

O Impacto do Homem na Estrutura de uma Espécie: Portugal, um Paradigma
Maria Margarida Ribeiro¹, Santiago C. González-Martínez², Christian Burban³,
Christophe Plomion⁴, Giovanni Giuseppe Vendramin⁵

¹ Unidade Departamental de Silvicultura e Recursos Naturais, Escola Superior Agrária, 6001-909 CASTELO BRANCO, Portugal.

² Unidad de Genética Forestal, CIFOR-INIA, P.O. 8111, 28080 MADRID, Espanha.

^{3,4} Équipe d'Entomologie Forestière e Équipe de Génétique des Arbres Forestiers, INRA, 69 Route d'Arcachon, 33612 CESTAS, França.

⁵ Istituto Genetica Vegetale, CNR, Via Madonna del Piano, 50019 Sesto Fiorentino, FLORENÇA, Itália.

Sumário. A bacia do Mediterrâneo é caracterizada pelo tradicional desaparecimento da floresta devido à acção do Homem e o impacto humano tem tido influência na alteração da diversidade genética. O pinheiro bravo ocorre em populações fragmentadas na região oeste da bacia do Mediterrâneo e a sua área de distribuição tem sido alterada nos últimos séculos devido a intensa florestação, em particular no SW de França e no Noroeste da Península Ibérica e, também, devido ao comportamento invasivo desta espécie em áreas perturbadas do ponto de vista ecológico. Nesta apresentação pretendemos sintetizar e discutir o resultado de estudos que utilizaram técnicas moleculares para revelar a diversidade do pinheiro bravo e, também, o impacto humano na sua estrutura genética; que é demonstrado paradigmaticamente em Portugal.

Os parâmetros genéticos estimados com base em microsátélites do cloroplasto (cpSSR) revelaram que a diversidade genética é muito elevada ao nível da distribuição da espécie. Observou-se uma clara e significativa diferenciação entre grupos de populações de diferente origem geográfica (Portugal, França, Itália, Espanha e Marrocos). Pelo contrário, o grau de divergência dentro dos países é geralmente muito baixo ou próximo de zero, o que indica uma variação homogénea dentro dos grupos. A presença de diferenciação entre grupos de populações de diferentes áreas reflecte a existência de diferentes refúgios durante o Quaternário. Em França, o padrão haplotípico sugere uma mistura de material proveniente de diferentes origens. Só foram encontrados 3 mitótipos, usando marcadores mitocondriais, marcador de herança maternal, o que proporciona uma imagem clara de áreas colonizadas a partir dos diferentes refúgios; nem uma só população possui uma composição mista.

Uma análise filogenética feita com base em isoenzimas mostrou que a estrutura geográfica do pinheiro bravo na Península Ibérica (PI) é muito elevada. As populações de Noroeste formam um grupo e as de Sudeste outro. Observou-se níveis elevados de diversidade nas populações de Este e Sul e uma redução importante da variabilidade em populações da região Noroeste da PI. No entanto, pode ter existido em Portugal um refúgio, pois o pinheiro bravo pode ter sobrevivido durante a última glaciação em zonas abrigadas e de baixa altitude junto ao Oceano Atlântico, o que parece também ser evidente devido a descobertas de pólen e carvão fóssil.

A distribuição da variação genética do pinheiro bravo em Portugal, observada através de cpSSR indica que a diferenciação entre populações é baixa e que a diversidade existe principalmente dentro das populações. Não se observa nenhum padrão geográfico, mas as evidências existentes de uma forte influência antrópica antropogénica associada a um fluxo genético extensivo poderiam explicar esse resultado

Palavras-chave: marcadores moleculares, variação genética, fluxo genético, impacto humano, *Pinus pinaster*.

Abstract. The Mediterranean basin is characterised by a traditional depletion of forest by man and the human impact has modified species' genetic diversity. Maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton) occurs naturally in fragmented populations in the western part of the Mediterranean basin. This distribution has been reshaped during the last two centuries by heavy afforestation, particularly in southwest France and in the Iberian Peninsula, and by invasive behaviour in disturbed areas.

This presentation summarizes and discusses results of studies in which molecular markers were used to undercover the genetic diversity of this species, which further traced the human impact on its genetic structure, exemplary demonstrated for Portugal. The genetic parameters estimated from chloroplast microsatellites (cpSSR) data revealed that the level of genetic diversity in *Pinus pinaster* is very high. A clear and significant differentiation among groups of populations of different geographic origin (Portugal, France, Italy, Spain and Morocco) was observed. Conversely, the degree of population divergence within country is generally very low and close to zero, indicating a homogeneous distribution of the variation within groups. The presence of significant differentiation among groups of populations of different geographic areas seems to reflect the existence of different glacial refugia during the Quaternary, for this species. In France the observed haplotypic pattern suggest a genetic 'melting pot' of haplotypic diversity, derived from the mixture of material due to the artificial transfer from different regions. Using mitochondrial DNA, a maternally inherited marker, only three-mitochondrial haplotypes were found, which provided a clear picture of nonoverlapping areas colonized from different refugia, with no single population having a mixed composition.

The phylogenetic analysis made with allozyme markers showed a high geographical structure in the Iberian Peninsula. The northwestern populations form a cluster and the southeastern populations another. Highest levels of diversity in the eastern and the southern populations and an important reduction of gene diversity in the northwestern range of the species in the Peninsula were observed. Nevertheless, a putative refugium in Portugal was not excluded, because *P. pinaster* could have survived during the last glaciation in sheltered areas at low altitude close to the Atlantic Ocean, also supported by pollen and charcoal fossil discoveries. The distribution of the genetic variation of *P. pinaster* in Portugal, as revealed by cpSSR, indicated that there are low levels of differentiation among populations and that the diversity is found mainly within populations. No discernible geographic pattern was found. Evidences of strong anthropogenic influence associated with extensive gene flow could explain these findings.

Key words: molecular markers, genetic variation, gene flow, human impact, *Pinus pinaster*.

Introdução

Alguns estudos mostraram que as alterações climáticas durante o Quaternário (2,4 milhões de anos antes do presente) na Europa tiveram um papel fundamental na filogeografia das árvores e plantas ao fazer contrair e expandir as suas áreas de distribuição naturais (Bennett et al. 1991; Hewitt 1996; Hewitt 2000). As oscilações sucessivas glaciais-interglaciais no Pleistoceno moldaram a distribuição actual das espécies, através do isolamento de refúgios, que foram fontes subsequentes de recolonização (Comes and Kadereit 1998; Taberlet et al. 1998). No caso do pinheiro bravo, tem sido posta a hipótese que a actual distribuição da espécie é o resultado de acontecimentos que ocorridos durante a última glaciação (15.000-10.000 anos) (Baradat and Marpeau-Bezard 1988). No entanto, o uso da terra e a actividade humana na Bacia do Mediterrâneo teve, durante vários milénios, um papel relevante na evolução da estrutura da vegetação (Thirgood 1981) e na sua diversidade genética (Ledig 1992), em particular após o início da neolitização – agricultura e sedentarização – (Devy-

Vareta 1993a). Os efeitos não foram todavia os mesmos ao longo de toda a Bacia Mediterrânea, foram mais intensos nas regiões costeiras e em solos férteis. Vários factores ecológicos, tais como o fogo na floresta, a seca, os solos e outros, também desempenharam um papel importante na adaptabilidade do pinheiro bravo, no isolamento dos povoamentos e, em parte, na variabilidade genética da espécie, mas a distribuição desta espécie tem sido fortemente influenciada pelas actividades humanas ao longo dos tempos, até à sua recente expansão por cultivo (Barbero et al. 1998; Le Maitre 1998).

As florestas naturais em Portugal tiveram um recuo irreversível, do século XI ao XVI, devido aos arroteamentos medievos e ao consumo dos recursos florestais, aliado a um forte crescimento demográfico (Scott 1962; Devy-Vareta 1993a). A preocupação relativa ao desaparecimento acelerado da floresta levou a uma primeira reflorestação em larga escala no século XIII por monges cistercienses, que estabeleceram o pinhal de Leiria para estabilizar as dunas, mas muitos outros pinhais foram plantados noutros lugares para protecção do solo e para lutar contra a desertificação do País (Mattoso and Sousa 1993). A partir do séc. XV a marinha mercante de Portugal, Espanha, França e Grã-Bretanha consumiam grandes quantidades de madeira (Thirgood 1981). Le Maitre (1998) refere, ainda, um aumento significativo no do comércio europeu de madeira a partir do século XVIII e na expansão da indústria o que fomentou o derrube das florestas. Em Portugal, a Lei das Árvores (1565) obrigou os municípios a fazer fomento florestal e a utilizar o pinheiro bravo onde o solo era mais delgado e marcou o início da expansão desta espécie. Em finais do século XVIII e princípios do século XIX foram criados viveiros florestais para a florestação em larga escala em Portugal e o pinheiro bravo estava claramente a expandir-se e a suplantar outras espécies e a invadir áreas incultas. (N. Devy-Vareta, comunicação pessoal). Em 1938, a Lei do Povoamento Florestal impôs a florestação nos baldios e fomentou ainda mais a expansão da espécie nas regiões do interior, em áreas menos adaptadas à agricultura e com consequências sociais profundas (Radich and Alves 2000). Em França, iniciaram-se reflorestações com pinheiro bravo para estabilizar as dunas da região das Landes em 1713, que continuou até que uma área significativa da região estivesse florestada (Scott 1962). O pinheiro bravo na região das Landes cobria então cerca de 10,000 hectares (Perrin 1964), enquanto que hoje em dia atinge cerca de um milhão de hectares. Desde, pelo menos a partir do século XX, os programas de reflorestação aumentaram a área de distribuição desta espécie e a situação actual é um complexo de populações naturais e florestas plantadas cuja origem é desconhecida nalgumas regiões da área de distribuição da espécie (Devy-Vareta 1993b; Alía et al. 1996; Barbero et al. 1998; Salvador et al. 2000). Um melhor conhecimento da evolução e das modificações de origem antrópica pós-neolitização é, por isso, imprescindível para uma tentativa de interpretação das situações ambientais posteriores à Pré-história (Devy-Vareta 1993a).

Muito embora a região oeste da área de distribuição do pinheiro bravo tenha sido recentemente afectada por florestações intensas (sul de França e Península Ibérica), as glaciações do Quaternário tiveram, como foi referido, um papel preponderante no padrão genético espacial do pinheiro bravo, o que foi evidenciado em diferentes estudos com esta espécie (Baradat and Marpeau-Bezard 1988; Salvador et al. 2000; Carrión et al. 2003). Recentemente vários trabalhos utilizaram diversos marcadores moleculares para determinar a diversidade genética da espécie, quer a nível da distribuição da espécie quer a nível mais regional: (Vendramin et al. 1998), microsátélites do cloroplasto (cpSSR); (Derory et al. 2002), microsátélites nucleares (nuSSR); (Burban and Petit 2003), DNA mitocondrial (mtDNA) e do cloroplasto (cpDNA); (Salvador et al. 2000), isoenzimas; (Mariette et al. 2001), polimorfismo no tamanho de fragmentos de amplificação (AFLP) e nuSSR; (Ribeiro et al. 2002), AFLP e cpSSR; (González-Martínez et al. em publicação), isoenzimas; e G.G. Vendramin, comunicação pessoal, cpSSR.

Neste artigo pretendemos sintetizar e discutir o resultado de vários estudos, onde foram aplicadas técnicas moleculares com o objectivo de estudar (i) os padrões fitogeográficos do pinheiro bravo a nível da distribuição da espécie (G.G. Vendramin, comunicação pessoal; (Burban and Petit 2003), (ii) as hipóteses de migração desta espécie na Península Ibérica (Salvador et al. 2000; González-Martínez et al. em publicação); e (iii) a inexistência de estrutura geográfica em Portugal devida à influência humana e ao fluxo genético (Ribeiro et al. 2001).

Material e Métodos

A região de recolha do material vegetal, o número de populações, o marcador molecular e o número de *loci* (L) ou fragmentos (F) utilizados em cada um dos estudos está listado na tabela 1. Apesar do genoma do cloroplasto ser haploídeo, não sofrer recombinação e poder ser considerado como sendo um só *locus*, são referidos como número de fragmentos, os diferentes fragmentos de microsatélites do cloroplasto que foram obtidos e utilizados na análise. Os tamanhos dos fragmentos utilizados foram combinados para formar o haplótipo de cada indivíduo. Os marcadores moleculares que se apresentam na tabela 1 são caracterizados por diferentes modos de transmissão e taxas de mutação. Detalhes adicionais sobre o material e métodos utilizados em cada estudo, parâmetros calculados e respectiva análise de dados podem ser obtidos consultando as respectivas referências.

Tabela 1. Região estudada, marcador molecular utilizado, número de populações (NP) e o número de *loci* (NL) utilizados nos estudos com pinheiro bravo baseados em marcadores moleculares, para além das estimativas da diversidade genética dentro das populações (H_s) e entre populações [G_{ST} (Nei 1987) ou F_{ST} (Wright 1965)]. Para saber o significado dos acrónimos ver texto: cpSSR, cpDNA, mtDNA e PCR-SSCP

Região	Marcador	NP	NL	G_{ST}/F_{ST}	H_s	Referência
Área de distribuição da espécie	cpSSR	48	5F	0.087 #	0.826	G. G. Vendramin (comunicação pessoal)
Área de distribuição da espécie	PCR-SSCP cpDNA	57	6	0.188	0.418	Burban and Petit (2003)
Área de distribuição da espécie	PCR-SSCP mtDNA	57	4	1	0	“
Península Ibérica	Isoenzimas	32	17	0.082	0.106	González-Martínez et al. (em publicação)
Portugal	cpSSR	12	6 F	0.020	0.87	Ribeiro et al. (2002)

F - Número de Fragmentos.

- F_{ST}

Resultados e discussão

No estudo utilizando microsatélites do cloroplasto e 48 populações representativas da área de distribuição da natural da espécie (G.G. Vendramin, comunicação pessoal), foram identificados três “pools” genéticos principais, provavelmente relacionados com a existência de refúgios durante o Quaternário, i) na região Atlântica que inclui Portugal e o Noroeste de Espanha (figura 1: cor azul), ii) no Este e Sudeste de Espanha (figura 1: cor verde), e iii) na região Oeste da área de distribuição, que inclui o Norte de Itália, a Sardenha e a ilha de Pantelleria (figura 1: cor vermelha). Neste estudo alargado, a diferenciação genética foi mais elevada do que a calculada a nível regional (p.e. Portugal e valores obtidos para França noutra estudo aqui não apresentado (Ribeiro et al. 2002), reflectindo diferentes situações na evolução da espécie (deriva genética), o impacto humano e o fluxo genético) (tabela 1). Observou-se uma diferenciação significativa entre as populações ($F_{ST} = 9\%$) e através de um método de interpolação espacial e análise de grupos foram evidenciados 13 grupos, que se reagrupam em

3 grupos principais (dados não apresentados). As significativas diferenças genéticas entre diferentes áreas geográficas parecem reflectir a existência de diferentes refúgios glaciares durante o Quaternário para esta espécie.

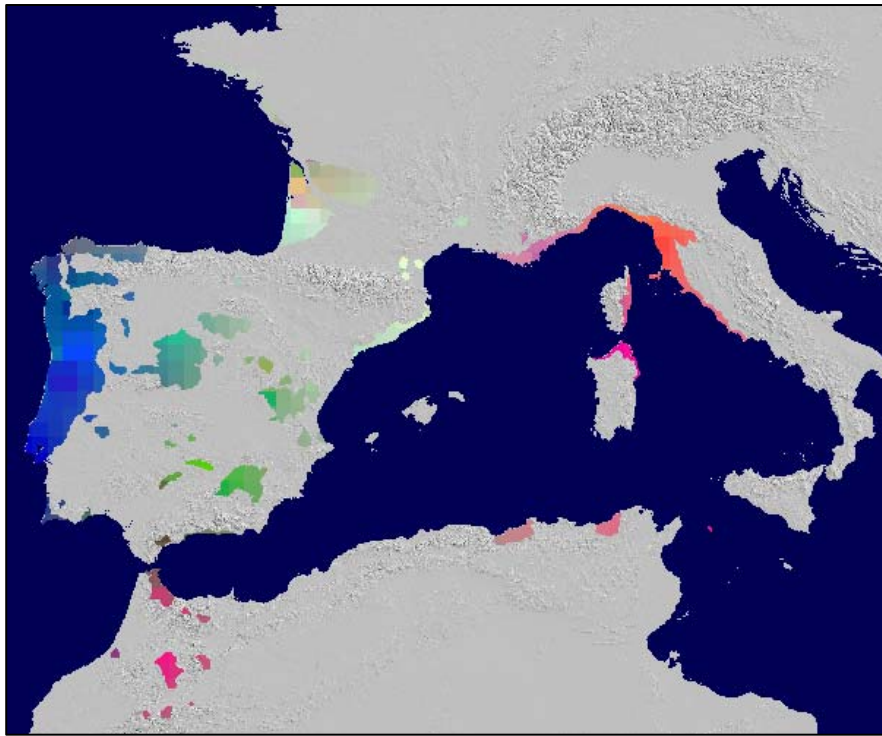


Figure 1. Análise de componentes principais efectuada com a interpolação especial das frequências dos haplótipos (16 haplótipos com frequências superiores a 1%) que evidencia a presença de três “pools” genéticos provavelmente associados a possíveis refúgios na região Atlântica, Sudeste de Espanha e no grupo de populações de Itália-Sardenha-Pantelleria . Ver texto para detalhes (G.G.Vendramin, comunicação pessoal)

As Landes, no Sudoeste de França, revelaram ser uma região onde, provavelmente, se efectuou uma mistura de material proveniente de diferentes regiões, observando-se frequências intermediárias dos haplótipos. É interessante notar que não houve congruência entre a distribuição da diversidade obtida com cpSSR com a obtida num estudo anterior utilizando terpenos (Baradat and Marpeau-Bezard 1988), os microsatélites de cloroplasto não confirmaram a presença do grupo Norte Africano que foi observada com terpenos; deve referir-se que o número de populações Africanas incluídas na análise com cpSSR foi muito pequena. O estudo com cpSSR evidenciou, ainda, uma maior extensão de zonas de contacto entre as bordas dos “pools” genéticos, onde se observaram composições haplotípicas intermediárias, possivelmente devido à herança paternal deste marcador e ao fluxo genético elevado nesta espécie via pólen. Um efeito associado à mistura de material vegetal não é de excluir pois, em Marrocos, durante o Protectorado Espanhol (1912-1956) foi introduzido pinheiro bravo de origem espanhola e Ruiz-de-la-Torre (1955) descreve plantações de origem incerta perto da Punta de Cirres. No estudo referido de G.G. Vendramin (comunicação pessoal), uma das populações marroquinas de pinheiro bravo agrupou-se com as populações do Oeste da PI o que reforça a ideia da introdução de material vegetal proveniente da PI em Marrocos.

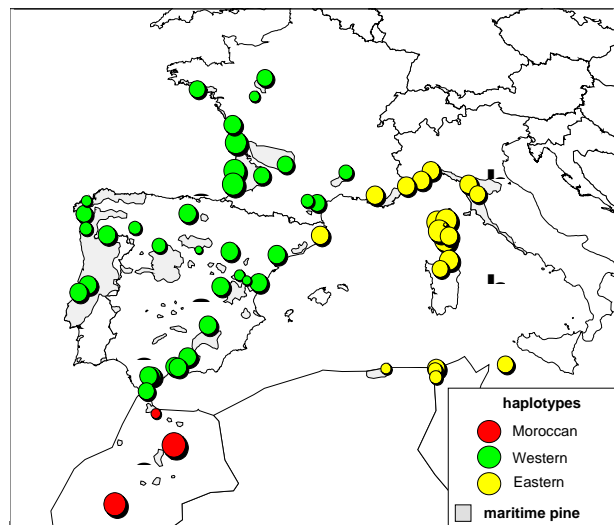


Figura 2. Distribuição dos três tipos de miótipos nas 57 populações analisadas com marcadores mitocondriais (Burban and Petit 2003)

O estudo de 57 populações de pinheiro bravo com um marcador do DNA mitocondrial (PCR-SSCP: reacção em cadeia de polimerase-polimorfismo de configuração de cadeia simples), só permitiu a discriminação de três miótipos diferentes: o primeiro em Marrocos (excepto na Punta Cires), o segundo na Península Ibérica (com excepção de uma população na Catalunha) e praticamente em toda a França continental e o terceiro no Sudeste de França, Córsega, Itália, Tunísia e Algéria (ver figura 2). Este estudo possibilitou uma imagem clara de áreas não sobrepostas colonizadas, possivelmente, a partir dos diferentes refúgios, pois nenhuma população continha composições mistas de miótipos (Burban and Petit 2003). Nesse estudo, as mesmas populações analisadas com marcadores do cloroplasto (PCR-SSCP) revelaram um nível de diferenciação genética muito mais baixa como era de prever, relativamente aos marcadores mitocondriais, com 19% da variação devida a diferenças entre populações, é importante realçar que os dois marcadores têm herança diferente nesta espécie, maternal para o mtDNA e paternal para o cpDNA. A mobilidade de ambos os vectores nesta espécie é completamente diferente (pólen e semente), pois o pólen é disperso com maior facilidade e a maiores distâncias, como a taxa de migração é maior a diferenciação entre populações diminui (Petit et al. 1993; Petit et al. 2005). No entanto, a diversidade obtida pelos marcadores do cloroplasto (PCR-SSCP) foi mais elevada do que a obtida como microsatélites do cloroplasto (9%), provavelmente devido à maior taxa de mutação dos marcadores do tipo microsatélite. Neste caso, a diferenciação pode ser sido subestimada devido a maior probabilidade de fenómenos de homoplasia (Hedrick 1999). Ainda que, num estudo utilizando simulações de computador para explorar o efeito da homoplasia nas medidas de diversidade genética baseadas em cpSSR, os autores tenham verificado haver uma influência muito pequena, por exemplo, na avaliação da diversidade haplotípica não enviesada de Nei (H_s) [Navascués, 2005 #12102].

Apesar do baixo polimorfismo detectado com os marcadores mitocondriais (3 miótipos), foi possível estabelecer uma história evolutiva provável para o pinheiro bravo, pois foi revelada a presença de três possíveis refúgios distintos para esta espécie. Esse padrão foi confirmado pelo estudo com microsatélites do cloroplasto, embora neste último caso os resultados obtidos sejam mais difusos. A distribuição dos clorótipos no estudo de Burban and Petit (2003) está também associada com a dos miótipos, mas com margens entre “pools” genéticos são mais difusas, tal como acontece com os cpSSR. Por exemplo, existiu uma possível introgressão do clorótipo K, fixado em todas as populações Marroquinas (ver figura 5c em Burban and Petit

(2003), nas populações da Península Ibérica, possivelmente devido ao fluxo genético, via pólen, através do Estreito de Gibraltar.

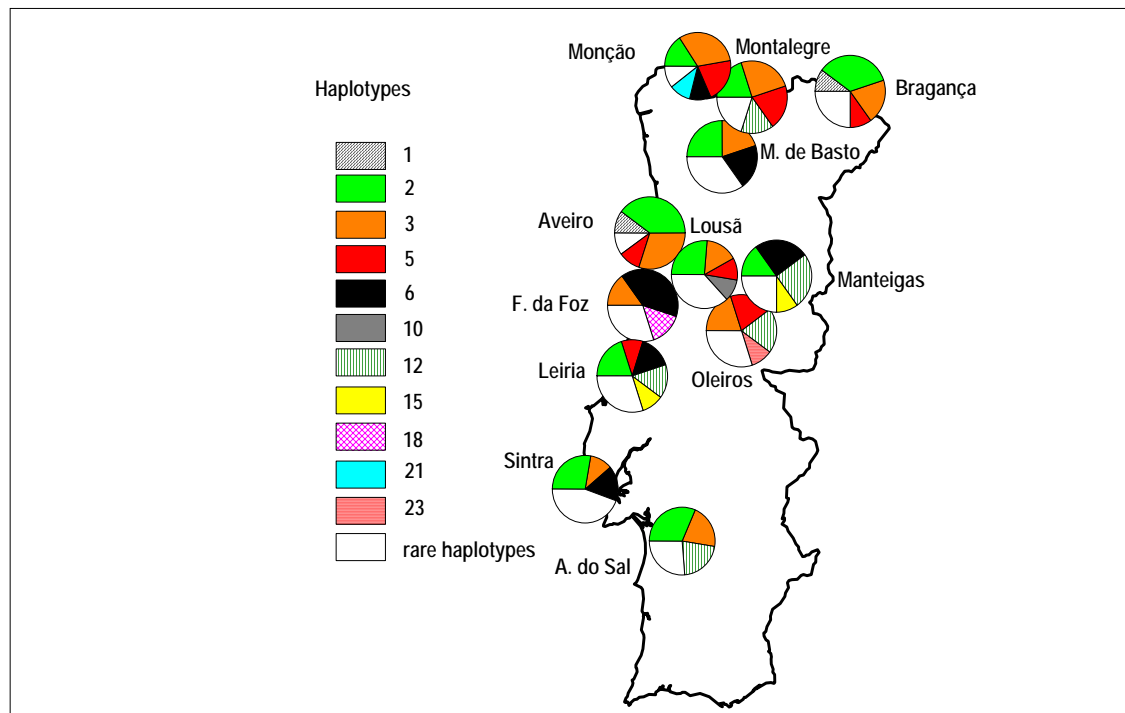


Figura 3 Distribuição dos haplótipos nas 12 populações analisadas com cpSSR. O número indica o código do haplótipo e os haplótipos raros (um indivíduo por haplótipo) estão representados a branco. Para detalhes consultar Ribeiro et al. (2001)

Foi observada na Península Ibérica (PI) uma forte estrutura genética no estudo feito por González-Martínez et al. (em publicação), em que as populações do Noroeste (Portugal e Galícia) formaram um grupo e as populações de Sudeste outro. Análises geo-estatísticas efectuadas com isoenzimas revelaram presença de uma variação clinal para alguns *loci*. A migração posglacial e efeitos fundadores são propostos como possíveis causas para a variação clinal no pinheiro bravo na PI (González-Martínez et al. 2001). Elevados níveis de diversidade genética foram observadas nas populações do Este e Sul da PI, onde estariam localizados os possíveis refúgios durante a última glaciação, como foi revelado por estudos palinológicos (Carrión 2002) e, pelo contrário, foi observada uma redução importante da diversidade genética na região Noroeste da PI (Salvador et al. 2000; González-Martínez et al. 2001; González-Martínez et al. em publicação). Uma diversidade genética mais elevada associada a refúgios pode estar associada a dinâmicas mais estáveis das populações e maiores efectivos populacionais, particularmente nas regiões montanhosas onde o risco de afunilamento genético pode ser reduzido pela possibilidade de migração altitudinal posglacial em resposta às alterações climáticas. No entanto, não podemos excluir um possível refúgio em Portugal, porque o pinheiro bravo pode ter sobrevivido durante a última glaciação em áreas protegidas a baixa altitude e junto ao Oceano Atlântico, como foi sugerido por Figueiral (1995) baseando-se em análise de carvões fósseis. De facto, a distribuição da diversidade genética no pinheiro bravo revelada por cpSSR, mostrou que ela está contida principalmente dentro das populações e a diferenciação embora significativamente diferente de zero foi muito baixa (2%) e não se observa nenhum padrão geográfico na estrutura genética da espécie.

A proximidade geográfica dos povoamentos não tem nenhuma correlação com os perfis haplotípicos (figura 3). Alguns povoamentos próximos não partilham haplótipos. Leiria e

Figueira da Foz só partilham um hapótipo apesar de não estarem muito distantes. No entanto, Sintra e Modim de Basto partilham os haplótipos mais frequentes, embora estejam geograficamente muito mais afastados. As fortes influências antrópicas nesta espécie, referidas por vários autores ao longo dos séculos, particularmente durante o século XX, parecem ter sido responsáveis pela diluição do padrão genético geográfico (Devy-Vareta 1993a; Radich and Alves 2000), além disso, o fluxo genético através do pólen pode também ter contribuído para a mistura genética observada.

Como conclusão podemos dizer que estes trabalhos foram muito úteis para reconstruir a histórica evolutiva do pinheiro bravo em diferentes escalas geográficas e, também, confirmaram a influência do Homem na alteração da estrutura genética desta espécie. Além disso, como consequência da inexistência de um padrão geográfico claro nas populações Portuguesas de pinheiro bravo a interpretação da história evolutiva desta espécie nesta região pode ser uma tarefa difícil se não impossível (Ribeiro et al. 2001) e ficou bem claro como a mistura de material vegetal pode afectar os recursos genéticos naturais.

Referências

- Alía R, Martín S, De Miguel J, Galera R, Agúndez D, Gordo J, Salvador L, Catalán G, Gil L (1996) Regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Aiton. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid
- Baradat PH, Marpeau-Bezard A (1988) Le pin maritime, *Pinus pinaster* Ait.. Biologie et génétique des terpènes pour la connaissance et l'amélioration de l'espèce. Tese de doutoramento, Universidade de Bordéus I, Bordéus
- Barbero M, Lisel R, Quezel P, Richardson DM, Romaine F (1998) Pines of the Mediterranean basin. **In:** Richardson DM (ed) Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge: 153-170
- Bennett KD, Tzedakis PC, Willis KJ (1991) Quaternary refuge of north European trees. *Journal of Biogeography* 18:103-115
- Burban C, Petit RJ (2003) Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Molecular Ecology* 12:1487-1495
- Carrión JS (2002) Patterns and processes of Late Quaternary environmental change in a montane region of southwestern Europe. *Quaternary Science Reviews* 21:2047-2066
- Carrión JS, Walker MJ, Legaz A, Chain C, Lopez A (2003) Glacial refugia of temperate, Mediterranean and Ibero-North African flora in southeastern Spain: new evidence from cave pollen at two Neanderthal man sites. *Global Ecology and Biogeography* 12:119-129
- Comes HP, Kadereit JW (1998) The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* 3:432-438
- Derory J, Mariette S, González-Martínez SC, Chagné D, Madur D, Gerber S, Ribeiro MM, Plomion C (2002) What can nuclear microsatellites tell us about maritime pine genetic resources conservation and provenances certification strategies? *Annals of Forest Science* 59:699-708
- Devy-Vareta N (1993a) A questão da florestação em Portugal: um processo de longa duração. *Política Florestal* 19:47-70

- Devy-Vareta NL (1993b) A floresta no espaço e no tempo em Portugal. A arborização da Serra da Cabreira (1919-1975). Tese de doutoramento, Faculdade de Letras da Universidade do Porto, Porto
- Figueiral I (1995) Charcoal analysis and the history of *Pinus pinaster* (cluster pine) in Portugal. *Review of Palaeobotany and Palynology* 89:441-454
- González-Martínez SC, Agúndez D, Alía R, Salvador L, Gil L (2001) Geographical variation of gene diversity of *Pinus pinaster* Ait. in the Iberian Peninsula. In: Müller-Starck G, Schubert R (eds) *Genetic Response of Forest Systems to Changing Environmental Conditions*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp 161-171
- González-Martínez SC, Gil L, Alía R (em publicação) Genetic diversity estimates of *Pinus pinaster* in the Iberian Peninsula: a comparison of allozymes and quantitative traits. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*
- Hedrick RP (1999) Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53:313-318
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907-913
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequence of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58:247-276
- Le Maitre DC (1998) Pines in cultivation: a global view. **In:** Richardson DM (ed) *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge: 407-431
- Ledig FT (1992) Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* 63:87-108
- Mariette S, Chagne D, Lezier C, Pastuszka P, Raffin A, Plomion C, Kremer A (2001) Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 86:469-479
- Mattoso J, Sousa A (1993) *História de Portugal*. Vol. II. Círculo de Leitores, Lisboa
- Navascués M, Emerson BC (2005) Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasmy. *Molecular Ecology* 14:1333-1341
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York
- Perrin H (1964) *Sylviculture*. Vol. II. Nancy
- Petit R, Kremer A, Wagner DB (1993) Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity* 71:630-641
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG (2005) Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14:689-701
- Radich MC, Alves AA (2000) *Dois séculos da Floresta em Portugal*. CELPA - Associação da Indústria Papeleira, Lisboa
- Ribeiro MM, Mariette S, Vendramin GG, Szmidt AE, Plomion C, Kremer A (2002) Comparison of genetic diversity estimates within and among populations of maritime pine using chloroplast simple-sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Ecology* 11:869-877
- Ribeiro MM, Plomion C, Petit R, Vendramin GG, Szmidt AE (2001) Variation of chloroplast simple-sequence repeats in Portuguese maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics* 102:97-103

- Ruiz-de-la-Torre J (1955) El matorral en Yebala (Marruecos español). Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid
- Salvador L, Alía R, Agúndez D, Gil L (2000) Genetic variation and migration pathways of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) in the Iberian peninsula. *Theoretical and Applied Genetics* 100:89-95
- Scott CW (1962) A summary of information on *Pinus pinaster*. *Forestry Abstracts* 23:i-xviii
- Taberlet P, Fumagalli L, Wustsaucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7:453-464
- Thirgood JV (1981) Man and the Mediterranean forest. Academic Press, London
- Vendramin GG, Anzidei M, Madaghiele A, Bucci G (1998) Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics* 97:456-463
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420