

FR.2020.0004

Nº IBAMA: 02001.01577/2016-20 (CIF)

Nº IBAMA: 02001.004152/2016-72 (CTBio)

Belo Horizonte, 06 de janeiro de 2020.

* **AO**
COMITÊ INTERFEDERATIVO – CIF
A/C: SR. EDUARDO BIM

PRESIDENTE DO COMITÊ INTERFEDERATIVO

PRESIDENTE DO INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVÁVEIS

SCEN Trecho 2, Edifício Sede do Ibama, Caixa Postal nº 09566, Brasília/DF

CEP: 70818-900

À
CÂMARA TÉCNICA DE CONSERVAÇÃO E BIODIVERSIDADE – CTBIO

A/C: SR. FREDERICO DRUMOND MARTINS

COORDENADOR DA CÂMARA TÉCNICA DE CONSERVAÇÃO E BIODIVERSIDADE

Avenida Nossa Senhora dos Navegantes 451 – Edifício Petro Tower, sala 1601,

Enseada do Suá, Vitória/ES

CEP: 29050-335

REF.: *Proposta de delineamento metodológico de análise de diversidade genética de espécies arbóreas.*

Cláusula 168 do TTAC

Prezado Senhor,

A Fundação Renova ("Fundação") tem a missão de implementar e gerir os programas de reparação, restauração e reconstrução das regiões impactadas pelo rompimento da barragem de Fundão, conforme programas socioambientais e socioeconômicos previstos no Termo de Transação e Ajuste de Conduta (TTAC). Na frente socioambiental, a cláusula 168 do TTAC trata da Conservação da Biodiversidade Terrestre impactada em decorrência do rompimento da barragem de Fundão em Mariana, MG.



Neste contexto, apresentamos proposta de delineamento metodológico para análise de diversidade genética de espécies arbóreas, como parte da Avaliação de impactos e Monitoramento da flora terrestre nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo.

Sendo o que cumpria para o momento, a Fundação Renova se mantém à disposição para prestar quaisquer esclarecimentos adicionais que se fizerem necessários.

Renovando nossos votos de estima e consideração, subscrevemos a presente.

Atenciosamente,



FUNDAÇÃO RENOVA
BRUNO VERGUEIRO SILVA PIMENTA
COORDENADOR DE PROGRAMAS SOCIOAMBIENTAIS



Proposta de trabalho – Genética

SERVIÇO AVALIAÇÃO DE IMPACTOS E MONITORAMENTO DA FLORA
TERRESTRE NOS ESTADOS DE MINAS GERAIS E ESPÍRITO SANTO



Colatina – ES
Dezembro de 2019

À Fundação Renova

Referência: Delineamento de trabalho relacionado à “Diversidade genética de espécies arbóreas” para a Avaliação de impactos e Monitoramento da flora terrestre nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo referente ao contrato 4800020487.

APRESENTAÇÃO GERAL

A Ello Ambiental Consultoria Ltda, contratada (contrato n° 4800020487) pela Fundação Renova para execução do segundo ano do monitoramento de flora, paisagem e solos, vem através deste documento propor metodologias de análise dos dados que estão sendo gerados, com a finalidade de responder perguntas relacionadas aos objetivos especificados na requisição técnica.

O objetivo do trabalho é extrair dos dados informações relevantes para a investigação de impacto, recuperação de áreas, monitoramento em longo prazo e informações úteis para a conservação da biodiversidade na região, agregando qualidade ao trabalho e avançando em relação ao trabalho realizado no primeiro ano. O desenho amostral básico está sendo mantido, com o trabalho de manutenção das parcelas RAPELD, marcação e medição de árvores. O número de indivíduos identificados e referenciados pelo sistema xy tem avançado amplamente.

Descrevemos neste documento, o delineamento e a metodologia para estudos genéticos, já expostos no workshop realizado nos dias 10 e 11/12/19.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	4
2. Genética	6
2.1. Diversidade genética e Fluxo Gênico dentro e entre fragmentos	6
2.2. Estrutura genética populacional	11
2.3. História demográfica das populações.....	14
3. Referências	17

1. INTRODUÇÃO

O rompimento da barragem de Fundão, da mineradora Samarco, no município de Mariana em Minas Gerais ocorreu em 5 de novembro de 2015 e, na época, foi considerado pelo IBAMA (2015) como “o maior desastre socioambiental do país no setor de mineração, com o lançamento de 34 milhões de metros cúbicos de rejeitos no meio ambiente”. Em decorrência do desastre, cerca de 11 toneladas de peixes mortos foram encontradas (RAMBOLL, 2017) e houve o aumento da quantidade de partículas em suspensão e dissolvidas na água do Rio Doce, atingindo concentrações de ferro (Fe), arsênio (As), mercúrio (Hg) e manganês (Mn) que excederam os padrões legais (HATIE et al., 2017).

O desequilíbrio ecológico causado pela morte dos peixes e poluição da água do rio pode ter levado a uma reação em cadeia ainda difícil de ser mensurada. Especula-se, por exemplo, que o surto de febre amarela que dizimou centenas de primatas humanos e não humanos nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo em 2017 tem relação com o rompimento da barragem e com a morte dos anfíbios e peixes que controlavam naturalmente o mosquito vetor da doença (POSSAS et al., 2018).

A longo prazo, a redução de populações animais pode afetar espécies arbóreas que dependem dessas espécies para a dispersão de sementes e/ou polinização. Sem os dispersores a semente germina próxima a planta genitora, reduzindo o fluxo gênico entre fragmentos e entre pontos distantes dentro do mesmo fragmento levando ao isolamento entre populações e, conseqüentemente, ao aumento da estrutura genética.

Deve-se considerar também que o vale do Rio Doce é uma região chave para a conservação, pois que abriga alto endemismo filogenético e alta diversidade genética para vários grupos (CARNAVAL et al., 2009; BATALHA-FILHO E MIYAKI, 2016). Segundo Carnaval e Moritz (2008) e Carnaval et al, (2009) a região permaneceu

florestada durante as mudanças climáticas do Pleistoceno, sendo um dos refúgios da Mata Atlântica.

Visto isso, a proposta do projeto é, através de duas espécies-chave de árvores, investigar parâmetros genéticos populacionais como diversidade genética, estrutura genética populacional, fluxo gênico e também avaliar a história demográfica das populações. O delineamento foi concebido visando investigar os impactos ocorridos pelo desastre e por outras atividades humanas pretéritas, gerar informações importantes a conservação na área de estudo e atender às solicitações da câmara técnica, utilizando a metodologia que vem sendo realizada.

2. GENÉTICA

2.1. Diversidade genética e Fluxo Gênico dentro e entre fragmentos

A diversidade genética pode ser estimada através da heterozigosidade observada (HO) obtida a partir das frequências de heterozigotos presentes e da heterozigosidade esperada (HE) obtida a partir das frequências alélicas de uma população. O valor de HE permite mensurar o nível de variação genética em uma população de uma determinada espécie, independentemente do sistema reprodutivo (Nei, 1973). Outros endogamia (FIS).

O fluxo gênico refere-se a todos os mecanismos de movimentação de alelos entre e dentro das populações. Para espécies vegetais, a polinização e a dispersão de sementes são dois estágios independentes e críticos do fluxo gênico e do ciclo de recrutamento para a composição de genótipos para as novas gerações. Usualmente, esses dois estágios envolvem a interação de fatores bióticos e abióticos que fornecem serviços de dispersão de pólen e de sementes (Hamrick & Nason, 2000).

Perguntas

A Diversidade Genética dos Adultos e Jovens2 (indivíduos com DAP entre 1cm e 5cm, indicando uma dispersão anterior ao rompimento da barragem) é maior que a diversidade genética dos Jovens1(indivíduo mais jovem, com presença de cotilédone, indicando dispersão após o rompimento da barragem)?

O fluxo gênico de árvores dependentes de fauna para polinização e dispersão diminuiu após o rompimento da barragem?

Hipóteses

Os índices de diversidade genética dos adultos e jovens2 será maior que o dos jovens1, enquanto a endogamia (FIS) dos adultos e jovens2 será menor que a dos jovens1

Nos indivíduos do grupo jovens2 encontraremos genitores tanto em locais próximos quanto mais distante dentro do mesmo transecto além de genitores no transecto localizado do outro fragmento. Já para os indivíduos do grupo jovens1 encontraremos, prioritariamente, genitores próximos da prole devido ao possível déficit de dispersores causado pelo rompimento da barragem.

Premissas

O rompimento da barragem reduziu a quantidade de animais polinizadores e dispersores de sementes;

A redução de polinizadores e dispersores causa déficit de polinização e dispersão, diminuindo o fluxo gênico.

Objetivo geral

Avaliar o fluxo gênico através de teste alocação de paternidade por meio de marcadores microssatélites, observando a ocorrência de processos de dispersão e polinização por fauna antes e depois do rompimento da barragem.

Objetivos específicos

- Comparar os índices de diversidade genética (HE, HO, AR) e endogamia (FIS) entre indivíduos adultos e jovens1 (indivíduo com presença de cotilédone, indicando dispersão após o rompimento da barragem de Fundão) para testar

se o desastre afetou geneticamente as populações, diminuindo os índices de diversidade genética e aumentando a endogamia.

- Se houver fluxo gênico entre fragmentos, observar se este se dá por polinização (genitor 1 e genitor 2 em fragmentos diferentes) e/ou dispersão (prole em fragmento diferente dos genitores).
- Observar a distância de polinização e dispersão, e, dessa maneira, avaliar o deslocamento da fauna polinizadora e dispersora ao longo da paisagem.

Delineamento

A fim de avaliar os processos ecológicos de dispersão e polinização e de comparar a diversidade genética entre adultos e jovens, serão utilizadas como organismos modelo duas espécies arbóreas, Sapucaia (*Lecythis pisonis*) e Jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*) a primeira é dispersa por morcegos e polinizada por abelhas e a segunda é dispersa pelo vento e polinizada por abelhas.

Para a coleta de material foliar serão escolhidas 6 parcelas ripárias ao longo do Rio Doce e Rio Gualacho do Norte. As parcelas ripárias servirão como ponto de partida para a busca ativa das árvores e plântulas, no entanto a busca pode exceder o limite da parcela pois é pouco provável encontrar o número de indivíduos necessários para o estudo dentro de uma parcela. A amostragem de 90 indivíduos por localidade (partindo de uma parcela ripária) será dividida entre 30 jovens¹ (indivíduo mais jovem, com presença de cotilédone, indicando dispersão após o rompimento da barragem), 30 jovens² (indivíduos com DAP entre 1cm e 5cm, indicando uma dispersão anterior ao rompimento da barragem) de 30 adultos (possíveis genitores, DAP > 30cm).

Por se tratar de espécies com baixa densidade de adultos, além de uma das espécies ser ameaçada de extinção, é possível que mesmo varrendo uma área maior que a parcela não sejam encontrados 30 adultos. Nesse caso, faremos uma parcela a mais, totalizando 7 parcelas, para completar o número de indivíduos proposto no orçamento.

Para cada espécie será feita a comparação da diversidade genética e distâncias de dispersão e polinização antes e depois do rompimento da barragem de Fundão. Para isso utilizaremos os Jovens 2 para medir os parâmetros de antes do rompimento e os Jovens 1 para medir os parâmetros depois do rompimento.

Hipótese

A diversidade genética dos jovens2 e dos adultos será maior que a diversidade genética dos Jovens 1 pois o déficit de dispersão tende a aumentar o cruzamento de indivíduos mais próximos que têm mais chances de serem aparentados.

Nos indivíduos do grupo jovens2 encontraremos genitores tanto em locais próximos quanto mais distante dentro do mesmo transecto além de genitores no transecto localizado do outro fragmento. Já para os indivíduos do grupo jovens1 encontraremos, prioritariamente, genitores próximos da prole devido ao possível déficit de dispersores causado pelo rompimento da barragem.

Método

O material genético composto de folhas será coletado pela equipe de campo formada por um profissional sênior, dois profissionais júnior e um auxiliar de campo, utilizando tesouras de poda ou podão. As folhas serão acondicionadas em sacolas plásticas individuais e identificadas com o número do indivíduo. Cada indivíduo deve ser numerado e georreferenciado. Ao final de cada dia de coleta o material foliar será estocado em geladeira a 4°C por até uma semana. Ao final da expedição de coleta as amostras foliares serão encaminhadas por transportadora em caixa isopor com gelo em gel até o Laboratório de Evolução e Biogeografia no Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, onde será feita a extração de DNA e reações de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase). Até o momento da extração de DNA, as amostras serão estocadas no laboratório em freezer a -20 °C.

Extração de DNA

O DNA genômico total das amostras será extraído pela equipe de laboratório formada por uma bióloga doutora em genética e um estagiário do curso de biologia. A extração será feita conforme protocolo Ferreira & Grattapaglia (1998). A quantificação do DNA será feita utilizando o Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen). Em seguida, todas as amostras serão diluídas para a concentração de 2,5 ng/μl de DNA.

Amplificação e genotipagem com marcadores microssatélites

A seleção dos primers, reações de PCR e visualização dos produtos de PCR em agarose será feita pela equipe de laboratório formada por uma bióloga doutora em genética e um estagiário do curso de biologia. Serão selecionados da literatura pelo menos oito iniciadores (primers) microssatélites polimórficos para cada espécie estudada. Os primers serão sintetizados com cauda M13 para anelamento da fluorescência (NED, PET, 6-FAM e VIC) utilizada na genotipagem semiautomática. As condições de amplificação de cada microssatélites serão otimizadas por PCR (reações em cadeia de polimerase). As reações serão realizadas em um volume final de 10 μl, contendo tampão 10x, MgCl₂ (50mM), DNTPs (10mM), Primer F (10 μM), Primer R (10 μM), fluorescência para anelamento na cauda M13 (1μM), taq (5U/mL), H₂O e 20 ng de DNA genômico. O termociclador será programado para um passo inicial de desnaturação de 1 minuto a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 45 segundos a temperatura de anelamento que será otimizada para cada primer, 1 min a 72 °C, e mais 8 ciclos para o anelamento da cauda M13 ao primer reverse, que se constitui de um passo de 1 min a 94 °C, 1 min 53 °C, 1 min a 72 °C seguido de a um passo final de 30 segundos a 72 °C. As reações serão acompanhadas por controle negativo contendo todos os componentes, exceto o DNA genômico. Os produtos de PCR serão visualizados em géis de agarose 2% corados com GelGreen e os que amplificarem satisfatoriamente serão enviados para genotipagem de fragmentos. Os produtos de PCR das reações serão dispostos em placas de genotipagem, armazenados em caixa isopor com gelo em gel e enviados por transportadora para o

IBETEC, UNESP, campus de Botucatu para genotipagem por eletroforese em capilar com o analisador genético ABI3500, utilizando o LIZ500 como marcador de tamanho. A UNESP enviará os resultados da genotipagem por e-mail e descartará as amostras. A equipe receberá os resultados brutos e analisará a longitude dos fragmentos, que será classificada como alelo pelo software GeneMapper v3.1 (Applied Biosystems).

Análise de dados

A Riqueza alélica (AR), heterozigosidade esperada (HE); heterozigosidade observada (HO); e endogamia (FIS) serão calculados pelo programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

O fluxo gênico direto, por teste de alocação de paternidade será estimado pelo programa CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007) utilizando o método de alocação categórica. Para análise de paternidade serão utilizados os jovens1 e jovens2 coletados nos dois transectos. Para determinar os possíveis genótipos dos jovens serão utilizados como pais candidatos todos os adultos amostrados na faixa 3 (DAP > 30cm). As simulações serão feitas para alocar os dois genótipos mais prováveis utilizando 10.000 repetições, com uma proporção de 0,05 de erro de genotipagem por loco e um intervalo de confiança de 95%. Em seguida serão alocados um ou dois genitores mais prováveis para cada prole através dos valores de LOD score. A possibilidade de autofecundação também poderá ser considerada nas simulações.

2.2. Estrutura genética populacional

A estrutura genética refere-se à organização não aleatória dos alelos e genótipos no espaço e tempo. A estrutura genética se dá em diferentes níveis hierárquicos: entre populações separadas geograficamente, dentro da mesma população ou até mesmo entre e dentro de famílias e progênies. Diversos fatores podem influenciar a estrutura genética, como: heterogeneidade da paisagem, densidade, distribuição e parentesco dos indivíduos, comportamento de polinizadores, mecanismos de dispersão, sistema

reprodutivo da espécie e ação das forças evolutivas (migração, seleção, mutação e deriva) (Loveless & Hamrick, 1984; Jones *et al.*, 2006).

Perguntas

Existe estrutura genética populacional entre os fragmentos analisados?

Existe estrutura genética espacial em fina escala?

Existe estrutura genética temporal entre jovens e adultos?

Hipóteses

As análises de estrutura populacional irão refletir eventos históricos como, por exemplo, a retração florestal durante o Pleistoceno. Eventos recentes, como o rompimento da barragem de Fundão, só será refletido na estrutura populacional daqui a algumas gerações.

Como a estrutura genética espacial em fina escala está muito relacionada ao comportamento e sistema reprodutivo da planta, não há como formular hipótese sobre este tópico antes da seleção das espécies.

Haverá estrutura genética entre os jovens¹ e adultos devido ao déficit de dispersão e polinização.

Premissas

Déficit de polinização e dispersão tende a mudar a composição genética da geração seguinte devido ao aumento na endogamia por cruzamento entre indivíduos mais próximos e possivelmente mais aparentados.

Objetivo geral

Caracterizar estruturação populacional para fornecer subsídios para comparações posteriores e para elaboração de estratégias de conservação para as espécies abordadas e da floresta como um todo.

Objetivos específicos

- Avaliar o número de grupos genéticos (k);
- Acessar a ocorrência e magnitude da estrutura genética espacial e estrutura genética espacial em fina escala;
- Avaliar a existência de estrutura genética temporal entre jovens 2 e jovens1 (antes e depois do rompimento da barragem).

Delineamento

Serão utilizadas como organismos-modelo as duas espécies arbóreas sugeridas no item 3.1. Serão coletados pelo menos 30 indivíduos jovens 2 e 30 indivíduos jovens1 por ponto amostral, totalizando 60 indivíduos por localidade.

Procedimento de coleta e logística, Extração de DNA, Amplificação e genotipagem com marcadores microssatélites idem ao item 8.1

Análise de dados da Estrutura genética

Será calculado o coeficiente RST (Slatkin, 1995) utilizando o software RST-Calc (Goodman, 1997) com 10000 *bootstraps*.

Para determinar o número mais provável de grupos (K) será implementado o método de agrupamento Bayesiano no software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). O modelo será executado com 10 simulações independentes para cada K com comprimento burn-in de 10.000 gerações MCMC e comprimento de execução de 100.000 gerações. O número mais provável de grupos será calculado pelo programa

online Structure Harvester (Earl & Vonholdt, 2011) estimando de acordo com o valor de (ΔK), seguindo os procedimentos de Evanno *et al.*, (2005).

Estrutura Genética Espacial em Fina Escala

Para as análises de estrutura genética espacial e fina escala será utilizado o programa SPAGeDi (Hardy & Vekemans, 2002). As análises de distribuição espacial dos genótipos dentro das populações serão realizadas a partir do coeficiente de parentesco (F_{ij}) de Loiselle *et al.*, (1995). Para testar desvios significativos da estrutura genética espacial, será calculado um intervalo de confiança de 95% para cada valor observado em cada classe de distância utilizando 1000 permutações.

2.3. História demográfica das populações

A história demográfica de uma população deixa uma assinatura no genoma de seus representantes modernos que pode ser acessada por meio de marcadores moleculares. Reconstruir essa história pode levar a conclusões úteis sobre vários processos evolutivos. As análises de história demográfica baseadas em coalescência permitem testar ausência ou presença de seleção natural, estimar tamanho populacional, taxas de crescimento e tempo de divergência entre populações (Zolet *et al.*, 2013).

Perguntas

Qual o tamanho efetivo populacional atual e pretérito?

Houve mudanças nos tamanhos populacionais ao longo da história evolutiva das espécies?

Houve gargalo genético dessas populações no passado?

Hipóteses

O tamanho efetivo pretérito será maior que o atual;

Os tamanhos efetivos populacionais se mantiveram estáveis desde o último máximo glacial (UGM, 21 mil anos atrás);

Houve um gargalo genético recente (desde aproximadamente 40 anos atrás) devido aos eventos de desmatamento e fragmentação;

Por ser o evento recente, o rompimento da barragem de Fundão ainda não terá efeito demográfico detectável nas populações.

Premissas

A região do Vale do Rio Doce é considerada uma área de estabilidade que se manteve florestada durante as oscilações climáticas do Pleistoceno;

O desmatamento e fragmentação causaram diminuição nos tamanhos populacionais das espécies.

Objetivo geral

Utilizar coalescência baseada em stepwise mutation model para inferir sobre eventos populacionais pretéritos, como ocorrência de migração, mudança no tamanho populacional e gargalos genéticos.

Delineamento

Serão utilizados os indivíduos já amostrados no item 8.1.

Procedimento de coleta e logística, Extração de DNA, Amplificação e genotipagem com marcadores microssatélites será idem item 8.1

Análise de dados: história demográfica das populações

O número efetivo de indivíduos será estimado utilizando o método de coancestria de Waples (2008), implementado no software NeEstimator V2 (DO *et al.*, 2014). A análise

de coalescência por aproximação bayesiana (ABC) utilizando marcadores microssatélites será implementada no software DIYABC v.2.0 (Cornuet *et al.*, 2014). A presença de gargalos genéticos será inferida pelo software BOTTLENECK 1.2.02 (Cristescu *et al.*, 2009).

3. REFERÊNCIAS

BATALHA-FILHO, H.; MIYAKI, C. Y., Late Pleistocene divergence and postglacial expansion in the Brazilian Atlantic Forest: multilocus phylogeography of *Rhopias gularis* (Aves: Passeriformes). *J Zool Syst Evol Res.*, v. 54(2), p. 137-147 doi: 10.1111/jzs.12118, 2016.

CARNAVAL, A. C., HICKERSON, M. J., HADDAD, C. F., RODRIGUES, M. T., MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science (New York, N.Y.)*, v. 323, n. 5915, p. 785–9, doi:10.1126/science.1166955, 2009.

CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, v. 35, n. 7, p. 1187–1201, doi:10.1111/j.1365-2699.2007.01870.x, 2008.

CORNUET, J, et al. DIYABC v2. 0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, 30.8: 1187-1189, 2014.

CRISTESCU, R., SHERWIN, W. B., HANDASYDE, K., CAHILL, V., & COOPER, D. W. Detecting bottlenecks using BOTTLENECK 1.2.02 in wild populations: the importance of the microsatellite structure. *Conservation Genetics*, 11(3), 1043–1049, 2009.

DO, C., WAPLES, R. S., PEEL, D., MACBETH, G. M., TILLET, B. J., OVENDEN, J. R. NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*. 14(1), 209-214, 2014.

EARL & VONHOLDT. 2011. Structure Harvester. Disponível em: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, v. 14, n. 8, p. 2611–20, 2005.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA, Brasília, 1998.

HAMRICK, J. L.; NASON, J. D. Gene flow in forest trees. *In*: YOUNG, A.; BOSCHER, D.; BOYLE, T. (Ed.). *Forest conservation genetics: principles and practice*. Collingwood: CSIRO, p. 81-89, 2000.

HARDY, O.J.; VEKEMANS, X. SPAGeDI: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, Oxford, v.2, p.618-620, 2002.

HATIE et al. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Scientific Reports* 7.1: 10706, 2017.

IBAMA. Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais, 2015.

JONES, F. A.; HAMRICK, J. L.; PETERSON, C. J. & SQUIERS, E. R. Inferring colonization history from analyses of spatial genetic structure within populations of *Pinus strobus* and *Quercus rubra*. *Molecular Ecology*, Oxford, v.15, p.851-861, 2006.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, Oxford, v.16, p.1099-1106, 2007.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, Columbus, v. 82, p. 1420-1425, 1995.

LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Annual review of ecology and systematic*, v.15, p.65-95, 1984.

MARTINS, F.R. Atributos de comunidades vegetais. *Quid*, Teresina, v.9, n.1/2. p.12-17, 1990.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.70, n.12, p. 3321-3323, 1973.

PEAKALL, R. e SMOUSE, P. GenAEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic soft- ware for teaching and research – an update. v. 1, p. 6–8, 2012.

PORTO, M.F.S. 2016. A tragédia da mineração e do desenvolvimento no Brasil: desafio para a saúde coletiva. *Cad. Saúde Pública* 32 (2): 1-3. [online] URL: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v32n2/0102-311X-csp-32-2-0102-311X00211015.pdf>.

POSSAS, C., et al., Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(10), 2018.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M. e DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945–59, 2000.

RAMBOLL. Relatório de Atividades Mensais: Avaliação dos Programas Socioeconômicos e Socioambientais (Período Abril-Maio/2017). São Paulo-SP, 2017.

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

ZOLET, Andreia Carina Turchetto, et al. Guia prático para estudos filogeográficos. 2013.

