que a pop_D foi a que apresentou o menor valor negativo entre as populações, sugerindo uma possível expansão populacional recente, após um gargalo (TAJIMA, 1989; FU, 1997). Esse resultado pode ser consequência dessa população estar em locais onde há maior fluxo de pessoas, devido às atividades de mineração e de coleta das folhas do jaborandi realizadas pelos folheiros na região de Carajás desde 1986 (GUMIER-COSTA, 2012).

O tamanho efetivo populacional (N_e) nesse estudo variou entre 90 e 220 entre as populações e, foi menor que o encontrado para as espécies de *Ipomoea* na região de Carajás, sendo uma delas ameaçada de extinção (LANES *et al.*, 2018). Embora nossos valores sejam menores, Franklin (1980) sugere um N_e igual a 50 para

conservação a curto e médio prazo para prevenir a perda de alelos raros, enquanto Hoban et al. (2020a) recomendam que para reter o potencial adaptativo de espécies e populações um tamanho efetivo populacional maior que 500 é necessário.

O número mínimo de 60 matrizes amostradas para propagação por população está de acordo com outros trabalhos que sugeriram número similares, como entre 30-60 para espécies cultiváveis (MARSHALL; BROWN, 1975), 40-80 para espécies virtuais estruturadas em 4 populações como no Jaborandi (HOBAN, 2019), ou entre 30-200 para 11 espécies de 5 gêneros de angiospermas diferentes (HOBAN *et al.*, 2020b). Esse número de matrizes amostradas por população preservaria pelo menos uma cópia de 95% dos alelos de cada população. As próximas etapas desse projeto devem refinar o valor encontrado para o *P. microphyllus*, utilizando outras métricas de diversidade genética, a variação adaptativa, além da taxa de perda de sementes durante a germinação e morte dos indivíduos antes de chegar à idade reprodutiva. Essas taxas de perdas não foram consideradas aqui e podem reduzir a representatividade genética do BAG. Dessa forma, esses números devem ser interpretados como uma estimativa inicial e mínima para o número de sementes e de plantas para a criação do banco de germoplasma.

Os resultados obtidos nesse trabalho são importantes para o conhecimento da variabilidade genética do jaborandi na FLONA de Carajás e, servindo como base para o estabelecimento de estratégias que promovam a conservação da espécie. Estratégias de conservação poderiam minimizar a perda de diversidade genética conservando uma porção de cada uma das quatro populações (clusters genéticos) encontradas. Adicionalmente, a manutenção de um tamanho efetivo (N_e) acima de 50 em cada uma dessas populações irá prever a incidência de endogamia e os problemas associados a ela.

6. CONCLUSÕES

Os indivíduos de *P. microphyllus* da FLONA de Carajás estão estruturados geneticamente em quatro populações. A diversidade genética nessa espécie é similar a outras espécies da região, e maiores que outras espécies nativas pertencentes à mesma família (Rutaceae). Além disso, a baixa endogamia observada e o tamanho populacional efetivo (N_e) pequeno, porém acima do limiar de 50, indicam que não há risco de a espécie sofrer uma depressão endogâmica no curto prazo. Como medida

inicial para a implementação de um BAG para a espécie, sugerimos a coleta de ao menos 20 sementes viáveis de no mínimo 60 plantas genitoras (matrizes) tomadas aleatoriamente dentro de cada uma das 4 populações de *P. microphyllus* identificadas na FLONA de Carajás. Vale lembrar que, devido a natureza dos estudos para determinação da diversidade a ser mantida no BAG, o número de matrizes a serem propagadas de cada população pode ser ainda ajustado. Análises estão sendo realizadas para aprimorar a coleta de indivíduos que possam apresentar adaptações locais importantes para manutenção da espécie no longo prazo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Ilka N. *et al.* Metabolic alterations in different developmental stages of *Pilocarpus microphyllus*. **Planta medica**, v. 77, n. 03, p. 293-300, 2011.

ALBRECHT, Elena *et al.* Genetic diversity in *Capsicum baccatum* significantly influenced by its ecogeographical distribution. **BMC genetics**, v. 13, n. 1, p. 68, 2012.

ARAÚJO, E. D. *et al.* Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 3B, p. 563-568, 2004.

AVANCINI, Graziela *et al.* Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. **Phytochemistry**, v. 63, n. 2, p. 171-175, 2003.

BABA, Viviane Yumi *et al.* Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. **Genetic resources and crop evolution**, v. 63, n. 8, p. 1371-1381, 2016.

BANDEIRA, Ana Júlia; DEIMLING, Luis Irineu; GEORG-KRAEMER, Janaína Endres. Variabilidade genética do jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lemaire; Rutaceae) em populações naturais da região noroeste do Rio Grande do Sul. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, n. 8, 2010.

CALDEIRA, Cecilio Frois *et al.* Sustainability of Jaborandi in the eastern Brazilian Amazon. **Perspectives in ecology and conservation**, v. 15, n. 3, p. 161-171, 2017.

CALIL, Anaise Costa *et al.* Viabilidade de sementes armazenadas de frutos imaturos de jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lem.-RUTACEAE). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 14, n. 1, p. 63-66, 2008.

CAMPOS, J.C.; CASTILHO A.F. Uma visão geográfica da região da Flona de Carajás. In: MARTINS, F.D.; CASTILHO, A.F.; CAMPOS J.; HATANO, F.M.; ROLIM, S.G. (Org.). **Fauna da Floresta Nacional de Carajás**. São Paulo: Nitro Editorial. p.30-61, 2012.

CARVALHO, Carolina S. *et al.* Combining genotype, phenotype, and environmental data to delineate site-adjusted provenance strategies for ecological restoration. **Molecular Ecology Resources**, 2019.

CARVALHO, Carolina da Silva *et al.* **O papel da estrutura da paisagem na variabilidade genética da palmeira *Euterpe edulis* na Mata Atlântica**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 71pp.

CAYE, Kevin *et al.* TESS3: fast inference of spatial population structure and genome scans for selection. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 2, p. 540-548, 2016.

CORDEIRO, Erick MG *et al.* Diversity, genetic structure, and population genomics of the tropical tree *Centropomus tomentosus* in remnant and restored Atlantic forests. **Conservation Genetics**, v. 20, n. 5, p. 1073-1085, 2019.

CORRÊA, GUILHERME RESENDE. **Pedogênese em platôs de canga ferrífera e basaltos na Serra dos Carajás-PA**. 2011. Tese (Doutorado em solos e nutrição de plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

COSTA, F. G. **Extrativismo de jaborandi na região de Carajás: histórico, situação atual e perspectivas**. 2005. Monografia (Especialização em Gestão e Manejo Ambiental em Sistemas Florestais)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

CNCFlora. *Pilocarpus microphyllus* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Pilocarpusmicrophyllus>. Acesso em 28 junho 2020.

DANECEK, Petr *et al.* The variant call format and VCFtools. **Bioinformatics**, v. 27, n. 15, p. 2156-2158, 2011.

DE OLIVEIRA, Luiz; MARTINS, Ernane Ronie. A quantitative assessment of genetic erosion in ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 49, n. 6, p. 607-617, 2002.

DO, Chi *et al.* NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. **Molecular ecology resources**, v. 14, n. 1, p. 209-214, 2014.

FRANÇOIS, Olivier. Running structure-like population genetic analyses with R. **R tutorials in population genetics, U. Grenoble-Alpes**, p. 1-9, 2016.

FRANÇOIS, Olivier *et al.* Controlling false discoveries in genome scans for selection. **Molecular ecology**, v. 25, n. 2, p. 454-469, 2016.

FRANKHAM, Richard *et al.* **Genetic management of fragmented animal and plant populations**. Oxford University Press, 2017.

FRANKLIN, I.R. Evolutionary change in small populations.. In: Soule, M.E.; Wilcox, B.A. (eds), editor/s. **Conservation Biology - An evolutionary-ecological perspective**.. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, U.S.A.; 1980. 135-149.

FRANKLIN, I. R.; FRANKHAM, R. How large must populations be to retain evolutionary potential?. In: **Animal Conservation forum**. Cambridge University Press, 1998. p. 69-70.

FRANKLIN, Ian R.; ALLENDORF, Fred W.; JAMIESON, Ian G. The 50/500 rule is still valid—Reply to Frankham et al. **Biological Conservation**, n. 176, p. 284-285, 2014.

FRICHOT, Eric; FRANÇOIS, Olivier. LEA: An R package for landscape and ecological association studies. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 8, p. 925-929, 2015.

FU, Yun-Xin. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915-925, 1997.

GALETTO, Leonardo; BERNARDELLO, Gabriel. Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six Ipomoea species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. **Annals of botany**, v. 94, n. 2, p. 269-280, 2004.

GARCIA-LOR, Andres *et al.* A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. **Annals of botany**, v. 111, n. 1, p. 1-19, 2013.

GARZÓN-MARTÍNEZ, Gina A. *et al.* Genetic diversity and population structure in *Physalis peruviana* and related taxa based on InDels and SNPs derived from COSII and IRG markers. **Plant Gene**, v. 4, p. 29-37, 2015.

GODBOUT, Julie *et al.* Going with the flow: Intraspecific variation may act as a natural ally to counterbalance the impacts of global change for the riparian species *Populus deltoides*. **Evolutionary applications**, v. 13, n. 1, p. 176-194, 2020.

GRABHER, Cristina. A governança e a sustentabilidade do extrativismo do jaborandi na Amazônia e transição para o Cerrado e a Caatinga. 2015.

GUMIER-COSTA, Fabiano; SPERBER, Carlos Frankl. Atropelamentos de vertebrados na Floresta Nacional de Carajás, Pará, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 459-466, 2009.

GUMIER-COSTA, F.; JESUS, C. C. Levantamento de ocorrências de jaborandi, *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardl., no interior da Floresta Nacional de Carajás, Pará e sua relação com a mineração. In: Reunião anual da SBPC, 59, 2007, Belém.

GUMIER-COSTA, Fabiano. **Os folheiros do jaborandi: organização, parcerias e seu lugar no extrativismo amazônico**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) - Núcleo de Altos Estudos Amazônicos, UFPA, Belém, 2012.

HALL, Laurie A.; BEISSINGER, Steven R. A practical toolbox for design and analysis of landscape genetics studies. **Landscape Ecology**, v. 29, n. 9, p. 1487-1504, 2014.

HELYAR, S. J. *et al.* Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. **Molecular ecology resources**, v. 11, p. 123-136, 2011.

HOBAN, Sean *et al.* Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 Global Biodiversity Framework must be improved. **Biological Conservation**, v. 248, p. 108654, 2020a.

HOBAN, Sean *et al.* Taxonomic similarity does not predict necessary sample size for ex situ conservation: a comparison among five genera. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1926, p. 20200102, 2020b.

HOBAN, Sean. New guidance for ex situ gene conservation: Sampling realistic population systems and accounting for collection attrition. **Biological Conservation**, v. 235, p. 199-208, 2019.

HOLLIDAY, J. A. *et al.* Postglacial history of a widespread conifer produces inverse clines in selective neutrality tests. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 3857-3864, 2010.

HOMMA, Alfredo Kingo Oyama; DE MENEZES, A. J. E. A. (2014). **Extrativismo de folhas de jaborandi no município de Parauapebas, estado do Pará**. Embrapa Amazônia Oriental-Capítulo em livro científico (ALICE).

HARTL, Daniel L.; CLARK, Andrew G. **Princípios de Genética de Populações-4**. Artmed Editora, 2010.

IBAMA. **Plano de Manejo para Uso Múltiplo da Floresta Nacional de Carajás**. Brasília, DF, Brasil. 2004.

JOMBART, Thibaut *et al.* Package 'ade4'. Bioinforma. **Appl. Note**, v. 24, p. 1403-1405, 2008.

LAGE VIANA, Pedro *et al.* Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: história, área de estudos e metodologia. **Rodriguésia**, v. 67, n. 5, 2016.

LANES, Éder C. *et al.* Landscape genomic conservation assessment of a narrow-endemic and a widespread morning glory from Amazonian Savannas. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 532, 2018.

LOVEJOY, Thomas E.; NOBRE, Carlos. **Amazon tipping point: Last chance for action**. 2019.

MARTINELLI, Gustavo; MORAES, Miguel Avila. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 2013.

MARSHALL, D. R.; BROWN, A. H. D. **Optimum sampling strategies in genetic conservation**. 1975.

MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 3, p. 89-99, 2007.

MERCER, Juliane Rezende. **Estrutura genética de uma população selecionada e *Pinus taeda linnaeus***. 2011. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Federal do Pará, Curitiba, 2011.

MELO, A. T. O. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.(Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica**. 2012. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

MIAO, Y. C.; ZHANG, Z. J.; SU, J. R. Low genetic diversity in the endangered *Taxus yunnanensis* following a population bottleneck, a low effective population size and increased inbreeding. **Silvae Genetica**, v. 65, n. 1, p. 59-66, 2016.

MIGUEL, Laís Mourão. **Uso sustentável da biodiversidade na Amazônia Brasileira: experiências atuais e perspectivas das bioindústrias de cosméticos e fitoterápicos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Geografia humana) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARTINS, Helena et al. Identifying outlier loci in admixed and in continuous populations using ancestral population differentiation statistics. **Molecular ecology**, v. 25, n. 20, p. 5029-5042, 2016.

MORIN, Phillip A. et al. SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 19, n. 4, p. 208-216, 2004.

MOURA, E. F. **Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. 2003. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

MOURA, E. F. et al. Genetic diversity in a jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf.) germplasm bank assessed by RAPD markers. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2005.

MOTA, NF d O. et al. Amazon canga: the unique vegetation of Carajás revealed by the list of seed plants. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1435-88, 2018.

NATHAN, Ran et al. Mechanisms of long-distance seed dispersal. **Trends in ecology & evolution**, v. 23, n. 11, p. 638-647, 2008.

NOBRE, Carlos A. et al. Land-use and climate change risks in the Amazon and the

need of a novel sustainable development paradigm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 39, p. 10759-10768, 2016.

NUNES, J. A. Florística, estrutura e relações solo-vegetação em gradiente fitofisionômico sobre canga, na serra Sul, Flona de Carajás-Pará. **Universidade Federal de Viçosa, Viçosa**, v. 101, 2009.

NUNNEY, Leonard; CAMPBELL, Kathleen A. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 8, n. 7, p. 234-239, 1993.

OLFELT, Joel P.; FURNIER, Glenn R.; LUBY, James J. Reproduction and development of the endangered *Sedum integrifolium* ssp. *leedyi* (Crassulaceae). **American journal of botany**, v. 85, n. 3, p. 346-351, 1998.

OLIVEIRA, CSA *et al.* Fenologia e prospecção fitoquímica do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holmes). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 621-627, 2016.

PINHEIRO, Claudio Urbano B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 2, p. 141-150, 2002.

PINHEIRO, Claudio Urbano. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., rutaceae): a wild species. **Economic Botany**, v. 51, n. 1, p. 49-58, 1997.

PIRANI, J. R. *Pilocarpus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015 Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB876>.

PIRANI, José Rubens; DEVECCHI, Marcelo Fernando. Flora of the canga of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Rutaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 1, p. 209-217, 2018.

RIBEIRO, M. V. *et al.* Diversidade genética entre acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reis.) coletados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 443-451, 2010.

ROUBIK, David W.; ALUJA, Martin. Flight ranges of *Melipona* and *Trigona* in tropical forest. **Journal of the Kansas Entomological Society**, p. 217-222, 1983.

ROGSTAD, Steven H. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. **Taxon**, v. 41, n. 4, p. 701-708, 1992.

RUSSELLO, Michael A. *et al.* From promise to practice: pairing non-invasive sampling with genomics in conservation. **PeerJ**, v. 3, p. e1106, 2015.

SANDHU, Sardul Singh *et al.* Pilocarpine content and molecular diversity in Jaborandi. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 5, p. 478-482, 2006.

SEBBENN, Alexandre Magno; KAGEYAMA, Paulo Yoshio; VENCOSKY, Roland.

Conservação genética in situ e número de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L. **Scientia Forestalis**, v. 63, p. 13-22, 2003.

SILVA, Amanda R. *et al.* Range-wide neutral and adaptive genetic structure of an endemic herb from Amazonian Savannas. **AoB Plants**, v. 12, n. 1, p. plaa003, 2020.

SILVA, R. B. *et al.* Biologia Reprodutiva de *Pilocarpus microphyllus* (Stapf ex Wardlew) na Floresta Nacional dos Carajás. **67º Congresso Nacional de Botânica: Conectando diversidades, revelando o desconhecido**, 229–234. 2000.

SILVA, M. F. F. da. Análise florística da vegetação que cresce sobre canga hematítica em Carajás-Pará (Brasil). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica**, v. 7, n. 1, p. 79-105, 1991.

SOUZA, G. A.; MARTINS, E. R. Análise de risco de erosão genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu**, v. 6, n. 3, p. 42-47, 2004.

SOUZA-FILHO, Pedro Walfir M. *et al.* Four decades of land-cover, land-use and hydroclimatology changes in the Itacaiúnas River watershed, southeastern Amazon. **Journal of environmental management**, v. 167, p. 175-184, 2016.

SKORUPA, Ladislau A. New chromosome numbers in *Pilocarpus* vahl (RUTACEAE). **Acta Bot. Bras**, p. 11-24, 2000a.

SKORUPA, Ladislau A. Espécies de *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) da Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v. 30, n. 1, p. 59-59, 2000b.

SKORUPA, Ladislau Araújo; DE ASSIS, Marta Camargo; VIEIRA, Roberto Fontes. Coleta de germoplasma de Jaborandi (*Pilocarpus* spp.) e Ipecacuanha (*Osychoctria Ipecacuanha* (Brot.) Stokes). **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2005.

SMITH, ANNABEL L. *et al.* Global gene flow releases invasive plants from environmental constraints on genetic diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 8, p. 4218-4227, 2020.

TAJIMA, Fumio. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.

TEMPLETON, Alan R. **Population genetics and microevolutionary theory**. John Wiley & Sons, 2006.

TURCHETTO, C. *et al.* High levels of genetic diversity and population structure in an endemic and rare species: Implications for conservation. **AoB PLANTS**, v. 8, p. 1–17, 2016.

VIANA, Pedro Lage; LOMBARDI, Julio Antonio. Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na Serra da Calçada, Minas Gerais,

Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, n. 1, p. 157-177, 2007.

VIGNAL, Alain *et al.* A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.

WICHMANN, Matthias C. *et al.* Human-mediated dispersal of seeds over long distances. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1656, p. 523-532, 2009.

ANEXOS

Tabela S1- Número de indivíduos de cada área coletada que permaneceram na análise, após extração de DNA e quantificação em Qubit™ Assay.

Áreas de coleta	Nomes das áreas	Número de indivíduos
1	29-N	16
2	29-S	16
3	Alemão	16
4	Cari	16
5	Gelo	16
6	Grotão	16
7	Macapá	16
8	N1	9
9	N3	7
10	Porcao_6	12
11	Porcao_7	14
12	Porcao_8	14
13	Traquar	17
14	VP5-1	5
15	VP5-2	19
15	VP5-3	14
17	VP5-4	9
18	VP5-P1	11
19	VP5-P2	12
20	VP5-P3	12
21	VP5-P4	12