



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI  
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BOTÂNICA TROPICAL**

**AMANDA REIS DA SILVA**

**GENÔMICA DE POPULAÇÃO DE *Brasilianthus carajensis* (MELASTOMATACEAE)  
DAS CANGAS DA SERRA DOS CARAJÁS, PARÁ, BRASIL**

**BELÉM  
2018**

**AMANDA REIS DA SILVA**

**GENÔMICA DE POPULAÇÃO DE *Brasilianthus carajensis* (MELASTOMATACEAE)  
DAS CANGAS DA SERRA DOS CARAJÁS, PARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração Botânica Tropical, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Pedro Lage Viana

Co-orientador: Dr. Rodolfo Jaffé

**BELÉM**

**2018**

**AMANDA REIS DA SILVA**

**GENÔMICA DE POPULAÇÃO DE *Brasilianthus carajensis*  
(MELASTOMATACEAE) DAS CANGAS DA SERRA DOS CARAJÁS, PARÁ,  
BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração Botânica Tropical, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Pedro Lage Viana

Co-orientador: Dr. Rodolfo Jaffé

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Pedro Lage Viana – Orientador  
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI – MPEG

---

Dr. Alexandre Luis Padovan Aleixo – 1º Examinador  
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI – MPEG

---

Dr. André Olmos Simões – 2º Examinador  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

---

Dr. Diego Sotero de Barros Pinangé – 3º Examinador  
INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL – ITV-DS

---

Dr. Éder Cristian Malta de Lanes – Suplente  
INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL – ITV-DS

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) e Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) pela oportunidade de realização do curso de Pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável (ITV-DS) pela estrutura laboratorial e financiamento dos insumos de laboratório.

Ao meus pais por todo incentivo e apoio mesmo com todas as dificuldades.

Aos meus orientadores Pedro Viana e Rodolfo Jaffé pela ótima orientação, por toda paciência e confiança. Agradeço principalmente por aceitarem o desafio de continuar com nossa adorável planta problema. Aprendi com ambos muitas coisas que acrescentaram em minha vida profissional. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com vocês.

Ao chefe da FLONA Carajás Frederico Drummond pelo suporte na entrada das áreas e aos funcionários do ICMBio, Jayme Junior, Alysson de Souza e Rodrigo Borges pelo suporte nas coletas.

Aos meus colegas do grupo de genética da paisagem Éder Lanes (praticamente meu terceiro orientador), Waléria Monteiro e Jamille Veiga por todo companherismo, ajuda no laboratório e nos intermináveis scripts. Espero que nossa amizade vá muito além do trabalho, e seja mais longa que os nossos scripts do R e minhas extrações de *Brasilianthus*.

A todos que me ajudaram respondendo minhas dúvidas no laboratório, em especial ao Santelmo Vasconcelos pela enorme ajuda com protocolo de extração da minha planta problemática, e ao Manoel Lopes por ser o técnico de laboratório mais prestativo que já conheci.

Aos companheiros de coleta e fãs de Apocynaceae, Gessica Fernandes e André Simões pela paciência de me aguardar coletar tantas plantas, e os olhos treinados para achá-las junto comigo. Espero encontrá-los em mais coletas pelos ambientes dessa Amazônia.

À minha turma de mestrado, que apesar das minhas poucas idas ao MPEG, sempre foram ótimos amigos e me acompanharam nessa caminhada e todos que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho, fica aqui registrado meu agradecimento.

## **Lista de figuras**

Fig. 1: Mapa de cobertura de solo da área estudada mostrando o local de coleta das amostras (em rosa) dos indivíduos da espécie <i>B. carajensis</i> . À esquerda amostras coletadas em São Félix do Xingu e Ourilândia, e a direita as demais localidades.....	25
Fig. 2: Gráficos que mostram o número ótimo de clusters genéticos (k) para <i>B. carajensis</i> . A) Gráfico com base em erros de validação cruzada (Admixture); B) Gráfico com base na entropia cruzada (LEA).....	30
Fig. 3: Mapa mostrando a distribuição das amostras de <i>B. carajensis</i> a 3 clusters genéticos em um mapa de cobertura de solo. Os gráficos de pizza representam os coeficientes de ancestralidade determinados usando o pacote LEA. A - Serra de São Félix; B - Serra Arqueada; C - Serra Norte, Serra Sul, Serra da Bocaina e Serra do Tarzan.....	30
Fig. 4: Análise de coordenadas principais (PCA) para os 150 indivíduos de <i>B. carajensis</i> com o conjunto de 1.408 SNPs indicando a formação de 3 subgrupos. Pontos coloridos de acordo com as populações genéticas classificadas no programa LEA.....	31
Fig. 5: Análise de autocorrelação espacial de <i>B. carajensis</i> . A linha sólida preta é o LOESS ajustado para a relação observada, as regiões cinzas são limites de confiança de 95% em torno da expectativa nula (linha pontilhada preta). As linhas verticais curtas na parte inferior da figura é observado a distância entre os pares de indivíduos.....	32
Fig. 6: Diagrama de Venn que mostra a interseção de loci candidatos de <i>B. carajensis</i> .....	33

## RESUMO

A Serra dos Carajás é um complexo montanhoso constituído de rochas ferríferas com uma vegetação distinta de elevada riqueza de espécies, denominadas cangas. Essas rochas conferem à região o status de uma das maiores províncias minerais do mundo, e existem atividades de mineração neste ambiente. Mesmo que a mineração seja necessária atualmente, ela cria impactos ambientais significativos, que devem ser minimizados. Neste contexto, são necessários estudos que contribuam com a realização de planos de conservação e manejo dos organismos das cangas, principalmente devido a presença de várias espécies endêmicas e a canga ser diretamente afetada pela mineração. Nesse estudo utilizou-se marcadores genéticos SNPs (polimorfismos de um único nucleotídio) da espécie *Brasilianthus carajensis* (Melastomataceae), uma planta anual e endêmica comum nas áreas de canga e ao redor das minas na região de Carajás. A espécie seria um bom modelo para avaliar a influência das fragmentações antrópicas nos padrões de variação genética em plantas anuais da região. Foram examinadas variabilidade e estrutura genética, existência autocorrelação espacial e, por fim, se havia loci influenciados por seleção adaptativa. Foram obtidos 9.365 SNPs, e após a realização de filtragens (para selecionar SNPs neutrais e com qualidade de sequenciamento) 1.408 SNPs foram escolhidos para as análises. Os resultados apontaram baixa diversidade e 3 populações de *B. carajensis*, com endogamia significante em uma população. Também foi encontrada autocorrelação espacial significativa em até 13 km de distância entre os indivíduos amostrados. Por fim, foram encontrados 66 loci candidatos nos testes de associação ambiental (8 prováveis genes associados aos locos) e 130 loci candidatos nos escaneamentos do genoma (com 34 prováveis genes associados aos locos). Com o primeiro grupo de loci foram encontradas proteínas relacionadas com germinação, crescimento e desenvolvimento da planta associadas a precipitação e temperatura mínima. Para locos detectados por escaneamento genômico, foram encontradas proteínas relacionadas a interação com metais pesados em geral. Com base nesses resultados, conclui-se que os esforços de conservação devem ser orientados para preservar principalmente indivíduos da população distinta e não protegida pelo Parque Nacional dos Campos Ferruginosos. Além da estrutura genética, foram identificadas possíveis adaptações as áreas de cangas que podem contribuir para futuros programas de conservação e restauração.

**Palavras-chave:** SNPs. Loci Adaptativos. Mineração. Endemismo.

## ABSTRACT

Serra dos Carajás is a mountainous complex constituted of iron rocks that shelter a distinct vegetation with high species richness, called cangas. The presence of the iron rocks gives the region of the state of one of the largest mineral provinces in the world. Because of this, there are several mining activities associated with this environment. Even though mining is needed nowadays, it creates significant environmental impacts, which should be minimized. This scenario generates the need for studies that contribute to the accomplishment of plans of conservation and management of the organisms that live there, mainly due to the presence of several endemic species and canga be directly affected by mining. In this study was used a set of genetic markers SPNs (single nucleotide polymorphism) of the species *Brasilianthus carajensis*, a common annual and endemic plant in the canga areas and around the mines in the region of Carajás. The species would be ideal to evaluate the influence of anthropic fragmentation on the patterns of genetic variation in annual plants of the region. Patterns of variability and genetic structure were examined along the natural occurrence area of the species, was investigated the existence of spatial autocorrelation and, lastly, the presence of loci influenced by adaptive selection. 9,365 SNPs were obtained, and after filtering (to separate quality and neutral SNPs), 1,408 SNPs remained for the analyzes. Results indicated low diversity and the presence of 3 structured populations of *B. carajensis*, with significant inbreeding in only one population. Significant spatial autocorrelation was also found in up to 13 km distance between the sampled individuals. Lastly, 66 candidate loci were found in environmental association tests (8 probable genes associated with loci) and 130 candidate loci in genome scans (34 probable genes associated with loci). Proteins related to germination, plant growth and development were found associated with precipitation and minimum temperature. For locos detected by genomic scanning, proteins related to interaction with heavy metals in general were found. Based on these results, it is concluded that the conservation efforts should be oriented to preserve mainly individuals from the a distinct population and not protected by the Campos Ferruginosos National Park. In addition to the genetic structure, possible adaptations were identified for cangas areas that may contribute to future conservation and restoration programs.

**Keywords:** SNPs. Adaptative loci. Mining. Endemism.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....	8
1.1 Serra dos Carajás.....	8
1.2 Estudos em espécies de Melastomataceae.....	10
1.3 <i>Brasilianthus carajensis</i> .....	10
1.4 Genética de populações.....	12
REFERÊNCIAS.....	15
2 Genômica populacional de <i>Brasilianthus carajensis</i> .....	23
2.1 Introdução.....	23
2.2 Materiais e métodos.....	25
2.2.1 Amostragem e extração de DNA.....	25
2.2.2 Sequenciamento <i>NextRAD</i> e descoberta dos SNPs.....	26
2.2.3 Diversidade genética e estrutura de população.....	27
2.2.4 Identificação de prováveis loci adaptativos.....	28
2.3 Resultados.....	29
2.3.1 Genotipagem, diversidade genética e estrutura populacional.....	29
2.3.2 Identificação de prováveis loci adaptativos.....	32
2.4 Discussão.....	33
2.5 Conclusão.....	37
REFERÊNCIAS.....	37
APÊNDICE.....	45
ANEXOS.....	50

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

### 1.1 Serra dos Carajás

A Serra dos Carajás é um complexo montanhoso constituído de rochas ferríferas, localizado no sudeste do estado do Pará (SECCO; MESQUITA, 1983; SILVA, 1991). Nessas formações ferríferas, ocorre um mosaico de fitofisionomias: brejos, florestas de porte variado, feições rupestres arbustivas e de campos (CLEEF; SILVA, 1994; PORTO, M.; SILVA, 1989). Cada um desses ambientes apresenta um grupo de espécies característico (CLEEF; SILVA, 1994), devido a cada fitofisionomia ter relação com mudanças de relevo, substrato do solo e atributos geológicos (MARTINS et al., 2012). A formação vegetal predominante é a Floresta Ombrófila, entretanto essa vegetação tem sua continuidade interrompida por um distinto ambiente, exibido como ilhas de formações campestres ou arbustivas em meio a camada florestal (MARTINS et al., 2012). Essas ilhas provêm de uma densa carapaça laterítica formada de rochas ferríferas expostas há milhares de anos, que são chamadas de cangas (MOTA; SILVA; MARTINS et al., 2015). Basicamente as cangas se formam sobre jazidas minerais de ferro (SILVA et al., 1996), que são de grande interesse para exploração.

Dentre as jazidas de minério exploradas no Brasil, a localizada na Serra dos Carajás é uma das principais minas do país, que atendem parte substancial das exportações de ferro (QUARESMA, 2009). Esse setor é de grande importância na economia nacional devido a existência de diversas áreas de depósitos minerais em seu território (BARRETO, 2001). Entretanto, essa atividade gera grandes impactos ambientais (erosão do solo, mudança do relevo, remoção da flora e fauna local, etc.) (CÂMARA, 2002) que devem ser minimizados.

Em Carajás, a mineração causa evidente supressão vegetal em áreas de campos rupestres e florestas (MARTINS, 2015), alterando a riqueza e a abundância das espécies ali estabelecidas. Em 1998 com a criação da Floresta Nacional de Carajás (FLONA Carajás), ocorreu um estreitamento da relação entre produção mineral e proteção ambiental (MARTINS et al., 2012). A FLONA Carajás é uma importante unidade de conservação de uso sustentável que abrange uma área de 411.948,87 mil hectares (STCP, 2016). Dentre as fitofisionomias que essa unidade de conservação abrange, as cangas cobrem menos de 3% da área de conservação, mas são a formação vegetal mais diretamente afetada por processos de mineração dentro desta

UC (MOTA; SILVA; MARTINS et al., 2015). Sendo as atividades de mineração permitidas dentro da FLONA (ela é uma UC de uso sustentável), para contribuir com a preservação dos ambientes de canga foi criado o Parque Nacional dos Campo Ferruginosos (Decreto sem nº, de 5 de junho de 2017), que é uma unidade de conservação de proteção integral. Entretanto essa unidade de conservação abrange apenas duas serras com plátos de canga, a Serra da Bocaina e Serra do Tarzan (GIULIETTI; OLIVEIRA; JAFFÉ, 2017). Logo, são de extrema importância estudos sobre esses ambientes e os organismos que nela habitam, pois permitirão a realização de planos de conservação e manejo das mesmas.

As primeiras informações sobre a flora dessas ilhas de canga foram fornecidas pelo botânico do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Paulo Bezerra Cavalcante no início da década de 70 (MOTA; SILVA; MARTINS et al., 2015). Várias espécies novas e endêmicas foram descritas para o local (AUSTIN, 1981; BARROSO; KING, 1971; KING; ROBINSON, 1980), e a primeira lista de espécies de plantas da canga de Carajás foi publicada por Secco e Mesquita (1983). Com a realização de trabalhos posteriores (SILVA et al., 1986; PORTO ; SILVA, 1989) a lista de espécies foi ampliada por Silva (1991). Segundo Mota et al. (2015), a expressiva coleção da Serra dos Carajás depositada no acervo do herbário do Museu Goeldi gerou a idealização do projeto Flora Rupestre de Carajás. Este projeto resultou em publicações de floras regionais para alguns grupos taxonômicos específicos, restritos às famílias Fabaceae (SILVA, A. S. L., 1993), e a gêneros de gramíneas: *Axonopus* P. Beauv. (BASTOS, 1991) e *Ichnanthus* P. Beauv (BASTOS, 1993). No entanto, a maior parte da flora da Serra dos Carajás permanecia desconhecida (MOTA; SILVA; MARTINS et al., 2015).

Atualmente, pesquisas sobre a flora da Serra dos Carajás foram reiniciadas com o início do projeto “Flora das canga da Serra dos Carajás, Pará, Brasil”, fruto de uma parceira do Museu Paraense Emílio Goeldi e o Instituto Tecnológico Vale. Já foram publicadas monografias taxonômicas para 131 famílias de plantas que ocorrem nas cangas da região (VIANA et al., 2018; VIANA; GIULIETTI-HARLEY, 2016, 2017).

Para a família Melastomataceae esses estudos florísticos iniciais (SECCO; MESQUITA, 1983; SILVA, 1991) registraram poucas espécies, em sua maioria encontradas em áreas de canga, como os gêneros *Aciotis* D. Don., *Miconia* Ruiz & Pav. e *Tibouchina* Aubl. que são comumente encontradas em vegetação savanóide. Entretanto, com a retomada das

pesquisas sobre a flora da região, 42 espécies de Melastomataceae foram levantadas de 18 gêneros da família (ROCHA et al., 2017).

## 1.2 Estudos em espécies de Melastomataceae

Os estudos com espécies de Melastomataceae no Brasil em maior parte tratam-se de inventários florísticos, estudos taxonômicos, floras regionais e descrição de espécies novas (GOLDENBERG; BAUMGRATZ; SOUZA, 2012). Na Amazônia estudos ecológicos possuem maior destaque (e. g. TUOMISTO; RUOKOLAINEN, 1994; SCHULMAN et al., 2004; RAJANIEMI et al., 2005; RUOKOLAINEN et al., 2007). Trabalhos com abordagem genética foram realizados fora da Amazônia, como de filogeografia no Centro-Oeste (COLLEVATTI et al., 2012), genética de populações e desenvolvimento de microssatélites nas regiões Sul e Sudeste (BRITO et al., 2016; DIAS et al., 2017; LIMA et al., 2015; MAIA et al., 2016; PIL et al., 2012). Mesmo em outros países são poucos trabalhos de espécies de Melastomataceae com abordagem genética, sendo em maioria de caráter filogenético (CLAUSING; RENNER, 2001; MICHELANGELI, et al., 2004; MICHELANGELI, et al., 2013; ROUX, LE; WIECZOREK; MEYER, 2008) e genética de populações de espécies invasoras (DEWALT; HAMRICK, 2004; HARDESTY; METCALFE; WESTCOTT, 2011). Devido à ocorrência da família em vários ambientes (GOLDENBERG; BAUMGRATZ; SOUZA, 2012) e a grande diversidade de espécies (PENNEY, 2018), ainda existem lacunas no conhecimento sobre esse grupo, principalmente em termos de trabalhos genéticos.

Em Carajás os estudos com espécies de Melastomataceae se resumem a flora da região, que aponta duas espécies endêmicas, uma do gênero *Pleroma* D. Don (ROCHA et al., 2017) e outra de gênero monotípico, *Brasilianthus carajensis* Almeda & Michelangeli (ALMEDA; MICHELANGELI; VIANA, 2016).

## 1.3 *Brasilianthus carajensis*

*Brasilianthus carajensis* é uma espécie anual endêmica das cangas da Serra dos Carajás e presente na maioria dos platôs de cangas da região (MOTA; SILVA; MARTINS et al., 2015). Plantas anuais em ambientes extremos têm vantagens, pois seu ciclo de vida curto é completado rapidamente durante a estação mais favorável para seu desenvolvimento (SHREVE; WIGGINS, 1964). Esta espécie é uma pequena erva com flores tetrâmeras,

haplostêmones, com um hipanto tubuloso, anteras curtas com poro apical truncado amplo e apêndices estaminais ventrais bizaristados, fruto capsular e sementes subcocleadas (ALMEDA; MICHELANGELI; VIANA, 2016). Essa combinação única de caracteres são coerentes com os dados de sequência de DNA, que posicionam este gênero monoespecífico dentro da aliança *Marcketia* da tribo *Melastomeae*, como grupo irmão de *Nepsera aquatica* (Aubl.) Naudim (ALMEDA; MICHELANGELI; VIANA, 2016). Há poucas informações sobre a biologia da espécie. Não se conhece o espectro de polinizadores de *Brasilianthus* e não há informações se a espécie é auto-compatível, e como suas flores possuem anteras curtas com poros largos, não parecem ser polinizadas por abelhas que realizam vibração torácica (ALMEDA; MICHELANGELI; VIANA, 2016), que é típico para a maioria das espécies na família (RENNER, 1989). Almeda et al., (2016) sugerem que se a espécie é auto-compatível, estas anteras poderiam funcionar como reservatórios para água, que eventualmente atuariam na sua polinização. Uma vez que a floração coincide com a estação chuvosa, o estigma receptivo proporcionaria um alvo adequado para o pólen, que seria transportado por meio do respingo de água da chuva.

A espécie se encaixa na observação de Renner (1989), que espécimes de Melastomataceae de áreas savanoides em geral possuem frutos capsulares. Frutos tipo cápsula em Melastomataceae são frequentemente resistentes e persistem na planta mãe por muitos meses, durante os quais as sementes são gradualmente liberadas a medida que os frutos são sacudidos pelo vento (RENNER, 1989). Não se sabe sobre distâncias de dispersão das espécies dispersas pelo vento, entretanto, muitas disjunções marcantes observadas em *Sandemania hoehnei* (Cogn.) Wurdack, uma espécie de Melastomataceae ocorrente em savanas da planície Amazônica, sugere um boa capacidade de dispersão (RENNER, 1987).

Como pouco se sabe sobre a ecologia de *Brasilianthus* (capacidade de dispersão de sementes e polén) e considerando que várias populações não estão efetivamente protegidas (ALMEDA; MICHELANGELI; VIANA, 2016), são necessários estudos que contribuam para a conservação da espécie. Estudos moleculares são fundamentais para avaliar o estado de conservação de espécies. Eles geram informações da composição genética de uma espécie (variação e estrutura populacional) que para planos de manejo e conservação são fundamentais (GALETTI JR et al., 2008).

## 1.4 Genética de populações

O estudo de genética de populações foca em analisar a composição genética de populações e mudanças na variação genética que ocorrem devido a processos de mutação, seleção, fluxo gênico e deriva (BALKENHOL et al., 2016). É reconhecido que fatores genéticos são de fundamental importância para o sucesso de estratégias de conservação (FRANKEL, 1974), já que variação genética é tida como o nível mais básico da diversidade biológica por ser geradora de variabilidade de espécies, populações e ecossistemas. Sendo assim, diversidade genética é de extrema importância para a adaptação, viabilidade e sobrevivência de indivíduos de uma população, permitindo que a espécie se adeque a mudanças ambientais (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Muitas variações genéticas são derivadas de mutações, que são mudanças na sequência de DNA ou cromossomo na transmissão de informações genéticas de pais para progêneres (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Essas variações podem ser observadas em diferentes locais no genoma, que podem estar sobre pressão de seleção (loci adaptativos ou não-neutrais) ou locais que não sofrem pressão de seleção (loci neutrais) (BALKENHOL et al., 2016). A seleção se resume na contribuição diferencial dos genótipos para a próxima geração devido a diferenças de sobrevivência e reprodução (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013). Essas variações genéticas encontradas dentro de um indivíduo, uma população ou área é o que gera a diversidade genética (BALKENHOL et al., 2016).

Para avaliar a diversidade genética, é necessário identificar a frequência de diferentes alelos ou genótipos que segregam dentro das populações de uma espécie. Por meio desta informação, podemos estimar valores que auxiliam a quantificar a diversidade genética, como a diversidade alélica, heterozigozidade, diversidade nucleotídica, entre outros (FREELAND; PETERSEN; KIRK, 2011). Além da diversidade genética, o fluxo genético e a estruturação genética espacial das populações são parâmetros importantes para caracterizar as populações de uma espécie, e assim determinar áreas prioritárias para conservação. Cada um destes parâmetros possui seus componentes que auxiliam nessa avaliação (MELO, 2012).

Fluxo gênico seria os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para outra, ocorrendo devido de migração que é dada por dispersão e subsequente reprodução (WRIGHT, 1931). Em populações onde o fluxo gênico é reduzido ou não ocorre,

a diversidade genética é reduzida, resultando em um aumento na deriva genética e maior estruturação das populações (FREELAND; PETERSEN; KIRK, 2011). A deriva genética é um processo que muda as frequências dos alelos de uma população ao acaso, podendo acarretar na fixação de alguns alelos e perda de outros, que reduz a riqueza alélica (FREELAND; PETERSEN; KIRK, 2011). Uma distribuição desigual de alelos entre as populações geram grande estruturação populacional que seria uma alta variação da diversidade genética entre as populações de uma espécie. Além disso, populações isoladas apresentam elevada endogamia, que levam a uma população homogênea geneticamente. Esses fatores podem levar uma população a extinção (BALKENHOL et al., 2016).

Em plantas vasculares os meios que promovem o fluxo gênico são mais complexos do que em animais, pois não ocorrem apenas por dispersão e reprodução de um indivíduo. Em angiospermas há dois processos principais: dispersão de embriões diplóides em sementes e gametas haplóides masculinos no pólen (HOLDEREGGER et al., 2010). Além disso, o deslocamento de sementes e pólen depende de vetores de dispersão que podem ser bióticos (animais dispersores de sementes e polinizadores) ou abióticos (vento, água) (HOWE; WESTLEY, 1996). Com isso, é o movimento do animal ou do fator abiótico que direciona o fluxo gênico, e por sua vez promove a conectividade entre as populações de uma determinada espécie (HOLDEREGGER et al., 2010).

Para quantificar esses parâmetros, existem diferentes marcadores genéticos usados nos estudos de genética de população. Um tipo de marcador que vem ganhando popularidade são os SNPs (polimorfismos de nucleotídeos únicos). SNPs referem-se a posições de pares de bases simples ao longo de uma sequência de DNA que variam entre os indivíduos. Em maioria, os SNPs possuem apenas dois estados alternativos (cada indivíduo possui um dos dois nucleotídeos possíveis em um dado loco SNP), referidos então como marcadores bialélicos. Esses locais polimórficos individuais devem ser identificados antes de serem classificados como SNPs. Então, conhecendo os loci que são variáveis, eles são utilizados para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (FREELAND; PETERSEN; KIRK, 2011). O uso de SNPs como marcadores moleculares tem crescido devido seu potencial de maior eficiência de genotipagem, simplicidade analítica, cobertura genômica mais ampla e dados de maior qualidade do que os microsatélites ou mtDNA (MORIN; LUIKART; WAYNE, 2004).

No presente trabalho foi usado marcadores SPNs para o estudo da diversidade genética e estruturação populacional de *Brasilianthus carajensis*. O estudo visou contribuir com informações para o planejamento de conservação e manejo da espécie e do ambiente de canga, já que por ser uma planta anual, ela seria uma boa indicadora do impacto de mudanças recentes no ambiente por causa de seu tempo de geração curto. Devido ao fato de todas as cangas serem circundadas por florestas densas e a espécie ser uma pequena planta herbácea endêmica com aparente dispersão limitada (sem características morfológicas para dispersão de sementes a longas distâncias e polinizador desconhecido) e especializada para as condições extremas das cangas, é esperado: baixa diversidade genética (tamanho efetivo populacional pequeno, valores de heterozigosidade e diversidade nucleotídica baixos), populações diferenciadas em cada bloco de canga (baixo fluxo gênico entre cangas) e loci com sinais adaptativos.

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de um artigo: Genômica populacional de *Brasilianthus carajensis* (Capítulo 2). O artigo está formatado conforme as normas solicitadas pela Revista *Conservation Genetics*, à qual será submetido, cuja escrita ainda em português, a ser traduzida posteriormente. A norma da revista está anexada neste manuscrito (Anexo I). A numeração de página segue a formatação das normas de apresentação de dissertação estabelecida pela UFRA.

## REFERÊNCIAS

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G.;AITKEN, S. N. **Conservation and the genetics of population.** 2 ed. Wiley Blackwell, 2013. 630 p. ISBN: 9780470671467.

ALMEDA, F.; MICHELANGELI, F. A.; VIANA, P. L. **Brasilianthus (Melastomataceae), a new monotypic genus endemic to ironstone outcrops in the Brazilian Amazon.** *Phytotaxa*, v. 273, nº 4, p. 269–282, 2016. ISSN: 11793163, DOI: 10.11646/phytotaxa.273.4.3.

AUSTIN, D. F. **Novidades nas Convolvulaceae da flora amazonica.** *Acta Amazonica*, v. 11, nº 2, p. 291–295, 1981.

BALKENHOL, N. et al. **Landscape Genetics: concepts, methods, applications.** *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015.* Wiley Blackwell, 2016. v. 1, 264 p. ISBN: 9788578110796, ISSN: 1098-6596, DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

BARRETO, M. L. **Mineração e Desenvolvimento Sustentável: Desafios para o Brasil.** Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2001. 203 p. ISBN: 8572271600.

BARROSO, G. M.; KING, R. M. **New Taxa of Compositae (Eupatorieae) from Brazil.** *Brittonia*, v. 23, nº 2, p. 118–121, 1971. ISSN: 0007196X, DOI: 10.2307/2805427.

BASTOS, M. N. C. **A flora “rupestre” da Serra de Carajás (Gramineae): II gênero Axonopus P. Beauv.** *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi. Série Botânica*, [s.l.], v. 7, p. 473–483, 1991.

BASTOS, M. N. C. **A flora “rupestre” da Serra de Carajás (Gramineae): III gênero Ichnanthus Beauv.** *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi. Série Botânica*, v. 9, p. 279–293, 1993.

BRITO, V. L. G. et al. **Genetic structure and diversity of populations of polyploid Tibouchina pulchra Cogn. (Melastomataceae) under different environmental conditions**

**in extremes of an elevational gradient.** *Tree Genetics and Genomes*, v. 12, nº 6, 2016. ISSN: 16142950, DOI: 10.1007/s11295-016-1059-y.

**CÂMARA, J. B. D. GEO BRASIL 2002: Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil.** In: *Edições IBAMA*. Brasília, 2002. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/site\\_cnia/geo\\_brasil\\_2002.pdf](http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/site_cnia/geo_brasil_2002.pdf)>. ISBN: 85 - 7300 - 144 - 5.

**CLAUSING, G.; RENNER, S. S. Molecular phylogenetics of melastomataceae and memecylaceae: Implications for character evolution.** *American Journal of Botany*, v. 88, nº 3, p. 486–498, 2001. ISBN: 0002-9122, ISSN: 00029122, DOI: 10.2307/2657114.

**CLEEF, A.; SILVA, M. F. F. Da. Plant Communities of the Serra dos Carajás (Pará), Brazil.** *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica*, v. 10, nº 2, p. 269–281, 1994.

**COLLEVATTI, R. G. et al. Phylogeography of tibouchina papyrus (Pohl) toledo (Melastomataceae), an endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the pleistocene.** *Ecology and Evolution*, v. 2, nº 5, p. 1024–1035, 2012. ISBN: 2045-7758, ISSN: 20457758, DOI: 10.1002/ece3.236.

**DEWALT, S. J.; HAMRICK, J. L. Genetic variation of introduced Hawaiian and native Costa Rican populations of an invasive tropical shrub, Clidemia hirta (Melastomataceae).** *American Journal of Botany*, v. 91, nº 8, p. 1155–1162, 2004. ISBN: 0002-9122, ISSN: 00029122, DOI: 10.3732/ajb.91.8.1155.

**DIAS, A. C. C. et al. Unexpectedly high genetic diversity and divergence among populations of the apomictic Neotropical tree Miconia albicans.** *Plant Biology*, p. 1–8, 2017. ISSN: 14388677, DOI: 10.1111/plb.12654.

**FRANKEL, O. H. Genetic conservation: our evolutionary responsibility.** *Genetics*, v. 78, nº 1, p. 53–65, 1974. ISBN: 0016-6731, ISSN: 00166731, DOI: Genetic Considerations in Ecological Restoration.

FREELAND, J.; PETERSEN, S. D.; KIRK, H. **Molecular ecology**. 2 ed. John Wiley & Sons Ltd., 2011.

GALETTI JR, P. M. et al. **Genética da conservação na biodiversidade brasileira**. In: FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., BRISCOE, D. . (Org.). *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto, SP: Editora SBG, 2008. p. 244–274.

GIULIETTI, A. M.; OLIVEIRA, G.; JAFFÉ, R. **O fim desta viagem**. In: ZAPPI, D. C. (Org.). *Paisagens e Plantas de Carajás*. 1 ed. ed. Belém, PA: Instituto Tecnológico Vale (ITV), 2017. p. 223–231. ISBN: 978-85-94365-00-2.

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; SOUZA, M. L. D. R. **Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros**. *Rodriguesia*, v. 63, nº 1, p. 145–161, 2012. ISSN: 03706583, DOI: 10.1590/S2175-78602012000100011.

HARDESTY, B. D.; METCALFE, S. S.; WESTCOTT, D. A. **Persistence and spread in a new landscape: Dispersal ecology and genetics of Miconia invasions in Australia**. *Acta Oecologica*, v. 37, nº 6, p. 657–665, 2011. ISBN: 1146-609X, ISSN: 1146609X, DOI: 10.1016/j.actao.2011.06.006.

HOLDEREGGER, R. et al. **Landscape genetics of plants**. *Trends in Plant Science*, v. 15, nº 12, p. 675–683, 2010. ISBN: 1360-1385.

HOWE, H. F.; WESTLEY, L. C. **Ecology of Pollination and Seed Dispersal**. In: CRAWLEY, M. J. (Org.). *Plant Ecology*. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 1996. p. 717. ISBN: 354020833X, DOI: 10.1016/B978-0-444-63524-2.00015-4.

KING, R. M.; ROBINSON, H. **Studies in the Eupatorieae (Asteraceae). CXCIV. A new genus Parapiqueria**. *Phytologia*, v. 47, nº 2, p. 110–112, 1980.

LIMA, J. de S. et al. **Fine-scale genetic structure in Tibouchina papyrus (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endemic and habitat-restricted species from Central Brazil.** *Plant Systematics and Evolution*, v. 301, nº 4, p. 1207–1213, 2015. ISBN: 0378-2697, ISSN: 16156110, DOI: 10.1007/s00606-014-1144-3.

MAIA, F. R. et al. **Development and characterization of microsatellite markers for Tibouchina hatschbachii (Melastomataceae), an endemic and habitat- restricted shrub from Brazil.** *Acta Scientiarum*, v. 38, nº 3, p. 327–332, 2016. DOI: <http://oj10.4025/actascibiolsci.v38i3.31496>.

MARTINS, Frederico D. et al. **Fauna da Floresta Nacional de Carajás: Estudos sobre vertebrados terrestres.** In: ROSA, J. M.; NASCIMENTO, H. (Orgs.). *Livro*. São Paulo: Nitro Editorial, 2012. 119 p. ISBN: 978-62658-05-017.

MARTINS, Frederico Drumond. **O Conflito de Carajás: Cenários para a conservação da savana metalófila.** 75 p. - Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

MELO, A. T. de O. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de Cabralea cajerana (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica.** - Universidade Federal de Goiás, 2012.

MICHELANGELI, Fabian A. et al. **A preliminary phylogeny of the tribe Miconieae (Melastomataceae) based on nrITS sequence data and its implications on inflorescence position.** *Taxon*, v. 53, nº 2, p. 279–290, 2004. ISBN: 0040-0262, ISSN: 00400262, DOI: 10.2307/4135608.

MICHELANGELI, Fabián A. et al. **Phylogenetic relationships and distribution of New World Melastomeae (Melastomataceae).** *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 171, nº 1, p. 38–60, 2013. ISBN: 1095-8339, ISSN: 10958339, DOI: 10.1111/j.1095-8339.2012.01295.x.

MAIA, F. R. et al. **Development and characterization of microsatellite markers for Tibouchina hatschbachii (Melastomataceae), an endemic and habitat- restricted shrub**

**from Brazil.** *Acta Scientiarum*, v. 38, nº 3, p. 327–332, 2016. DOI: <http://oj10.4025/actascibiolsci.v38i3.31496>.

MOTA, N. F. de O. et al. **Vegetação sobre sistemas ferruginosos da Serra dos Carajás**. In: CARMO, F. F.; KAMINO, L. H. Y. (Orgs.). *Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais*. Belo Horizonte: 3i Editora, 2015. p. 289–315. ISBN: 978-85-66115-48-2.

PENNEYS, D. S. **Melastomataceae of the world**. *A website of information about the Melastomataceae*. 2018. Disponível em: <[melastomes.com](http://melastomes.com)>. Acesso em: 19/jan./18.

PIL, M. W. et al. **Testing hypotheses for morphological differences among populations of Miconia sellowiana (Melastomataceae) in southern Brazil**. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 34, nº 1, p. 85–90, 2012. ISSN: 1807-863X, DOI: [10.4025/actascibiolsci.v34i1.7580](http://oj10.4025/actascibiolsci.v34i1.7580).

PORTE, M. L.; SILVA, M. F. F. Da. **Tipos de vegetação metalófita em áreas da Serra do Carajás e Minas Gerais, Brasil**. *Acta Botanica Brasilica*, v. 3, nº 2, 1989.

PORTE, M.; SILVA, M. **Tipos de vegetação metalófila em áreas da Serra de Carajás e de Minas Gerais, Brasil**. *Acta Botanica Brasilica*, v. 3, nº 2, p. 13–21, 1989.

QUARESMA, L. F. **Projeto de assistência técnica ao setor de energia - Perfil da Mineração de Ferro**. In: *Ministério de Minas - MME*. 2009. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/documents/1138775/1256650/P09\\_RT18\\_Perfil\\_da\\_Mineraxo\\_de\\_Ferro.pdf/e9ef3b57-cdbd-4166-b39d-f0f26f28e3ca](http://www.mme.gov.br/documents/1138775/1256650/P09_RT18_Perfil_da_Mineraxo_de_Ferro.pdf/e9ef3b57-cdbd-4166-b39d-f0f26f28e3ca)>. ISBN: 3337225100015.

RAJANIEMI, S. et al. **Estimating and mapping pteridophyte and Melastomataceae species richness in western Amazonian rainforests**. *International Journal of Remote Sensing*, v. 26, nº 3, p. 475–493, 2005. ISBN: 0143-1161, ISSN: 01431161, DOI: [10.1080/01431160512331316405](https://doi.org/10.1080/01431160512331316405).

RENNER, S. S. **Sandemania Hoehnei (Melastomataceae: Tibouchineae): Taxonomy, Distribution, and Biology.** *Brittonia*, v. 39, n° 4, p. 441–446, 1987. ISSN: 0007196X, DOI: 10.2307/2807327.

RENNER, S. S. A. **Annals of the Missouri Botanical Garden.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 76, n° 2, p. 496–518, 1989.

ROCHA, K. C. de J. et al. **Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Melastomataceae.** *Rodriguesia*, v. 68, n° 3, p. 997–1034, 2017. ISBN: 2175-7860 UL - [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2175-78602016000501301&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602016000501301&nrm=iso), ISSN: 21757860, DOI: 10.1590/2175-7860201768315.

ROUX, J. J. LE; WIECZOREK, A. M.; MEYER, J.-Y. **Genetic diversity and structure of the invasive tree Miconia calvescens in Pacific islands.** *Diversity and Distributions*, v. 14, n° 6, p. 935–948, 2008. ISBN: 1366-9516, ISSN: 13669516, DOI: 10.1111/j.1472-4642.2008.00504.x.

RUOKOLAINEN, K. et al. **Are floristic and edaphic patterns in Amazonian rain forests congruent for trees, pteridophytes and Melastomataceae?** *Journal of Tropical Ecology*, v. 23, n° 1, p. 13–25, 2007. ISBN: 0266-4674 1469-7831, ISSN: 02664674, DOI: 10.1017/S0266467406003889.

SCHULMAN, L.; KOIVUNEN, H.; RUOKOLAINEN, K. **Spatio-Ecological Niche Segregation of Two Sympatric Species of Clidemia (Melastomataceae) in Western Amazonian Non-Flooded Rainforests.** *Folia Geobotanica*, v. 39, p. 143–160, 2004. ISBN: 0015-5551, ISSN: 1211-9520, DOI: 10.1007/BF02805243.

SECCO, RICARDO DE S.; MESQUITA, ANTÔNIO L. **Notas sobre a vegetação de canga da Serra Norte – I.** Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Nova Série; Botânica, v. 59, p. 1–13, 1983.

SHREVE, F.; WIGGINS, I. L. **Ephemeral Herbaceous Vegetation.** *Vegetation and Flora of the Sonoran Desert.* California: Stanford University Press, 1964.

SILVA, A. S. L. **A flora “rupestre” de Carajás – Fabaceae.** *Boletim Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica*, v. 9, nº 1, p. 3–30, 1993.

SILVA, M. F. F.; ROSA, N. A.; SALOMÃO, R. P. **Estudos botânicos na área do projeto Ferro Carajás: Aspectos florísticos da mata do aeroporto de Serra Norte-Pa.** *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica*, v. 2(2), nº 2, p. 169–187, 1986.

SILVA, M. F. F. **Análise florística da vegetação que cresce sobre canga hematítica em Carajás - Pará (Brasil).** *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica*, v. 7, nº 1, p. 79–106, 1991.

STCP, E. D. P. L. **Plano De Manejo Da Floresta Nacional De Carajás : Volume I-Diagnóstico.** In: *Ministério do Meio Ambiente - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.* Brasília, 2016.

TUOMISTO, H.; RUOKOLAINEN, K. **Distribution of Pteridophyta and Melastomataceae along an Edaphic Gradient in an Amazonian Rain Forest.** *Journal of Vegetation Science*, v. 5, nº 1, p. 25–34, 1994. ISBN: 11009233, ISSN: 1100-9233, DOI: 10.2307/3235634.

VIANA, P. L. et al. **Serra Carajás (Fascículo 3).** *Rodriguesia*, v. 69, nº 1, 2018.

VIANA, P. L.; GIULIETTI-HARLEY, A. M. **Serra dos Carajás (Fascículo 1).** *Rodriguesia*, v. 67, nº 5, p. 1107–1503, 2016.

VIANA, P. L.; GIULIETTI-HARLEY, A. M. **Serra dos Carajás (Fascículo 2).** *Rodriguesia*, [s.l.], v. 68, nº 3, p. 797–1164, 2017.

WRIGHT, S. **Evolution in mendelian populations.** *Genetics*, [s.l.], v. 16, nº 97, p. 97–159, 1931. ISBN: 0016-6731 (Print) 0016-6731 (Linking), ISSN: 00928240, DOI: 10.1007/BF02459575.

## 2 Genômica populacional de *Brasilianthus carajensis*

Amanda R. Silva<sup>1</sup>, Eder C. Lanes<sup>2</sup>, Rodolfo Jaffé<sup>2</sup>, Pedro L. Viana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia/Museu Paraense Emílio Goeldi, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Botânica Tropical, Av. Perimetral 1901, Terra Firme, 66077-530, Belém-PA, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico Vale, Rua Boaventura da Silva 955, 66055-090 Belém-PA, Brazil.

### 2.1 Introdução

A Serra dos Carajás é um complexo montanhoso constituído de rochas ferríferas localizado na região sudoeste da Amazônia, Pará (Secco; Mesquita, 1983; Silva, 1991). Esses afloramentos ferríferos abrigam uma vegetação distinta com elevada riqueza de espécies, que são denominadas de cangas (Mota et al. 2015). Devido as condições extremas das cangas (solos ácidos, rasos, pouco férteis e com elevadas temperaturas na superfície) muitas espécies são especializadas para esse ambiente (Silva, 1991), refletindo a presença de muitas plantas endêmicas (e. g. Salas et al., 2015; Cavalcanti et al., 2016; Mota; Wanderley, 2016; Nunes et al., 2017). A riqueza de rochas ferríferas confere à região da Serra dos Carajás o status de uma das maiores províncias minerais do mundo (Santos 1986), onde existem diversas atividades de mineração associadas a esse ambiente (Martins et al. 2012). Apesar desse tipo de atividade ser indispensável na atualidade (Ribeiro et al. 2006), a mineração gera significativos impactos ambientais (erosão do solo, poluição de corpos d'água e solo com rejeitos, modificação do ambiente natural, etc.)(Ernst 1988). Logo, é de extrema importância estudos sobre esses ambientes e os organismos endêmicos que nele habitam, visando subsidiar a realização de planos de conservação e manejo das espécies.

Dentre as espécies endêmicas das cangas da Serra dos Carajás, *Brasilianthus carajensis* Almeda & Michelangeli (Melastomataceae) se destaca por ser um gênero monoespecífico presente na maioria dos platôs de cangas da região (Mota et al. 2015). *B. carajensis* caracteriza-se por ser uma pequena erva anual com flores tetrâmeras, haplostêmones, com um hipanto tubuloso, anteras curtas com poro apical truncado amplo e apêndices estaminais ventrais biaristados, fruto capsular e sementes subcocleadas (Almeda et al. 2016). Sendo *Brasilianthus* uma planta endêmica e anual (responde rapidamente à mudanças recentes

da paisagem devido seu tempo de geração curto) comum em áreas ao redor das minas, a espécie seria ideal para avaliar a influência das fragmentações antrópicas nos padrões de variação genética em plantas anuais da região.

A fragmentação do habitat reduz o tamanho e aumenta o isolamento espacial das populações de plantas (Young et al. 1996). Populações isoladas e pequenas têm a redução da diversidade genética e se tornam cada vez mais diferenciadas devido a efeitos fundadores no momento da fragmentação, aumento da deriva genética aleatória, aumento de endogamia e redução do fluxo genético entre as interpopulações (Templeton et al., 1990; Ledig, 1992).

Neste estudo foi usado um conjunto de marcadores SNPs para acessar diversidade genética e estruturação populacional de *Brasilianthus carajensis*. Essa técnica de genotipagem é a mais útil para obter informações de diversidade genética e análise da estrutura da população (Frascaroli et al. 2013). SNPs (*single nucleotide polymorphism*) são polimorfismos de um único nucleotídio, provindos da variação de apenas uma base em uma sequência de DNA. Conhecendo os loci com os SNPs que são variáveis, eles são utilizados para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (Freeland et al. 2011).

Na maioria dos organismos os SNPs são densos em todo o genoma, e além de presentes em regiões neutrais, são comumente observados próximos a genes funcionais, tornando-os marcadores ideais também para estudar variação molecular adaptativa (Narum; Hess, 2011). Se as sequências de fragmentos com variação molecular adaptativa forem homólogas a genes de funcionalidade conhecida, é possível identificar quais genes possuem maior relevância adaptativa na espécie estudada (Holderegger et al. 2008). Este tipo de conhecimento pode ajudar a compreender os tipos de especificidades que o ambiente de canga confere a espécie estudada.

Esses dados trarão novas informações sobre *B. carajensis* que contribuirão no planejamento de conservação e manejo da mesma e do ambiente de canga. Devido à aparente dispersão limitada da espécie, inferida pela ausência de características morfológicas para dispersão de sementes e pólen a longas distâncias e seu endemismo na região (Almeda et al. 2016), é suposto que sejam encontradas as seguintes premissas: (1) Heterozigosidade e diversidade nucleotídica das populações baixas, com um pequeno tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ); (2) Marcada estruturação dos indivíduos, gerando populações

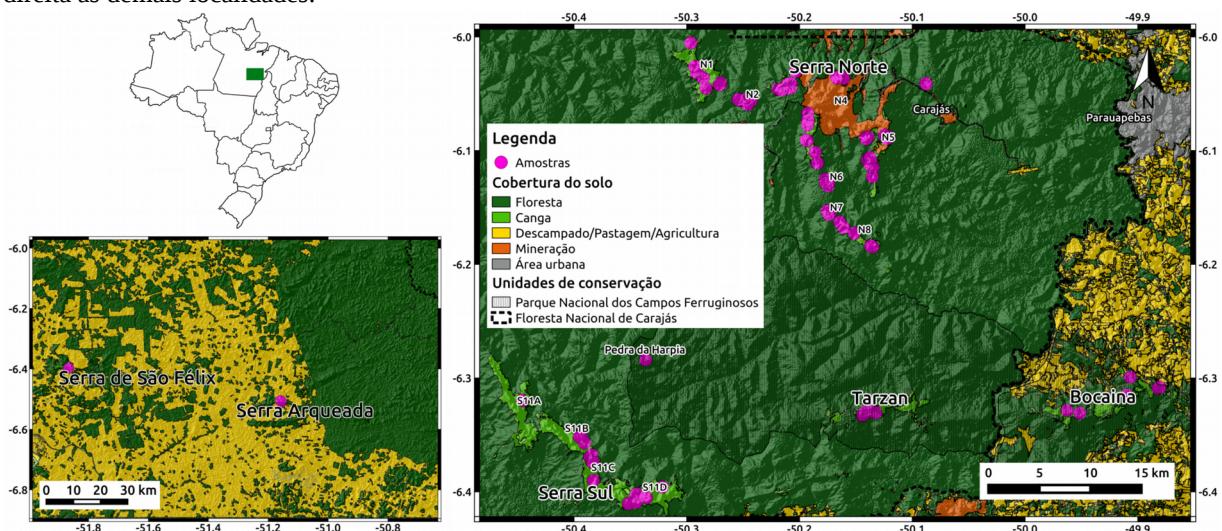
geneticamente diferenciadas em cangas mais afastadas; (3) Autocorrelação espacial positiva dentro dos platôs de canga (4) Presença de loci associados a genes que conferem adaptação devido as particularidades do ambiente.

## 2.2 Materiais e métodos

### 2.2.1 Amostragem e extração de DNA

Foram amostrados 438 indivíduos de *Brasilianthus carajensis* nas áreas de cangas da Serra dos Carajás ao sudeste do estado do Pará (Brasil), abrangendo a faixa de distribuição geográfica conhecida da espécie (Rocha et al. 2017)(Figura 1). As coletas foram feitas nos blocos da Serra Norte (intitulados N1, N2, N3... a N8), Serra Sul (blocos S11A, S11B, S11C, S11D e Tarzan), Serra da Bocaina, Serra Arqueada e Serra de São Félix do Xingú. Foram coletados ramos vegetativos de plantas jovens com maior quantidade de folhas verdes. O material foi preservado por meio de desidratação em sílica gel à temperatura ambiente. O DNA foi extraído seguindo o protocolo CTAB 2% (mini prep, modificado) (Doyle 1987) sem fenol e com posterior purificação do DNA por meio de precipitação de polissacarídeos (MichaeIs et al. 1994). A integridade do DNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1.5 % corado com SYBR® Safe (Invitrogen) e a concentração do DNA foi quantificada com o kit Qubit High SensitivityAssay (Invitrogen).

Fig. 1: Mapa de cobertura de solo da área estudada mostrando o local de coleta das amostras (em rosa) dos indivíduos da espécie *B. carajensis*. À esquerda amostras coletadas em São Félix do Xingu e Ourilândia, e a direita as demais localidades.



## 2.2.2 Sequenciamento *NextRAD* e descoberta dos SNPs

As amostras com no mínimo 150 ng de DNA total purificado foram enviadas para a empresa SNPSaurus (<http://snpsaurus.com/>) na concentração final de 5 ng/µL em 30 µL de volume para sequenciamento e processamento bioinformático. 185 amostras foram sequenciadas a partir do método de *nextRAD*, no qual os locos genômicos são amplificados igualmente entre as amostras devido o uso de iniciadores de PCR seletivos. O DNA genômico foi fragmentado, e sequências curtas (adaptadores) foram ligadas nas extremidades dos fragmentos de DNA com o reagente Nextera (Illumina, Inc). O DNA fragmentado com adaptadores foi então amplificado por 25 ciclos a 72 °C, com primers de sequencia complementares aos adaptadores dos fragmentos. Assim, apenas os fragmentos com uma sequencia que pode ser hibridizada pela sequencia do iniciador foram amplificados eficientemente.

As bibliotecas foram sequenciadas em uma plataforma HiSeq 4000 (University of Oregon). A análise de genotipagem foram feitas com scripts personalizados (SNPsaurus, LLC) que montaram as leituras usando bbduk (ferramentas BBMap, <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. Em seguida, foi criada uma referência de novo coletando 10 milhões de leituras no total, uniformemente das amostras, e excluindo as leituras que tinham contagens menores que 5 ou mais de 700. Os loci remanescentes foram alinhados entre si para identificar loci alélicos e haplótipos alélicos colapsados a um único representante. Todas as leituras foram mapeadas para a referência com um limite de identidade de alinhamento de 90% usando bbmap (ferramentas BBMap). A chamada do genótipo foi feita usando Samtools e bcftools (samtools mpileup -gu-Q 12 -t DP, DPR -f ref.fasta -b samples.txt | bcftools call -cv -> genotypes.vcf). O vcf (*Variant Call Format*) foi filtrado para remover alelos com uma frequência de população inferior a 3%. Loci que eram heterozigotos em todas as amostras ou tinham mais de 2 alelos em uma amostra (sugerindo parálogos colapsados) foram removidos. A ausência de artefatos foi verificada contando SNPs em cada posição de nucleotídeo nos *reads* e determinando que o número de SNP não aumentou com a redução da qualidade das bases no final dos *reads*. Após essa filtragem foi recebido da empresa SNPsaurus um arquivo VCF (contendo os SNPs

identificados em cada indivíduo) e um arquivo FASTA (contendo as sequências de DNA) de 150 indivíduos (foram excluídos amostras que continham contaminação), os quais foram utilizados nas posteriores análises.

### 2.2.3 Diversidade genética e estrutura de população

Para serem usados apenas SNPs neutrais, independentes e com melhor qualidade para as análises, os dados foram submetidos a um controle de qualidade final por meio de funções disponíveis no VCFtools (DANECEK et al., 2011), executados por meio do pacote *r2vcf*tools (<https://github.com/nspope/r2vcf>) no programa R. Os loci foram filtrados por qualidade (Phred score > 50), profundidade dos reads (30 – 240), desequilíbrio de ligação (LD,  $r^2 < 0.6$ ), e acentuados desvios no equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE,  $p < 0.0001$ ). Para filtragem por Hardy Weinberg, inicialmente os dados foram subdivididos em grupos geográficos (grupos por Serras: Serra Sul, Serra Norte, Serra da Bocaina, Serra de São Félix/Arqueada, e Serra do Tarzan) para melhor atender os pressupostos de populações idealizadas (ausência de migrantes e seleção natural). Adicionalmente foram removidos loci que potencialmente estavam sob seleção, detectados através de escaneamentos do genoma com testes de  $F_{ST}$  outliers, aplicados após ajustado as taxas de falsos positivos, de acordo com a distribuição de valores  $p$  (François et al. 2016). A estatística  $F_{ST}$  outlier foi estimada com a função sNMF do pacote "LEA". Os dados resultantes de loci neutros e independentes foram utilizados para calcular valores de grau de relacionamento (*relatedness*) (Yang et al. 2010), heterozigosidade esperada (HE), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), coeficientes de endogamia (F), coeficiente  $F_{ST}$  de Wright e tamanho efetivo da população ( $Ne$ ). Para calcular este último utilizamos o programa NeEstimator 2.0.1 (Do et al. 2014). Para avaliar a estrutura genética da população foram usadas três metodologias: LEA (Frichot and François 2015), Admixture (Alexander et al. 2009) e análise de componentes principais (PCA). Nos métodos baseados em verossimilhança, LEA e Admixture, estimou-se o número de populações ancestrais ( $k$ ) permitindo variação entre 1 e 10, com 10 corridas replicadas para cada valor de  $k$ , e o melhor  $k$  foi escolhido com base em valores de *cross-entropy* e erros de validação cruzada (Frichot et al. 2014). Para a análise dos componentes principais, foram usados os pacotes *gdsfmt* e *SNPRelate* (Zheng et al. 2012) no programa R. Para deteção da estrutura genética espacial em fina escala, foi avaliada

a autocorrelação espacial nos padrões de relacionamento genético, utilizando ajuste polinomial local (LOESS) do grau de relacionamento genético entre pares de indivíduos ( $r$ , “*relateness*”) para diferentes distâncias geográficas (<https://github.com/rojaff/Lplot>).

#### 2.2.4 Identificação de prováveis loci adaptativos

Nas análises de determinação de loci adaptativos, os dados foram filtrados apenas pela qualidade e profundidade, mas não para LD, HWE ou  $F_{ST}$  *outliers*. Para determinar os loci adaptativos possivelmente associados com variáveis ambientais, foi utilizado *latent factor mixed models* (LFMM) levando em conta a estrutura da população (Frichot et al. 2013; De Kort et al. 2014; Rellstab et al. 2015). Primeiro, foi realizado uma análise de componentes principais (PCA) usando as 19 variáveis bioclimáticas do WorldClim (<http://www.worldclim.org/bioclim>) e selecionado as três variáveis com maior correlação com os três primeiros componentes do PCA (o que explicou 85% da variância total). As variáveis selecionadas foram: temperatura mínima no mês mais frio, temperatura máxima no mês mais quente e precipitação no quarto do ano mais chuvoso. Essas variáveis juntamente com elevação foram usadas para executar LFMM usando o pacote LEA no programa R. Os modelos foram executados para  $k \pm 2$  fatores latentes, onde  $k$  foi o número ótimo de populações ancestrais detectadas. Foi usado 1.000 interações, uma queima (*burn-in*) de 10.000 interações, e 10 corridas por variável ambiental (Frichot and François 2015). Os valores de  $p$  foram ajustados usando o fator de inflação genômica ( $\lambda$ ) e as taxas de falsos positivos foram definidas usando o algoritmo Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995). Foi considerado como loci candidatos apenas aqueles compartilhados entre todas as corridas (assumindo diferentes valores de  $k$ ). Além disso, foi realizado escaneamentos do genoma para identificar loci *outliers* com base apenas em  $F_{ST}$  (François et al. 2016). Para pesquisar as proteínas codificadas pelos genes contidos nas regiões de flanqueamento dos loci candidatos, as sequências foram submetidas no banco de dados do NCBI usando o BLASTx, que pesquisa nas bases de dados de proteínas usando sequências de nucleotídeos traduzidas (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foram selecionadas as proteínas com menores valores de *e-value* (mínimo 0,0001) para cada variável ambiental e loci *outliers* com base em

$F_{ST}$ , excluindo repetições da mesma proteína em diferentes espécies ou proteínas não identificadas.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Genotipagem, diversidade genética e estrutura populacional

Foram sequenciados 150 indivíduos e identificado um total de 9.365 SNPs. Após feitas as filtragens dos dados (qualidade, profundidade, desequilibrio de ligação, HWE and  $F_{ST}$  outlier loci) sobraram 1.408 SNPs para as análises populacionais. Os índices de diversidade genética detectados nas populações de *B. carajensis* são listados na Tabela 1. As análises de estrutura populacional feitas pelo programa *Admixture* e pelo pacote LEA indicaram a presença de três populações, denominadas como população 1, 2 e 3 (Figura 2) e agrupadas de modo semelhante em ambos os programas. Amostras da Serra Sul, Serra do Tarzan, Serra Arqueada e Serra de São Félix foram agrupadas na população 1 (no LEA 3 indivíduos de São Félix agrupados na população 3); aquelas da Serra da Bocaina e a maior parte dos blocos da Serra Norte (N3 a N8) agruparam-se na população 2; e amostras de N1, N2 e alguns trechos ao norte de N3 e N4, todos na Serra Norte, na população 3 (Figura 3). O gráfico de PCA também indicou a formação de três subgrupos no conjunto de dados (Figura 4). O  $F_{ST}$  estimado entre as três populações resultou em um valor baixo ( $F_{ST} = 0.069$ ) mostrando baixa a moderada diferenciação entre as populações. Análise de autocorrelação espacial mostrou uma autocorrelação espacial do grau de relacionamento genético até uma distância de 13 Km (Figura 5).

Fig. 2: Gráficos que mostram o número ótimo de clusters genéticos ( $k$ ) para *B. carajensis*. A) Gráfico com base em erros de validação cruzada (Admixture); B) Gráfico com base na entropia cruzada (LEA).

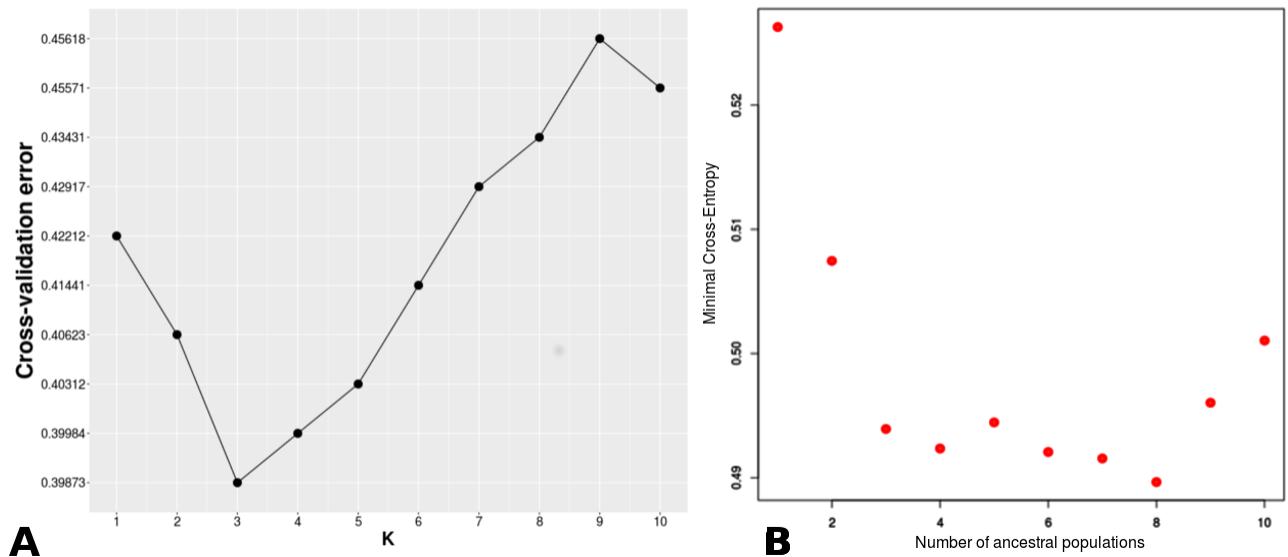


Fig. 3: Mapa mostrando a distribuição das amostras de *B. carajensis* a 3 clusters genéticos em um mapa de cobertura de solo. Os gráficos de pizza representam os coeficientes de ancestralidade determinados usando o pacote LEA. A - Serra de São Félix; B - Serra Arqueada; C - Serra Norte, Serra Sul, Serra da Bocaina e Serra do Tarzan.

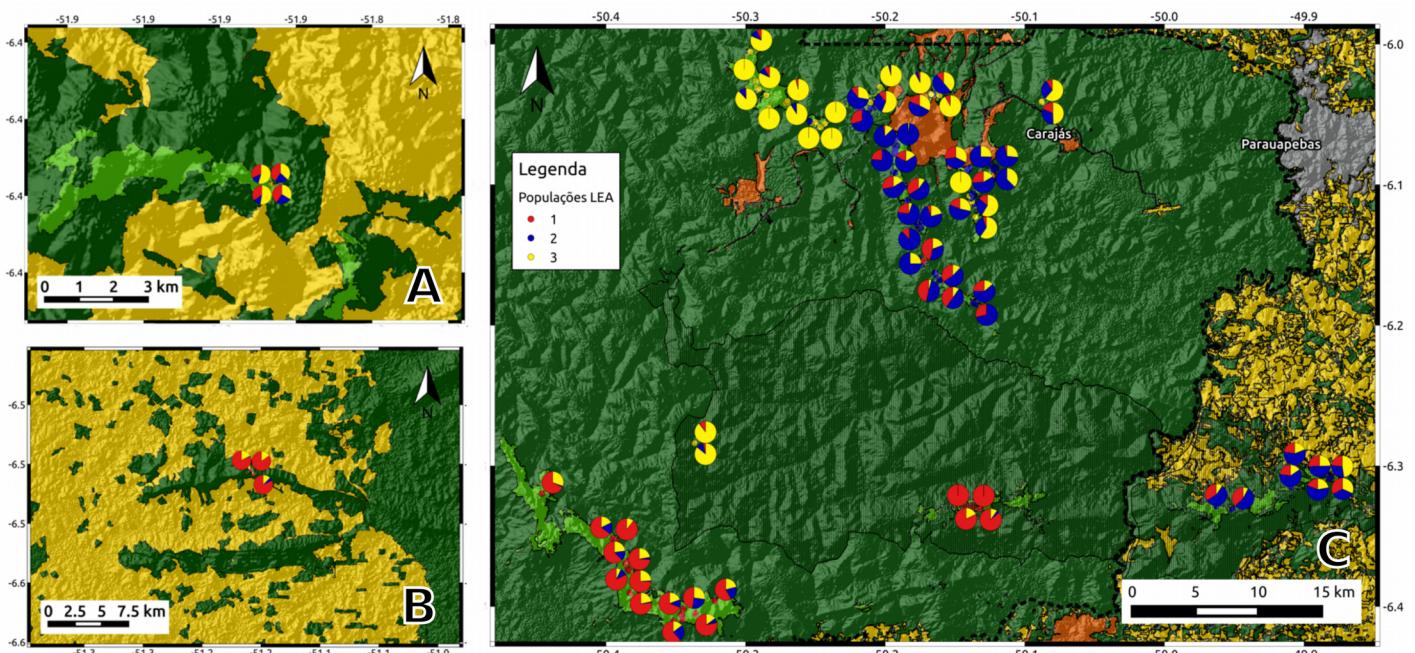


Fig. 4: Análise de coordenadas principais (PCA) para os 150 indivíduos de *B. carajensis* com o conjunto de 1.408 SNPs indicando a formação de 3 subgrupos. Pontos coloridos de acordo com as populações genéticas classificadas no programa LEA.

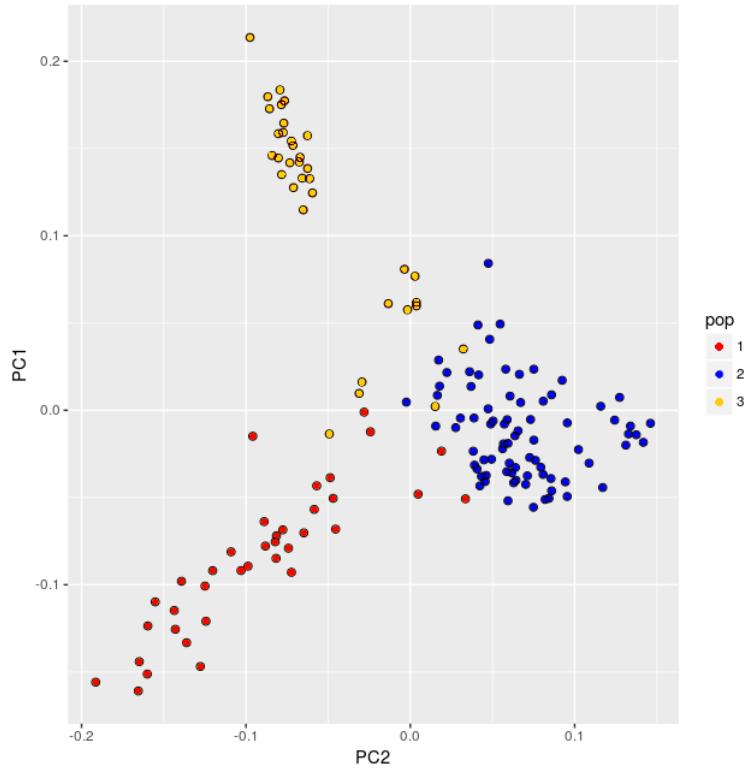
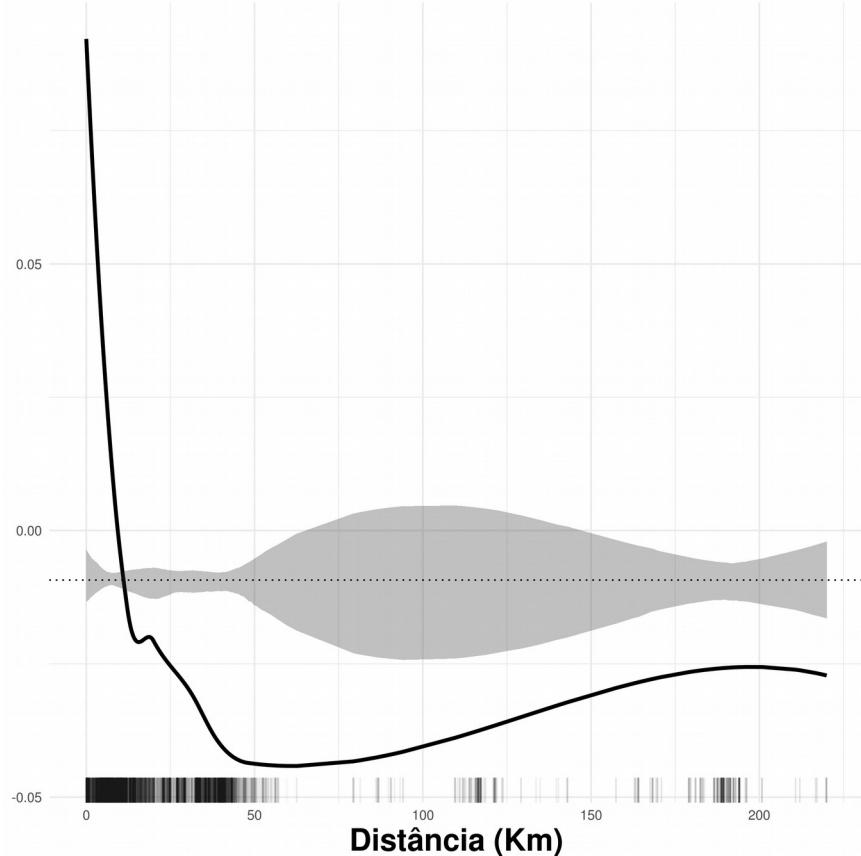


Tabela 1: Medidas de diversidade genética de *B. carajensis*. Os tamanhos de amostra (N) são mostrados seguidos de heterozigosidade observada média ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada média ( $H_E$ ), coeficiente médio de endogamia (F), diversidade média de nucleotídeo por local ( $\pi$ ) e tamanho efetivo da população (Ne). Todas as estimativas são mostradas ao longo de intervalos de confiança de 95% (IC).

População	N	$H_o$ (IC)	$H_E$ (IC)	F (IC)	$\pi$ (IC)	Ne (IC)
Pop.1	37	0.21 (0.20/0.23)	0.22 (0.22/0.22)	0.04 (-0.02/0.10)	0.19 (0.18/0.20)	98.8 (92.3/106.1)
Pop.2	78	0.22 (0.21/0.23)	0.21 (0.21/0.21)	-0.03 (-0.08/0.00)	0.19 (0.19/0.20)	74.2 (72.7/75.7)
Pop.3	35	0.18 (0.17/0.19)	0.20 (0.20/0.20)	0.11 (0.05/0.17)	0.17 (0.16/0.18)	40.4 (39.2/41.6)

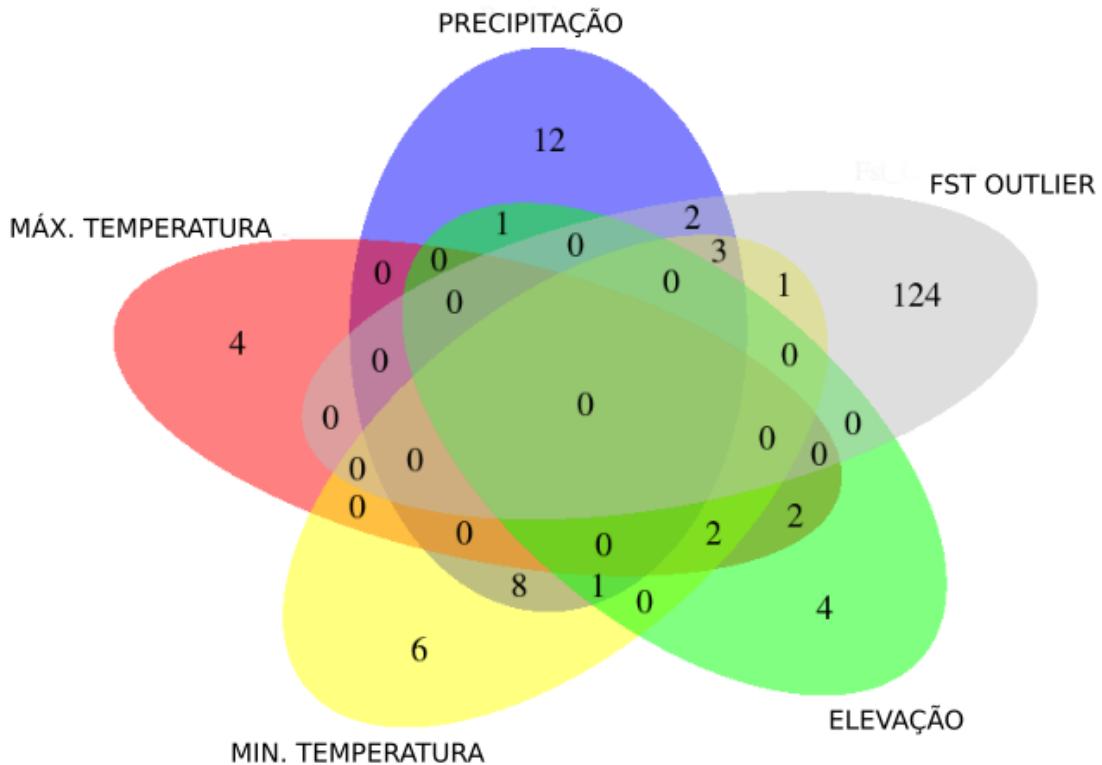
Fig. 5: Análise de autocorrelação espacial de *B. carajensis*. A linha sólida preta é o LOESS ajustado para a relação observada, as regiões cinzas são limites de confiança de 95% em torno da expectativa nula (linha pontilhada preta). As linhas verticais curtas na parte inferior da figura é observado a distância entre os pares de indíviduos.



### 2.3.2 Identificação de prováveis loci adaptativos

Os testes de associação ambiental detectaram 66 loci candidatos (Figura 6). Foram encontrados oito prováveis genes associados com temperatura mínima no mês mais frio, temperatura máxima no mês mais quente, precipitação no quarto do ano mais chuvoso e elevação (Tabela S1). Escaneamentos do genoma detectaram 130 loci candidatos (Figura 6), na qual foram encontrados 34 prováveis genes adaptativos (Tabela S1). Muitas proteínas sem descrição foram encontradas (proteínas hipotéticas) mas não foram incluídas por não adicionarem informações.

Fig. 6: Diagrama de Venn que mostra a interseção de loci candidatos de *B. carajensis*.



## 2.4 Discussão

Os resultados do presente estudo geraram questionamentos acerca de que tipo de eventos contribuíram para a formação da estruturação e diversidade genética da espécie. Como esperado, os dados mostraram valores de heterozigidez (esperada e observada), diversidade nucleotídica e tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) baixos. Foram encontradas três populações, e diferente do previsto, não houve diferenciação marcante dos indivíduos de cangas mais afastadas. Já a autocorrelação espacial foi positiva até uma faixa de 13km de distância entre as amostras. Nas análises dos loci adaptativos, foram encontrados 66 loci candidatos com os testes de associação ambiental com 8 genes conhecidos, e 130 loci candidatos a partir de escaneamentos do genoma com 34 genes conhecidos.

Os valores de heterozigozidade esperada e diversidade nucleotídica foram semelhantes entre as 3 populações, assim como em populações das espécies *Ipomoea calcantei* D. F. Austin e *Ipomoea maurandoides* Meisn., que foram estudadas para Carajás (Lanes et al, in

prep.). Esses valores são relativamente altos quando comparados àqueles referidos para as espécies *Clermontia fauriei* H. Lév. e *Cyanea pilosa* ssp. *longipedunculata* (Rock) Lammers, plantas endêmicas de ilhas havaianas, em um estudo com SNPs (Jennings et al. 2016). Em plantas endêmicas herbáceas com estudos realizados com outros marcadores, os valores são semelhantes (Helenurm 2001; Da-Wei et al. 2004; Ni et al. 2006; Li et al. 2008). O tamanho efetivo das populações ( $N_e$ ) apresentou valores muito menores do que nas espécies de *Ipomoea* estudadas por Lanes et al. (in prep.), podendo indicar movimento de sementes limitado (Loveless and Hamrick 1984), geração atual proveniente de um pequeno número de pais ou de indivíduos aparentados (Allendorf et al. 2013) ou endogamia (Charlesworth 2009).

Endogamia foi significativa apenas na população 3, que possui a distribuição mais restrita. Como em populações pequenas a probabilidade de endogamia bi-parental ou através de autofecundação aumenta (Honnay et al. 2005), a pequena faixa de ocorrência pode justificar a presença de endogamia. Além disso, a endogamia significativa pode indicar dispersão restrita de sementes, pois quanto menor a taxa de dispersão de sementes maior os valores de endogamia (Kobayashi and Yamamura 2000). Isso seria decorrente do maior número de plantas aparentadas próximas e consequente aumento de cruzamentos entre indivíduos aparentados. Como as populações que possuem maior influência da mina não foram as mais endogâmicas nem mostraram ter uma menor diversidade, a mina parece ainda não ter influência aparente na população local.

Diferente do que se esperava, indivíduos de cangas distantes e isoladas, como Serra do Tarzan, Serra de São Félix e Serra da Bocaina, não formaram populações isoladas. Isso demonstra que houve troca de alelos mesmo com as possíveis barreiras para uma pequena erva, como a floresta e a longa distância. Esse fluxo genético entre os diferentes platôs de canga é também indicado pelo valor de  $F_{ST}$  total entre todas as populações ( $F_{ST} = 0.069$ ), que indica baixa a moderada diferenciação entre elas. Esses padrões genéticos podem ser reflexo de processos históricos (Avise et al. 1988) ou transporte não intencional de sementes.

Comparando a estrutura genética de *B. carajensis* com as demais espécies de canga estudadas da Serra de Carajás existem algumas semelhanças e marcantes diferenças. *Ipomoea maurandiooides*, que ocorre nos platôs da Serra Norte, Sul e Tarzan, os indivíduos da Serra do Tarzan formaram uma população única (Lanes et al., in prep.). Isso sugere que *I.*

*maurandoides* pode possuir padrões de fluxo mais restrito do que *B. carajensis* entre as cangas, mesmo sendo uma espécie de ampla distribuição. Agrupamento de indivíduos dos platô N1 e N2 também foi visto em *I. maurandoides* (Lanes et al, in prep). Pode ter existido algum tipo de barreira que impede o fluxo de plantas dessa localidade com as demais nas outras cangas da Serra Norte, já que nas demais populações de *B. carajensis* há fluxo entre indivíduos de platôs mais distantes entre si (e. g. Tarzan-Serra Sul). *Ipomoea calcantei*, que é uma planta restrita aos platôs da serra norte, apresenta uma única população não sendo afetada pela provável barreira, provavelmente devido à sua polinização ser por beija-flores (LANES et al, no prelo).

A presença de alguns indivíduos pertencentes à população 3 fora dos platôs N1 e N2 (em Pedra da Harpia, Lagoa da Mata e em N5) pode ter sido gerada por interferência antrópica. É conhecida a influência humana na estruturação de espécies de interesse econômico (Albrecht et al. 2012; Mezette et al. 2013; Baba et al. 2016) e a capacidade de atuar como vetores de dispersão a longas distâncias de forma passiva (Wichmann et al. 2009), além de que o transporte humano aumenta a probabilidade de as sementes se dispersarem atravessando barreiras naturais (Nathan et al. 2008). As sementes da espécie são resistentes (sobrevivem toda estação seca), abundantes e pequenas (Almeda et al. 2016), portanto seriam facilmente transportadas misturadas ao solo em calçados, pneus de carros, ou até mesmo no processo de revestimento de estradas de acesso. Os locais onde foram encontrados esses indivíduos ficam próximos de estradas muito utilizadas que interconectam os referidos platôs. Sementes podem ficar presas em solas de sapatos após 5 km de caminhada, e podem ser transportadas em pneus de carros, ou uma combinação de ambos os meios (Von Der Lippe and Kowarik 2007; Wichmann et al. 2009). Outro meio em que poderia haver o transporte de sementes seria através de solos e misturas de sementes usadas em programas de recuperação de áreas degradadas, pois esses materiais são retirados de outras áreas da Serra dos Carajás (STCP 2016).

Mesmo que a maioria dos platôs de canga se encontrem dentro da unidade de conservação da Floresta Nacional de Carajás (FLONA Carajás), essa unidade é de uso sustentável, onde é permitido a extração mineral e entre outras atividades extrativistas na área (STCP 2016). Isso implica que as populações dentro da FLONA não estariam completamente

protegidas das atividade antrópicas. Para garantir maior preservação do ambiente de canga, recentemente foi criado o Parque Nacional dos Campos Ferruginosos (Giulietti et al. 2017) que é uma unidade de conservação de proteção integral (Decreto sem nº, de 5 de junho de 2017). Mesmo possuindo uma ampla extensão (cerca de 79.000 hectares), essa unidade de conservação só engloba a Serra do Tarzan e Serra da Bocaina, onde há indivíduos pertencentes as populações 1 e 2, mas nenhum da população 3, que é a de distribuição restrita e com endogamia.

Na família Melastomataceae, é apontado que plantas com frutos capsulares com pequenas sementes aparentam serem dispersos pelo vento (Renner 1989). Entretanto *B. carajensis* não aparenta este padrão, já que em campo é visualizado várias plântulas próximas aos restos da provável planta-mãe, formando manchas densas de indivíduos. Como a autocorrelação espacial encontrada caracteriza maior semelhança genética entre indivíduos mais próximos, isso caracteriza dispersão restrita de genes na espécie (Vekemans & Hardy, 2004), indicando que as plantas germinado próximas realmente podem ser aparentadas.

Dentre as proteínas encontradas alanina racemase e arginina descarboxilase têm destaque devido estarem relacionadas com precipitação e temperatura mínima. Alanina racemase atua na germinação da planta (Ono et al. 2006), e arginina descarboxilase contribui na produção de poliaminas que regulam crescimento e desenvolvimento (Masgrau et al. 1997). Suas funções podem ter relação com o fato de *B. carajensis* germinar e completar todo seu ciclo de vida na estação chuvosa (Almeda et al. 2016) e consequentemente mais fria do ano. Esse comportamento também pode explicar a presença da proteína beta-galactosidase relacionada com temperaturas mais frias, já que mesma contribui no amadurecimento de frutos e flores.

Algumas proteínas encontradas tem interação com metais pesados em geral, como ferro e cobre (proteína detoxificação, MATE, cupredoxina, Cu-oxidase, prolyl 4-hydroxylase, metal-nicotianamina), evidenciando a adaptação da planta ao ambiente com solo rico em metais, principalmente óxido de ferro (Lindenmayer et al. 2001; Ribeiro et al. 2009).

## 2.5 Conclusão

O conjunto de dados genômicos mostrou uma diversidade baixa a moderada, com endogamia significante em apenas uma população, e possível influência antrópica na estrutura populacional. Baseado nesses resultados os esforços de conservação devem ser orientados para preservar principalmente indivíduos da população distinta e não protegida pelo Parque Nacional dos Campos Ferruginosos. Além da estrutura genética, foram identificadas possíveis adaptações as áreas de cangas que podem contribuir para futuros programas de conservação e restauração.

## REFERÊNCIAS

- Albrecht E, Zhang D, Mays AD, et al (2012) Genetic diversity in *Capsicum baccatum* is significantly influenced by its ecogeographical distribution. *BMC Genet* 13:1–15. doi: 10.1186/1471-2156-13-68
- Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009) Fast Model-Based Estimation of Ancestry in Unrelated Individuals. *Genome Res* 19:1655–1664. doi: 10.1101/gr.094052.109
- Allendorf FW, Luikart G, Aitken SN (2013) Conservation and the genetics of population, 2nd edn. Wiley Blackwell
- Almeda F, Michelangeli FA, Viana PL (2016) *Brasilianthus* (Melastomataceae), a new monotypic genus endemic to ironstone outcrops in the Brazilian Amazon. *Phytotaxa* 273:269–282. doi: 10.11646/phytotaxa.273.4.3
- Almeida J, Da Silva Azevedo M, Spicher L, et al (2016) Down-regulation of tomato PHYTOL KINASE strongly impairs tocopherol biosynthesis and affects prenyllipid metabolism in an organ-specific manner. *J Exp Bot* 67:919–934. doi: 10.1093/jxb/erv504
- Avise JC, Ball RM, Arnold J (1988) Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Mol Biol Evol* 5:331–344. doi: 10.1142/9789814317764\_0007
- Baba VY, Rocha KR, Gomes GP, et al (2016) Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. *Genet Resour Crop Evol* 63:1371–1381. doi: 10.1007/s10722-015-0325-4
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc* 57:289–300

- Bischoff V, Selbig J, Scheible WR (2010) Involvement of TBL/DUF231 proteins into cell wall biology. *Plant Signal Behav* 5:1057–1059. doi: 10.4161/psb.5.8.12414
- Bourbouloux A, Shahi P, Chakladar A, et al (2000) Hgt1p, A high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275:13259–13265. doi: 10.1074/jbc.275.18.13259
- Cavalcanti TB, Facco MG, Brauner L de M (2016) Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Lythraceae. *Rodriguesia* 67:1411–1415. doi: DOI: 10.1590/2175-7860201667539
- Chang I-F, Szick-Miranda K, Pan S, Bailey-Serres J (2005) Proteomic Characterization of Evolutionarily Conserved and Variable Proteins of *Arabidopsis* Cytosolic Ribosomes. *Plant Physiol* 137:848–862. doi: 10.1104/pp.007138.of
- Chanroj S, Lu Y, Padmanaban S, et al (2011) Plant-specific cation/H<sup>+</sup> exchanger 17 and its homologs are endomembrane K<sup>+</sup> transporters with roles in protein sorting. *J Biol Chem* 286:33931–33941. doi: 10.1074/jbc.M111.252650
- Charlesworth B (2009) Fundamental concepts in genetics: Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nat Rev Genet* 10:195–205. doi: 10.1038/nrg2526
- Chu H-H, Chiecko J, Punshon T, et al (2010) Successful Reproduction Requires the Function of *Arabidopsis* YELLOW STRIPE-LIKE1 and YELLOW STRIPE-LIKE3 Metal-Nicotianamine Transporters in Both Vegetative and Reproductive Structures. *Plant Physiol* 154:197–210. doi: 10.1104/pp.110.159103
- Da-Wei X, Xue-Jun G, Gang H, Chang-Qin Z (2004) High genetic diversity in a rare, narrowly endemic primrose species: *Primula interjacens* by ISSR analysis. *Acta Bot Sin* 46:1163–1169
- De Kort H, Vandepitte K, Bruun HH, et al (2014) Landscape genomics and a common garden trial reveal adaptive differentiation to temperature across Europe in the tree species *Alnus glutinosa*. *Mol Ecol* 23:4709–4721. doi: 10.1111/mec.12813
- Do C, Waples RS, Peel D, et al (2014) NeEstimator v2: Re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Mol Ecol Resour* 14:209–214. doi: 10.1111/1755-0998.12157
- Doyle JJ (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15

- Ehlting J, Büttner D, Wang Q, et al (1999) Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J* 19:9–20. doi: 10.1046/j.1365-313X.1999.00491.x
- Enns LC, Kanaoka MM, Torii KU, et al (2005) Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. *Plant Mol Biol* 58:333–349. doi: 10.1007/s11103-005-4526-7
- Ernst WHO (1988) Response of Plants and Vegetation to Mine Tailings and Dredged Materials. In: Salomons W, Förstner U (eds) *Chemistry and Biology of Solid Waste: Dredged Material and Mine Tailings*. Springer-Verlag, pp 56–66
- François O, Martins H, Caye K, Schoville SD (2016) Controlling false discoveries in genome scans for selection. *Mol Ecol* 25:454–469. doi: 10.1111/mec.13513
- Frascaroli E, Schrag TA, Melchinger AE (2013) Genetic diversity analysis of elite European maize (*Zea mays* L.) inbred lines using AFLP, SSR, and SNP markers reveals ascertainment bias for a subset of SNPs. *Theor Appl Genet* 126:133–141. doi: 10.1007/s00122-012-1968-6
- Freeland J, Petersen SD, Kirk H (2011) *Molecular ecology*, 2nd edn. John Wiley & Sons Ltd.
- Frichot E, François O (2015) LEA: An R package for landscape and ecological association studies. *Methods Ecol Evol* 6:925–929. doi: 10.1111/2041-210X.12382
- Frichot E, Mathieu F, Trouillon T, et al (2014) Fast and efficient estimation of individual ancestry coefficients. *Genetics* 196:973–983. doi: 10.1534/genetics.113.160572
- Frichot E, Schoville SD, Bouchard G, François O (2013) Testing for associations between loci and environmental gradients using latent factor mixed models. *Mol Biol Evol* 30:1687–1699. doi: 10.1093/molbev/mst063
- Giulietti AM, Oliveira G, Jaffé R (2017) O fim desta viagem. In: Zappi DC (ed) *Paisagens e Plantas de Carajás*, 1 ed. Instituto Tecnológico Vale (ITV), Belém, PA, pp 223–231
- Hauser M, Donhardt AM, Barnes D, et al (2000) Enkephalins are transported by a novel eukaryotic peptide uptake system. *J Biol Chem* 275:3037–3041. doi: 10.1074/jbc.275.5.3037
- Helenurm K (2001) High levels of genetic polymorphism in the Insular Endemic Herb *Jepsonia malvifolia*. *J Hered* 92:427–432. doi: 10.1093/jhered/92.5.427
- Holderegger R, Herrmann D, Poncet B, et al (2008) Land ahead: Using genome scans to identify molecular markers of adaptive relevance. *Plant Ecol Divers* 1:273–283. doi: 10.1080/17550870802338420

- Honnay O, Jacquemyn H, Bossuyt B, Hermy M (2005) Forest fragmentation effects on patch occupancy and population viability of herbaceous plant species. *New Phytol* 166:723–36. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01352.x
- Hvorup RN, Winnen B, Chang AB, et al (2003) The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur J Biochem* 270:799–813. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03418.x
- Ishiguro S, Nishimori Y, Yamada M, et al (2010) The arabidopsis FLAKY POLLEN1 gene encodes a 3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme a synthase required for development of tapetum-specific organelles and fertility of pollen grains. *Plant Cell Physiol* 51:896–911. doi: 10.1093/pcp/pcq068
- Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, et al (2003) An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell* 15:2503–2513. doi: 10.1105/tpc.016097
- Jean M Le, Schikora A, Mari S, et al (2005) A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *Plant J* 44:769–782. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02569.x
- Jennings H, Wallin K, Brennan J, et al (2016) Inbreeding, low genetic diversity, and spatial genetic structure in the endemic Hawaiian lobeliads Clermontia fauriei and Cyanea pilosa ssp. longipedunculata. *Conserv Genet* 17:497–502. doi: 10.1007/s10592-015-0785-2
- Kobayashi Y, Yamamura N (2000) Evolution of seed dormancy due to sib competition: Effect of dispersal and inbreeding. *J Theor Biol* 202:11–24. doi: 10.1006/jtbi.1999.1027
- Ledig FT (1992) Human Impacts on Genetic Diversity in Forest Ecosystems. *Oikos* 63:87–108
- Li L, He Z, Pandey GK, et al (2002) Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *J Biol Chem* 277:5360–5368. doi: 10.1074/jbc.M108777200
- Li X, Ding X, Chu B, et al (2008) Genetic diversity analysis and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) based on AFLP. *Genetica* 133:159–166. doi: 10.1007/s10709-007-9196-8
- Lindenmayer ZG, Laux JH, Teixeira JBG (2001) Considerações sobre a origem das formações ferríferas da Formação Carajás, Serra dos Carajás. *Rev Bras Geociências* 31:21–28
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annu Rev Ecol Syst* 15:65–95. doi: 10.1146/annurev.es.15.110184.000433
- Martins FD, Castilho AF, Campos J, et al (2012) Fauna da Floresta Nacional de Carajás: Estudos sobre vertebrados terrestres. Nitro Editorial, São Paulo

- Masgrau C, Altabella T, Farrás R, et al (1997) Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant J* 11:465–473. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11030465.x
- Mezette TF, Blumer CG, Veasey EA (2013) Morphological and molecular diversity among cassava genotypes. *Pesq agropec bras* 48:510–518. doi: 10.1590/S0100-204X2013000500007
- MichaeIs SD, John MC, Amasino RM (1994) Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques* 17:274–276
- Mota NF de O, Silva LVC, Drumond MF, Viana PL (2015) Vegetação sobre sistemas ferruginosos da serra dos Carajás. In: CARMO FF DO, KAMINO LHY (eds) *Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais*. 3i Editora, Belo Horizonte - MG, pp 289–313
- Mota NF de O, Wanderley M das GL (2016) Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Xyridaceae. *Rodriguesia* 67:1499–1503. doi: DOI: 10.1590/2175-7860201667556
- Narum SR, Hess JE (2011) Comparison of FST outlier tests for SNP loci under selection. *Mol Ecol Resour* 11:184–194. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02987.x
- Nathan R, Schurr FM, Spiegel O, et al (2008) Mechanisms of long-distance seed dispersal. *Trends Ecol Evol* 23:638–647. doi: 10.1016/j.tree.2008.08.003
- Ni X, Huang Y, Wu L, et al (2006) Genetic diversity of the endangered Chinese endemic herb *Primulina tabacum* (Gesneriaceae) revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Genetica* 127:177–183. doi: 10.1007/s10709-005-3227-0
- Nikolovski N, Rubtsov D, Segura MP, et al (2012) Putative Glycosyltransferases and Other Plant Golgi Apparatus Proteins Are Revealed by LOPIT Proteomics. *Plant Physiol* 160:1037–1051. doi: 10.1104/pp.112.204263
- Nishimura MT, Stein M, Hou BH, et al (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* (80- ) 301:969–972. doi: 10.1126/science.1086716
- Nunes CDS, Mota NFDO, Viana PL, Gil ADSB (2017) *Bulbostylis cangae*, a new species of Cyperaceae from Northern Brazil (Serra dos Carajás, Pará State). *Phytotaxa* 299:96–102. doi: 10.11646/phytotaxa.299.1.7
- Ono K, Yanagida K, Oikawa T, et al (2006) Alanine racemase of alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L.): First evidence for the presence of an amino acid racemase in plants. *Phytochemistry* 67:856–860. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.02.017

- Ostergaard L, Petersen M, Mattsson O, Mundy J (2002) An *Arabidopsis* callose synthase. *Plant Mol Biol* 49:559–566
- Otsuga D, DeGuzman B, Prigge MJ, et al (2001) REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J* 25:223–236. doi: 10.1046/j.1365-313X.2001.00959.x
- Prigge MJ, Otsuga D, Alonso JM, et al (2005) Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 17:61–76. doi: 10.1105/tpc.104.026161.1
- Rellstab C, Gugerli F, Eckert AJ, et al (2015) A practical guide to environmental association analysis in landscape genomics. *Mol Ecol* 24:4348–4370. doi: 10.1111/mec.13322
- Renner SSA (1989) Annals of the Missouri Botanical Garden,. *Ann Missouri Bot Gard* 76:496–518
- Ribeiro AA, Suita MTF, Sial AN, et al (2009) Geoquímica de isótopos estáveis (C, S e O) das rochas encaixantes e do minério de Cu(Au) do depósito Cristalino, Província Mineral De Carajás, Pará. *Geochim Bras* 23:159–176
- Ribeiro AÍ, Longo RM, Teixeira Filho A, Wanderley JDM (2006) Diagnóstico de uma área compactada por atividade minerária, na floresta amazônica, empregando métodos geoestatísticos à variável resistência mecânica à penetração do solo. *Acta Amaz* 36:83–89. doi: 10.1590/S0044-59672006000100010
- Rocha KC de J, Goldenberg R, Meirelles J, Viana PL (2017) Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Melastomataceae. *Rodriguesia* 68:997–1034. doi: 10.1590/2175-7860201768315
- Salas RM, Viana PL, Cabral EL, et al (2015) Carajasia (Rubiaceae), a new and endangered genus from Carajás mountain range, Pará, Brazil. *Phytotaxa* 206:14–29. doi: 10.11646/phytotaxa.206.1.4
- Santos BA (1986) Recursos minerais. In: Almeida JMG (ed) Carajás: desafio político, ecologia e desenvolvimento. CNPq, Brasília, pp 294–361
- Secco RDS, Mesquita AL (1983) Notas sobre a vegetação de canga da Serra Norte - I. Bol do Mus Para Emílio Goeldi, Nov Série; Botânica 59:1–13
- Seo PJ, Park J, Park M-J, et al (2012) A Golgi-localized MATE transporter mediates iron homoeostasis under osmotic stress in *Arabidopsis*. *Biochem J* 442:551–561. doi: 10.1042/BJ20111311
- Shi X, Sun X, Zhang Z, et al (2015) GLUCAN SYNTHASE-LIKE 5 (GSL5) plays an essential role in male fertility by regulating callose metabolism during microsporogenesis in rice. *Plant Cell Physiol* 56:497–509. doi: 10.1093/pcp/pcu193

- Silva MFF (1991) Análise florística da vegetação que cresce sobre canga hematítica em Carajás - Pará (Brasil). *Bol Mus Para Emílio Goeldi, Série Botânica* 7:79–106
- STCP EDPL (2016) Plano De Manejo Da Floresta Nacional De Carajás : Volume I- Diagnóstico. Brasília
- Templeton AR, Shaw K, Routman E, Davis S (1990) The genetic consequences of habitat fragmentation. *Ann Missouri Bot Gard* 77:13–27. doi: 10.2307/2399621
- Uniprot (2018) Uniprot Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/>. Accessed 23 Feb 2018
- Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol Ecol* 13:921–935. doi: 10.1046/j.1365-294X.2004.02076.x
- Von Der Lippe M, Kowarik I (2007) Long-distance dispersal of plants by vehicles as a driver of plant invasions. *Conserv Biol* 21:986–996. doi: 10.1111/j.1523-1739.2007.00722.x
- Wichmann MC, Alexander MJ, Soons MB, et al (2009) Human-mediated dispersal of seeds over long distances. *Proc R Soc B Biol Sci* 276:523–532. doi: 10.1098/rspb.2008.1131
- Wu Z, Burns JK (2004) A  $\beta$ -galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of “Valencia” orange (*Citrus sinensis*). *J Exp Bot* 55:1483–1490. doi: 10.1093/jxb/erh163
- Yadav V, Molina I, Ranathunge K, et al (2014) ABCG Transporters Are Required for Suberin and Pollen Wall Extracellular Barriers in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26:3569–3588. doi: 10.1105/tpc.114.129049
- Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, et al (2010) Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat Genet* 42:565–569. doi: 10.1375/twin.13.6.517
- Yokoyama R, Nishitani K (2001) A Comprehensive Expression Analysis of all Members of a Gene Family Encoding Cell-Wall Enzymes Allowed us to Predict cis-Regulatory Regions Involved in Cell-Wall Construction in Specific Organs of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 42:1025–1033. doi: 10.1093/pcp/pce154
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol* 11:413–418. doi: 10.1016/0169-5347(96)10045-8
- Zhao Q, Zhang Y, Wang G, et al (2016) A specialized flavone biosynthetic pathway has evolved in the medicinal plant, *Scutellaria baicalensis*. *Sci Adv* 2:1–15. doi: 10.1126/sciadv.1501780
- Zheng X, Levine D, Shen J, et al (2012) A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics* 28:3326–3328. doi: 10.1093/bioinformatics/bts606

Zhong R, Ye Z-H (1999) IFL1, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* 11:2139–2152.  
doi: 10.1105/tpc.11.11.2139

## APÊNDICE

Tabela S1: Proteínas candidatas codificadas pelos genes contidos nas regiões flanqueadoras dos SNPs candidatos. Os prováveis loci adaptativos foram identificados utilizando testes de associação ambiental (LFMM) e escaneamentos genômicos.

Método estatístico	Variável Ambiental	Signature accession	Signature description	E-value	Função	Referência
LFMM	Precipitação	XP_017243292.1	PREDICTED: arginine decarboxylase-like [Daucus carota subsp. sativus]	8E-19	Gera agmatina, intermediária na produção de poliaminas que regulam crescimento e desenvolvimento	(Masgrau et al. 1997)
		KVH96643.1	Alanine racemase/group IV decarboxylase, C-terminal [Cynara cardunculus var. scolymus]	3E-18	Produz d-alanina que atua na brotação da planta;	(Ono et al. 2006)
	Temperatura Máxima	XP_022866276.1	40S ribosomal protein S24-1-like isoform X2 [Olea europaea var. sylvestris]	2E-9	Sintetiza a subunidade menor do ribossomo 40S	(Chang et al. 2005)
		XP_017243292.1	PREDICTED: arginine decarboxylase-like [Daucus carota subsp. sativus]	8E-19	Gera agmatina, intermediária na produção de poliaminas que regulam crescimento e desenvolvimento	(Masgrau et al. 1997)
	Temperatura Minima	KVH96643.1	Alanine racemase/group IV decarboxylase, C-terminal [Cynara cardunculus var. scolymus]	3E-18	produz d-alanina que atua na brotação da planta;	(Ono et al. 2006)
		CAJ09953.1	beta-galactosidase [Mangifera indica]	3E-17	contribui no amadurecimento de frutos e flores	(Wu and Burns 2004)
		XP_017184573.1	PREDICTED: 40S ribosomal protein S24-1 [Malus domestica]	2E-9	Sintetiza a subunidade menor do ribossomo 40S	(Chang et al. 2005)
	Elevação	XP_022866276.1	40S ribosomal protein S24-1-like isoform X2 [Olea europaea var. sylvestris]	2E-9	Sintetiza a subunidade menor do ribossomo 40S	(Chang et al. 2005)
Genome scan FST	-	XP_018820174.1	PREDICTED: callose synthase 11-like [Juglans regia]	1E-26	Envolvido no desenvolvimento esporofítico, gametofítico e da folha. Também atua na defesa de patógenos	(Ostergaard et al. 2002; Jacobs et al. 2003; Nishimura et

					al. 2003; Enns et al. 2005)
	KVH89522.1	1,3-beta-glucan synthase subunit FKS1-like, domain-1 [Cynara cardunculus var. scolymus]	1E-25	Sinônima da callose sintase.	(Shi et al. 2015)
	XP_010047167.1	PREDICTED: ABC transporter G family member 20 [Eucalyptus grandis]	2E-23	Associada a movimentos transmembrana de substâncias, ATPases e biosíntese de suberina	(Yadav et al. 2014)
	XP_009614165.1	PREDICTED: hydroxymethylglutaryl-CoA synthase-like [Nicotiana tomentosiformis]	9E-23	Viabilidade do pólén	(Ishiguro et al. 2010)
	EOY15446.1	O-fucosyltransferase family protein [Theobroma cacao]	2E-22	Glicosilação de proteínas, que faz parte da modificação de proteínas	(Nikolovski et al. 2012)
	XP_006849539.1	homeobox-leucine zipper protein HOX11 [Amborella trichopoda]	3E-20	Regulação da fibra interfascicular (células corticais) e diferenciação do xilema secundário nas hastes de inflorescência. Necessário para meristemas laterais e iniciação de meristemas florais. Pode estar envolvido na determinação do padrão vascular e da polaridade dos órgãos	(Zhong and Ye 1999; Otsuga et al. 2001; Prigge et al. 2005)
	XP_022138795.1	protein DETOXIFICATION 55 [Momordica charantia]	3E-20	Transportador para desintoxicação de multidrogas e de metais pesados	(Li et al. 2002)
	XP_020958799.1	cation/H(+) antiporter 19 [Arachis ipaensis]	4E-20	Transporte de prótons	(Chanroj et al. 2011)
	XP_011657288.1	PREDICTED: MATE efflux family protein 5 isoform X1 [Cucumis sativus]	5E-20	Mesmo grupo de DETOXIFICATION, funções como transportador de extrusão de multidrogas e toxinas. Contribui para a homeostase de ferro durante as respostas ao estresse e a senescência	(Seo et al. 2012)

		XP_010035024.1	PREDICTED: monocopper oxidase-like protein SKS1 [Eucalyptus grandis]	6E-20	Cofator	(Uniprot 2018)
		AAS77208.1	Hox19 [Oryza sativa Japonica Group]	8E-20	Sinônima de homeobox-leucine zipper protein	(Uniprot 2018)
		XP_011007425.1	PREDICTED: 4-coumarate--CoA ligase 2 isoform X1 [Populus euphratica]	1E-19	Canalização de carbono em diversas vias de ramificação do metabolismo de fenilpropanoides que servem funções importantes no crescimento de plantas e adaptação a perturbações ambientais	(Ehlting et al. 1999)
		XP_022139351.1	oligopeptide transporter 1-like [Momordica charantia]	1E-19	Transportador de alta afinidade para a glutatonia. Também transporta tetra e pentapeptídeos como os opióides leucina encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) e metionina encefalina (Tyr-Gly-Gly_Phe-Met) através da membrana celular.	(Bourbouloux et al. 2000; Hauser et al. 2000)
		OMO98551.1	Multi antimicrobial extrusion protein [Corchorus olitorius]	4E-19	Membro da família Multi Antimicrobial Extrusion (MATE) como antiporte de drogas e sódio.	(Hvorup et al. 2003)
		PIM98023.1	Sexual differentiation process protein ISP4 [Handroanthus impetiginosus]	2E-18	Atividade transportadora transmembrana do tetrapéptideos	(Uniprot 2018)
		AGO89321.1	Ca4CL4 [Salix arbutifolia]	2E-18	atividade catalítica	(Uniprot 2018)
		EOY24422.1	Cupredoxin superfamily protein isoform 1 [Theobroma cacao]	2E-18	Interação seletiva e não covalente com íons de cobre (Cu).	(Uniprot 2018)
		GAV92029.1	Cu-oxidase domain-containing protein/Cu-oxidase_2 domain-containing protein/Cu-oxidase_3 domain-containing protein [Cephalotus follicularis]	3E-18	Ligação de íons de cobre	(Uniprot 2018)

	AMW91731.1	CoA ligase-like protein 5 [Scutellaria baicalensis]	8E-18	atividade da enzima ligase em processos metabólicos	(Zhao et al. 2016)
	XP_022631712.1	probable prolyl 4-hydroxylase 9 isoform X1 [Vigna radiata var. radiata]	2E-17	Ligação de íons de ferro e de ácido L-ascórbico	(Uniprot 2018)
	XP_021895059.1	protein trichome birefringence-like 42 [Carica papaya]	3E-15	Envolvido na deposição de celulose da parede celular secundária, desenvolvimento normal do caule. Pode atuar como uma proteína de ponte que liga pectina e outros polissacarídeos de parede celular.	(Bischoff et al. 2010)
	XP_022841702.1	probable metal-nicotianamine transporter YSL6 isoform X1 [Olea europaea var. sylvestris]	1E-14	Resposta a de íons de ferro, desenvolvimento de sementes e processo de desenvolvimento envolvido na reprodução	(Jean et al. 2005; Chu et al. 2010)
	BAV57585.1	probable YSL-trasnporter [Olea europaea]	2E-14	Transporte transmenbrana	(Uniprot 2018)
	NP_568425.1	transmembrane protein [Arabidopsis thaliana]	3E-13	Transporte transmenbrana	(Uniprot 2018)
	XP_004134493.2	PREDICTED: pectinesterase-like [Cucumis sativus]	2E-12	Atua na modificação das paredes celulares através da desmetilesterificação da pectina da parede celular	(Uniprot 2018)
	PIM99546.1	H+/oligopeptide symporter [Handroanthus impetiginosus]	3E-12	Transporte transmenbrana de oligopeptídeos	(Uniprot 2018)
	EOY24767.1	Signal peptide peptidase-like 2 isoform 3 [Theobroma cacao]	4E-12	Atividade de endopeptidase de tipo aspártico	(Uniprot 2018)
	EOY24390.1	Nitrate transporter 1.1 isoform 2 [Theobroma cacao]	1E-11	Transporte de oligopeptídeos	(Uniprot 2018)
	XP_012439536.1	PREDICTED: protein NRT1/ PTR FAMILY 6.3-like isoform X2 [Gossypium raimondii]	2E-11	Transporte de oligopeptídeos	(Uniprot 2018)

		XP_002303830.1	ribosomal protein S15 [Populus trichocarpa]	2E-11	Constituinte estrutural do ribossomo	(Uniprot 2018)
		XP_013602905.1	PREDICTED: probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 30 [Brassica oleracea var. oleracea]	3E-11	Participa na construção de paredes celulares de tecidos em crescimento	(Yokoyama and Nishitani 2001)
		OMO77375.1	Concanavalin A-like lectin/glucanases superfamily [Corchorus capsularis]	4E-10	Ligaçao de carboidratos	(Uniprot 2018)
		ACG41171.1	beta 1, 3 galactosyltransferase [Zea mays]	2E-08	Ligaçao de carboidratos, participa do processo biossintético de mucilagem envolvido no desenvolvimento do revestimento de sementes e desenvolvimento de células de absorçao na raiz	(Uniprot 2018)
		XP_021817645.1	probable phytol kinase 1, chloroplastic [Prunus avium]	0,0001	Envolvido na ativação e reutilização de fitol da degradação da clorofila no metabolismo das plantas, incluindo a biossíntese de tocoferol, um composto com vitamina E, que conserva a rede antioxidante do plastidio	(Almeida et al. 2016)

## ANEXOS

### **Normas para a submissão no periódico Conservation Genetics**

#### **TITLE PAGE**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

#### **SCIENTIFIC STYLE**

Genus and species names should be in italics.

#### **TEXT FORMATTING**

##### **Manuscripts should be submitted in Word.**

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

#### **Headings**

Please use no more than three levels of displayed headings.

## **Abbreviations**

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## **Footnotes**

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## **REFERENCES**

### **Citation**

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

### **Reference list**

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <http://dx.doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 339:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* <http://dx.doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.  
<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

## TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

### **Electronic Figure Submission**

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### **Color Art**

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### **Figure Lettering**

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

### **Figure Captions**

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### **Figure Placement and Size**

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.