



**MARIA FERNANDA MAIA FERREIRA**

**ANÁLISES GENÉTICAS DE *Annona crassiflora* (ANNONACEAE): IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE**

**LAVRAS - MG  
2011**

**MARIA FERNANDA MAIA FERREIRA**

**ANÁLISES GENÉTICAS DE *Annona crassiflora*  
(ANNONACEAE): IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DA  
ESPÉCIE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora  
Dr<sup>a</sup>: Dulcinéia de Carvalho

**LAVRAS – MG  
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Ferreira, Maria Fernanda Maia.

Análises genéticas de *Annona crassiflora* (Annonaceae) :  
implicações para conservação da espécie / Maria Fernanda Maia  
Ferreira. – Lavras : UFLA, 2011.

127 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Dulcinéia de Carvalho.

Bibliografia.

1. Araticum. 2. Estrutura genética. 3. Unidades operacionais. 4.  
Correlograma de Mantel. 5. Estrutura genética espacial. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.973115

**MARIA FERNANDA MAIA FERREIRA**

**ANÁLISES GENÉTICAS DE *Annona crassiflora*  
(ANNONACEAE): IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DA  
ESPÉCIE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2011.

Dr. Fábio de Almeida Vieira                      UFRN

Dr. Marcio Antonio Silva Pimenta              UNIMONTES

Orientadora  
Dr<sup>a</sup>: Dulcinéia de Carvalho

Lavras – MG  
2011

*A minha mãe, Rachel, pelo exemplo, apoio, dedicação e amor que  
sempre me acompanharam,  
Ao meu irmão, Nando, pela intensa presença em minha vida, mesmo na  
ausência física,  
Ao meu amor eterno, Alê, por todo o amor a mim dedicado, paciência e  
companheirismo, essenciais para mim,  
Ao meu pai, Rogério (in memoriam), que sempre torceu por mim,  
Aos meus amigos, sempre presentes, me motivando e encorajando,*

*DEDICO*

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo agradeço a Deus, por ter guiado os meus passos para essa etapa da minha vida, e por ter me fortalecido e me amparado em cada momento desse mestrado, me auxiliando na finalização deste trabalho,

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciências Florestais, pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, José Marcio, pela atenção, paciência, boa vontade e competência em me ajudar em todas as vezes que precisei de sua ajuda!

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Ciências Florestais, pelos ensinamentos e vivências transmitidos.

A professora Dulcinéia, pelos ensinamentos, pela confiança que depositou em mim, pela convivência e pelo carinho que teve por mim durante esses dois anos.

Aos professores da UNIMONTES, Marcio, Dario e Afrânio, por terem me dado a oportunidade de aprender o que hoje eu amo fazer: pesquisar, e acima de tudo, por sempre terem confiado no meu potencial.

Aos meus colegas do antigo Laboratório de Biotecnologia, Fabiana, Luana e Patrícia, as quais me ensinaram cada procedimento com paciência e carinho, e aos do antigo Laboratório de Métodos Analíticos, em especial a Leide, Karla Nayara, Ryany, Amanda e Ligy, que me auxiliaram nas coletas e extrações de DNA.

Aos meus colegas do Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, Anna, Edu, Sidney, Rutinha, Renata, Hugo, Alisson, e em especial ao Murilo, que teve toda a paciência para me ensinar a utilizar os programas de estatística e para corrigir esse trabalho.

As minhas colegas-amigas do Mestrado, Jaque e Jô, obrigada pelo companheirismo, pela cumplicidade, pelas alegrias, pelos risos, choros antes das defesas, pelos aniversários surpresas (que foram essenciais pra nós né??), pelas ajudas... enfim, por terem lutado e vencido essa etapa comigo!!

A Thaís e Fernanda Maria, minhas companheiras de casa, que sempre estiveram comigo, me fazendo rir, principalmente nos nossos almoços e filmes coletivos, me ajudando a me sentir “em casa”, em família.

A todooooos os meus amigos, os quais eu não preciso citar nomes, pois sabem quem são e estão em meu coração!! Aos que estiveram presente fisicamente, aos que estiveram ausentes fisicamente!! Obrigada por existirem na minha vida e por me fazer sentir tão especiais pra vocês!!

Em especial e Gabi e a Ligy, duas pessoas que estiveram mais que presentes nesse mestrado, comigo! Que sabem dos “perrengues” que eu passei, das vontades de desistir e jogar tudo para o alto! Mas que sempre estiveram aqui, comigo, falando: ‘Nanda, você é mais que capaz’, ‘você vai conseguir’, ‘você é boa no que faz’, ‘força Xuh’, ‘estou aqui pra te ajudar’... Saiba que sem vocês e sem as palavras de incentivo de vocês nada disso existiria e eu não teria conseguido!!

A todos os meus familiares, que estiveram torcendo e rezando por mim nessa etapa, sempre compreendendo a minha ausência nos encontros de família,

Ao Alexandre, amor da minha vida, companheiro nessa etapa, sempre presente, desde o início, me apoiando, me ajudando (foram coletas, extrações de DNA, me acompanhado ao laboratório nos fins de semana.). Essa vitória também é sua Vida, e só posso te agradecer imensamente por ter feito parte em todas as fases do meu mestrado, tendo paciência comigo nas horas estressantes, nos momentos de choro e desespero, sempre com aquela palavra e carinho tão essenciais para mim!! Simplesmente amo você!

Ao meu irmão, Nando, que sempre se orgulhou dessa irmã mais velha, que sempre me deu força pra seguir em frente. Obrigada por sempre ter estado presente na minha vida, mesmo na ausência física! Você faz parte demais nessa minha vitória. Te amo.

A minha mãe Rachel, a qual eu dedico essa vitória!!! Agradeço imensamente a ela por todos os ensinamentos que me deu, e continua me dando; pela força e determinação que ela sempre teve e que me inspira a cada dia de luta! Sempre falando que não estava com saudades, para que eu, chorando, ficasse firme e continuasse nessa jornada!! Por me apoiar em minhas decisões, e me ajudar a ser forte sempre!! Sem você nada disso teria sido possível Mama. Te amo muito!!!

E a todos que contribuíram, de forma direta ou indireta para a minha formação e conclusão deste trabalho,

**MUITO OBRIGADA POR TUDO!!!**



“Crescer significa mudar e mudar envolve riscos, uma passagem do conhecido para o desconhecido.”

Autor Desconhecido

## RESUMO GERAL

Com o intenso processo de fragmentação no qual o Cerrado se encontra, a variabilidade genética das espécies deste bioma tem se tornado cada vez mais comprometida. Por isso é necessário a existência de programas mais efetivos de conservação para esse bioma. Dentre estas espécies, a *Annona crassiflora* possui grande importância ecológica e econômica, sendo amplamente explorada economicamente e utilizada na alimentação regional. Assim, este trabalho objetivou caracterizar a diversidade e estrutura genética e compreender a estrutura genética espacial de populações de *A. crassiflora* no Estado de Minas Gerais, além de indicar possíveis unidades operacionais para conservação do araticum. Foram utilizados dez *primers* ISSR em 192 indivíduos de oito populações do estado de Minas Gerais. Obteve-se 61 fragmentos amplificados, sendo que 57 foram polimórficos (93,4%). A diversidade genética ( $\hat{H}_e$ ) para o total das populações foi de 0,35 e a AMOVA mostrou que 85,61% da variação genética ocorre dentro das populações. A partir do dendrograma, construído pelo método UPGMA, pode-se distinguir dois grupos, um formado por C1, C2, C3, MG e CC, e outro por MC, GM e JAN. Por meio do teste de Mantel pode-se constatar a presença de uma correlação significativa entre as distâncias genética e geográfica ( $r = 0,46$ ;  $P = 0,03$ ). Nas populações C2, GM e JAN os genótipos encontraram-se distribuídos de forma aleatória. Já os indivíduos das demais populações apresentaram EGE positiva, com valores de  $S_p$  de 0,00 para as populações C1, MG e MC, 0,003 para C3 e 0,007 para CC. Pela abordagem bayesiana pode-se revelar uma alta diversidade genética entre as populações ( $\theta^B = 0,16$ ), além de se observar que as oito populações, previamente determinadas, constituem cinco populações distintas ( $K=5$ ). Seis possíveis unidades operacionais (UOs) foram definidas para a conservação de *A. crassiflora* no estado de Minas Gerais pelas análises do correlograma de Mantel e dos limites genéticos e descontinuidade genética entre as populações. Os dados obtidos para *A. crassiflora* mostram que a espécie e os ambientes de sua ocorrência devem ser priorizados em programas de conservação genética.

Palavras-chave: *Annona crassiflora*. Estrutura genética. Estrutura genética espacial. Correlograma de Mantel. Unidades Operacionais.

## ABSTRACT

Because intense fragmentation process in the Cerrado the genetic variability of the species of this biome has become increasingly compromised. Therefore it is necessary to have more effective programs for the conservation of this biome. Among these species, *Annona crassiflora* has great ecological and economic importance, being economically exploited and widely used in regional food. This study aimed to characterize the diversity and structure genetic and understand the spatial genetic structure of populations of *A. crassiflora* in Minas Gerais, and indicated possible operational units for conservation of araticum. Ten ISSR primers were used in 192 individuals from eight populations of the state of Minas Gerais. We obtained 61 fragments, of which 57 were polymorphic (93.4%). Genetic diversity ( $\hat{H}_e$ ) for the total population was 0.35 and AMOVA showed that 85.61% of genetic variation occurs within populations. From the dendrogram constructed by UPGMA method, was distinguished two groups, one formed by C1, C2, C3, MG and CC, and another by MC, GM and JAN. The Mantel test could confirm the presence of a significant correlation between genetic and geographic distances ( $r = 0.46$ ,  $P = 0.03$ ). In populations C2, GM and JAN genotypes were found randomly distributed. The individuals from other populations showed EGE positive, with values for  $Sp$  of 0.00 for populations C1, MG and MC, 0.003 for C3 and 0.007 for CC. The Bayesian approach revealed high genetic diversity among populations ( $\theta^B = 0.16$ ), and that the eight populations previously determined, are five distinct populations ( $K = 5$ ). Six possible operating units (OUs) were defined for the conservation of *A. crassiflora* the state of Minas Gerais by analysis of the Mantel correlogram, limits genetic and genetic discontinuity between populations. The data obtained for *A. crassiflora* show that the species and the environments of their occurrence should be prioritized in genetic conservation programs.

Key-words: *Annona crassiflora*. Genetic structure. Spatial genetic structure. Mantel correlogram. Operating Units.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1.	<b>INTRODUÇÃO..... 14</b>
2.	<b>REFERENCIAL TEÓRICO ..... 16</b>
2.1	<b>Destruição e fragmentação de florestas e seus efeitos na estrutura genética de populações naturais de espécies arbóreas..... 16</b>
2.2	<b>Cerrado..... 18</b>
2.3	<b>Descrição, ocorrência e potencialidades da <i>Annona crassiflora</i>..... 19</b>
2.4	<b>Conservação Genética de Espécies Arbóreas..... 20</b>
2.5	<b>Marcadores Moleculares ISSR..... 22</b>
2.6	<b>Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs) e Unidades Operacionais (UOs) de Conservação ..... 23</b>
3.	<b>CONCLUSÕES..... 26</b>
	<b>REFERÊNCIAS..... 27</b>
	<b>SEGUNDA PARTE: ARTIGOS*..... 39</b>
	<b>ARTIGO 1: Diversidade e estrutura genética de <i>Annona crassiflora</i> Mart. em populações do Estado de Minas Gerais..... 40</b>
	<b>RESUMO..... 40</b>
1.	<b>INTRODUÇÃO ..... 41</b>
2.	<b>MATERIAL E MÉTODOS..... 43</b>
3.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 50</b>
4.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 62</b>

	REFERÊNCIAS.....	63
	<b>ARTIGO 2: Estrutura genética espacial em populações naturais de <i>Annona crassiflora</i> Mart. no Estado De Minas Gerais.....</b>	<b>73</b>
	RESUMO.....	73
1.	INTRODUÇÃO.....	74
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	76
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	<b>ARTIGO 3: Conservação genética de <i>Annona crassiflora</i> Mart. (Annonaceae) no Estado De Minas Gerais.....</b>	<b>95</b>
	RESUMO.....	95
1.	INTRODUÇÃO.....	96
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	98
3.	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	108
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120
	REFERÊNCIAS.....	121
	<b>IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DE <i>Annona crassiflora</i> Mart. NO ESTADO DE MINAS GERAIS.....</b>	<b>126</b>

\* Artigos sem identificação de periódicos, com as normas NBR 6022da ABNT.

## 1. INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado ocupa 23,92% do território brasileiro, com uma extensão total de 2.036.448 km<sup>2</sup> (IBGE, 2007). A flora do Cerrado está entre as mais ricas do mundo, sendo estimada, segundo Avidos e Ferreira (2000), em 10 mil espécies, com um grande número de espécies ainda pouco estudadas, de alto potencial alimentar, madeireiro, combustível, agroindustrial, forrageiro, medicinal e ornamental. No entanto, com a degradação desse bioma, em virtude da expansão agrícola e do extrativismo predatório de espécies frutíferas, o Cerrado tem sofrido intensa redução da extensão de sua vegetação. As consequências do aumento de áreas fragmentadas nesse bioma, com mais de 50% da sua extensão original antropizada (DROS, 2004) tem sido foco de pesquisas em ecologia, genética entre outras. Portanto, as espécies nativas do Cerrado são alvo de várias abordagens de estudos, não somente por esse bioma ser um dos *hotspots* mundiais de diversidade, mas também para que os conhecimentos adquiridos possam ser aplicados na sua gestão.

Para que programas de conservação de recursos naturais sejam implementados de forma efetiva, parâmetros pertinentes a cada espécie devem ser considerados, tais como informações ecológicas, referentes ao padrão de distribuição das espécies arbóreas, estrutura genética de suas populações, grau de erosão genética e fatores determinantes da variação genética das espécies. Estas informações devem ser obtidas de forma a prevenir a extinção de populações locais de espécies arbóreas.

Além de estudos a respeito da ecologia e biologia das espécies, estudos genéticos também devem ser considerados em programas de conservação, uma vez que estes estudos propiciam informações sobre padrões das populações, como distribuição da diversidade genética, fluxo gênico, taxas de cruzamento,

dentre outras. Tais informações são extremamente relevantes, uma vez que o potencial genético das espécies é primordial para a sua evolução.

Técnicas da biologia molecular são empregadas para obtenção de informações sobre aspectos genéticos das espécies vegetais, uma vez que os marcadores moleculares são uma importante ferramenta para descrever os padrões de variabilidade genética de uma população natural e entre populações naturais. Existem vários tipos de marcadores moleculares, que se diferenciam em função da metodologia empregada com a finalidade de se detectar a variabilidade genética das espécies, tais como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e as baseadas na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites, também conhecida com SSR (*Simple Sequence Repeats*) além do ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

O araticum, *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), é uma das espécies inúmeras nativas do cerrado que apresentam grande potencial de utilização. Destaca-se pela grande diversidade em sua utilização, pois seus frutos possuem sabor peculiar, que podem ser consumidos *in natura* e também ser utilizados para fabricação de doces, geleias, sorvetes, licores, dentre outros. Trata-se de uma planta que apresenta valor ornamental e medicinal, sendo empregada popularmente como antidiarréica (sementes) e como antimicrobiana, por suas propriedades antifúngicas e antibacterianas (ALMEIDA, 1998), o que a torna uma espécie potencial para indústrias farmacêuticas e cosméticas. Devido ao intenso processo de devastação do Cerrado, que abrange regiões de populações naturais de *A. crassiflora*, existe uma enorme importância em se estudar e pesquisar a diversidade genética dessas populações, visando a sua conservação.

Espera-se que populações de *Annona crassiflora* que se encontrem sob extrativismo apresentem menor diversidade genética; que as populações

próximas geograficamente sejam próximas geneticamente, devido a facilidade do fluxo alélico; que ocorra uma estruturação genética positiva nessas populações estudadas, com indivíduos aparentados mais próximos geograficamente, visto que esta espécie é polinizada por pequenos coleópteros e sua dispersão primária é barocórica; e que populações com fluxo genético restrito apresentem maior divergência genética, podendo ser consideradas, assim, como unidades operacionais de conservação.

Considerando que o conhecimento a níveis genéticos, tais como estrutura e diversidade genética entre populações naturais, é importante para adoção de iniciativas de manejo e conservação, o objetivo deste trabalho foi o de obter informações sobre a diversidade e estrutura genética de populações naturais do *Annona crassiflora* Mart. distribuídas no Estado de Minas Gerais para a indicação de possíveis unidades operacionais. De forma específica, buscou-se neste trabalho:

- i) quantificar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações naturais;
- ii) determinar a estrutura genética intra e interpopulacional;
- iii) estimar o fluxo gênico entre as populações, e
- iv) indicar possíveis unidades operacionais para o manejo e conservação de populações de *Annona crassiflora*.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Destruição e fragmentação de florestas e seus efeitos na estrutura genética de populações naturais de espécies arbóreas**

A contínua fragmentação e degradação dos ecossistemas florestais relacionados a efeitos negativos são considerados atualmente um dos grandes



problemas ambientais mundiais (LAURANCE et al., 2002), podendo afetar diretamente a redução populacional das espécies animais e vegetais (TURNER, 1996). Perturbações antrópicas constantes em regiões onde o processo de fragmentação e destruição se iniciou há décadas se tornam importantes ameaças a biodiversidade (GOMES et. al., 2007; VIANA, 1995; TURNER, 1996).

A constante fragmentação e ocupação de áreas naturais para expansão urbana, industrial e para exploração agropecuária resultam em preocupações com a utilização dos recursos naturais (BARBOSA; MANTOVANI, 2000).

Uma das consequências mais drásticas da fragmentação de habitats é a redução e subdivisão das populações, o que pode acarretar alterações de processos ecológicos e genéticos. Neste sentido, são observadas mudanças na riqueza e composição de espécies (MURCIA, 1995), no comportamento de polinizadores e dispersores, no sistema reprodutivo e fluxo gênico de espécies vegetais (GONÇALVES, 2006). Devido às suas características reprodutivas e demográficas, árvores tropicais são particularmente vulneráveis aos efeitos da fragmentação florestal. A fragmentação de áreas contínuas pode levar a consequências negativas nas populações remanescentes, como mudanças na estrutura genética das populações remanescentes (HAMRICK; GODT; SHERMAN-BROYLES, 1992; LOVELESS; HAMRICK, 1984; NASON; HAMRICK, 1997), uma vez que a maioria das espécies arbóreas tropicais ocorre em baixa densidade, é dependente de animais para realizar sua polinização e dispersão de sementes, além de apresentar altas taxas de fecundação cruzada (BAWA, 1974; HAMRICK; MURAWSKI, 1990). Segundo Young e Boyle (2000), os efeitos genéticos mais óbvios da fragmentação florestal envolvem a perda de diversidade genética, aumento de cruzamentos endogâmicos e aumento da estrutura interpopulacional.

## 2.2. Cerrado

No Brasil, chamadas de Cerrado, as savanas chegaram a ocupar uma área heterogênea descontínua de aproximadamente dois milhões de km<sup>2</sup> de extensão em mais de dez estados, o que representa cerca de 23% da área do território brasileiro. Apesar de se encontrar bastante negligenciada (KLINK; MACHADO, 2005), é considerada a savana de maior diversidade de espécies vegetais e animais, resultado da diversidade de ambientes (FONSECA, 2000; MITTERMEIER et al., 2005; MYERS et al., 2000).

Do Cerrado extraem-se diferentes tipos de produtos animais e vegetais, sendo que mais de 200 espécies de plantas potencialmente úteis ainda não foram devidamente exploradas e cerca de 50 são pouco exploradas, e apenas algumas dezenas destas são exploradas comercialmente (GOMES; AMÂNCIO, 1995). Durante as décadas de 1970 e 1980 houve um rápido deslocamento da fronteira agrícola, com base em desmatamentos, queimadas, uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos, que resultou em 67% de áreas do Cerrado “altamente modificadas” (FILHO, 2005).

Como consequência, o Cerrado tem perdido sua riqueza e potencial, apesar de existirem várias espécies com grande potencial econômico (CARAMORI; LIMA; FERNANDES, 2004), com uma atenção especial as espécies frutíferas nativas, que são amplamente utilizadas pelo seu valor nutritivo na alimentação, pelas propriedades medicinais e até mesmo pelo potencial madeireiro dessas árvores (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006). Além do fato de que muitas famílias são mantidas e dependem economicamente dos recursos gerados pelo extrativismo dessas espécies (ALMEIDA et al., 1998). Atualmente, de acordo com relatório realizado pelo Ministério do Meio Ambiente, restam apenas 46,74% de áreas naturais preservadas neste bioma (MMA, 2007).

### 2.3. Descrição, ocorrência e potencialidades da *Annona crassiflora*

*Annona crassiflora* é uma espécie frutífera característica e exclusiva do cerrado brasileiro, conhecida também como araticum, panã, marolo, cabeça-de-negro, cascudo e pinha-do-cerrado, pertence à família Annonaceae (MELO, 2005). Seu fruto é do tipo baga subglobosa, de superfície tomentosa e tuberculada, de cor verde com o fruto em desenvolvimento, e marrom, quando maduro (LORENZI, 1998) , sendo uma das principais espécies arbóreas do Cerrado com potencial alimentar e econômico a ser explorado (MELO, 2005). Sua distribuição é bastante ampla, ocorrendo nos Cerrados dos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Mato Grosso, Maranhão, Goiás, Tocantins, Pará, Bahia e Piauí (RIBEIRO et al., 2000). A polpa é levemente adocicada e de cheiro agradável. Além do consumo *in natura* do fruto, são inúmeras as receitas de doces e bebidas que levam o sabor perfumado e forte de sua polpa.

Lorenzi (1998) descreve a *A. crassiflora* como uma espécie decídua, xerófila e hermafrodita, podendo alcançar até 8m de altura. As flores são polinizadas por pequenos coleópteros, sendo que o *Cyclocephala octopunctata* é o mais frequente (CAVALCANTE et al., 2009). Apresenta baixa taxa de frutificação (RIBEIRO et al., 1981; BRAGA FILHO, 2003), e , de acordo com Braga Filho et al. (2005) possui alta taxa de aborto dos botões florais, podendo alcançar cerca de 50% do total de frutos produzidos. A dispersão dos frutos de *A. crassiflora* ocorre primariamente por meio da gravidade (barocórica), porém Melo (2005) descreveu que besouros também podem ser dispersores, pois eles enterram a semente longe das plantas-mãe. Já Golin, Santos-Filho e Pereira (2011) descreveram que a anta (*Tapirus terrestris*) é responsável pela dispersão secundária e efetiva da *A. crassiflora*, e que o besouro *Spermologus rufus* e a

vespa *Bephratelloides pomorum* são predadores de suas sementes. A Figura 1 mostra a árvore, botões florais e o fruto da *A. crassiflora*.



FIGURA 1 *Annona crassiflora* Mart.: A: árvore; B: botões florais; C: fruto. (FONTE: COTA, 2008)

Devido ao desmatamento de áreas do Cerrado, essa espécie corre risco de extinção local. O repovoamento e preservação de reservas ainda existentes que tenham *A. crassiflora* possuem, além do valor econômico, um valor ambiental inestimável.

#### 2.4. Conservação Genética de Espécies Arbóreas

O sucesso de programas de conservação e melhoramento genético depende diretamente dos níveis de variabilidade genética das populações de interesse, pois somente a partir da variabilidade é possível que se selecione os genótipos de interesse. Uma população pode ser definida, do ponto de vista genético, por um grupo de indivíduos da mesma espécie, que se cruzam,

possuindo, por isso, propriedades comuns, ocupando o mesmo espaço, bem como tendo continuidade no tempo (SILVERTOWN; DOUST, 1993).

Para se adotar estratégias efetivas de manejo da conservação genética é necessário conhecer a estrutura genética das populações, que envolve o conhecimento dos níveis de variabilidade genética e como esta se distribui entre e dentro das populações (KAGEYAMA, 1987; DIAS; KAGEYAMA, 1991).

Associado a isto, o conhecimento e entendimento da estrutura genética espacial ao nível populacional são fundamentais para o manejo e conservação dos recursos genéticos (NG; LEE; KOH, 2004), pois a presença de estruturação genética pode influenciar padrões reprodutivos e evolutivos, sendo imprescindíveis para o estabelecimento de estratégias de amostragem em populações naturais, seja para fins de conservação ou melhoramento genético (MYAMOTO; KURAMOTO; YAMADA, 2002). Ng, Lee e Kok (2004) enumeram alguns processos evolutivos e ecológicos que podem afetar a distribuição espacial dos genótipos, tais como a dispersão de sementes, a competição inter e intraespecífica e a heterogeneidade do ambiente.

Em adição aos processos ecológicos e evolutivos, a estrutura genética espacial dentro das populações também pode alterar os padrões de distribuição espacial, pela dispersão limitada de pólen e sementes, deriva genética local, endogamia e seleção favorecendo o mesmo ou diferentes genótipos (HEYWOOD, 1991; EPPERSON, 1995). Processos como migração, fluxo alélico, deriva genética e seleção podem ser indicados por meio de estruturação espacial dos genótipos (SOKAL; MENOZZI 1982). Segundo Sebbenn (1997), quando ocorre estruturação genética espacial positiva, pode ser que exista a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados, ou seja, presença de endogamia.

O fluxo alélico pode ser caracterizado como a movimentação de alelos entre e dentro populações naturais, sendo definido como o movimento dos

gametas, sementes, indivíduos ou grupos de indivíduos e a recolonização de populações inteiras (SLATKIN, 1981). O fluxo gênico tem o efeito de homogeneizar a composição genética, de modo que se ele for o único fator operante, todas as populações irão convergir para uma mesma frequência alélica (FUTUYMA, 1992).

Reis (1996) descreve o fluxo alélico como um dos eventos que melhor caracterizam a dinâmica da movimentação dos alelos entre as populações naturais, uma vez que este implica na quantificação do movimento entre as populações, além de permitir a caracterização dos mecanismos envolvidos. Por condicionar a natureza e o nível de variabilidade genética, entre e dentro das populações, o fluxo alélico é de grande importância entre os mecanismos microevolutivos, devendo ser considerado no estabelecimento e manejo de unidades de conservação genética das espécies (MARTINS, 1987),

## **2.5. Marcadores Moleculares ISSR**

Os marcadores moleculares são as principais ferramentas para descrever os padrões da variabilidade genética de uma população natural, e com a sua utilização é possível também quantificar a variação intrapopulacional ou até mesmo usar esta informação para se avaliar a distribuição da variação entre populações (SEBBENN, 2001).

A técnica molecular chamada de *Inter Simple Sequence Repeats* (intersequências simples repetidas) ou simplesmente ISSR, que propicia alta reprodutibilidade dos resultados gerando abundante polimorfismo (LIU; WENDEL, 2001), foi desenvolvida por Zietjiewicz, Rafalski e Labuda (1994), que se basearam nos marcadores do tipo SSR. As sequências-alvo dos ISSRs são abundantes ao longo do genoma de eucariontes e evoluem rapidamente (ESSELMAN et al., 1999; FANG; ROOSE, 1997), sendo considerado um

marcador semi-arbitrário, amplificado por PCR em presença de oligonucleotídeos complementares para o microssatélite designado, podendo ser ancorado no final 3' ou 5' com 1 a 4 bases de purina ou pirimidina (LIU; WENDEL, 2001; PATZAK, 2001; SOUZA et al., 2005).

Estes marcadores oferecem uma abordagem flexível para estudar a variação de DNA na maioria dos genomas eucarióticos, com uso potencial em estudos de genética de populações, taxonomia molecular, mapeamento genômico, bem como a triagem de mutação somática (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994), e foram bem popularizados com os trabalhos de Wolfe, Xiang e Kephart (1998).

Portanto, ISSR tem provado ser útil em estudos de genética de populações e foram empregados em diversos estudos para análise de variabilidade de cultivares e em genética de populações (BELLUCCI et al., 2010; BRANDÃO, 2008; CULLEY; WOLFE, 2001; FERNANDES, 2008; GANJERA, et al., 2010; LI et al., 2010; MELO JÚNIOR, 2010; OLIVEIRA et al., 2010; SLOTTA & PORTER, 2006; SOUZA et al., 2005; VIANA e SOUZA; LOVATTO, 2010; WOLFE; LISTON, 1998; WOLFE; XIANG; KEPHART, 1998; WOLFE; RANDLE, 2001; WOODS et al., 2005; WU et al., 2010; XIAO et al., 2006).

## **2.6. Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs) e Unidades Operacionais (UOs) de Conservação**

A grande maioria das espécies apresenta-se em populações que podem estar geograficamente estruturadas, podendo essas populações estar em contato uma com as outras, terem pouco ou até mesmo nenhum contato por alguns períodos de tempo (FERNADÉZ-STOLZ, 2007). Essa ausência de contato, e consequente ausência de fluxo alélico entre as populações, podem levar a uma

diferenciação genética das populações, o que torna justificável e adequado o seu manejo e conservação de forma independente (GALLETI JR. et. al., 2008). A identificação de diferenciação genética entre as populações tem se tornado uma ferramenta indispensável e extremamente útil para a elaboração de propostas de conservação de espécies (LEITE, 2007). O conhecimento da magnitude e da distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, obtido por dados moleculares, permite estimar o alcance do fluxo gênico, sistema de cruzamento, sistema reprodutivo, entre outras estimativas genéticas.

A análise da divergência genética entre as populações, aliada aos padrões espaciais de distribuição da divergência genética entre elas, permite a identificação de unidades evolutivas significativas (ESUs) e unidades operacionais (UOs) (EIZIRIK, 1996). Essas informações são importantes na definição de programas para a conservação de populações evolutivamente significativas bem como para auxiliar no manejo racional e sustentável dessas populações (NEWTON et al., 1999).

O conceito de unidades evolutivamente significativas – ESUs – foi concebido como uma forma prática para abordar a conservação dos recursos genéticos (CAVERS et. al., 2003). Esse conceito define uma população ou um grupo de populações que se encontram diferenciadas em termos genéticos, morfológicos e/ou ecológicos das demais populações da mesma espécie refletindo um isolamento geográfico em níveis variáveis (RYDER 1986), e que merecem ser consideradas como unidades independentes para conservação por possuírem características próprias (EIZIRIK, 1996). Dadas a um amplo reconhecimento da importância da diversidade genética na política de conservação, as ESUs fornecem uma base sólida de prioridade para as atividades de gestão das populações (CAVERS, et. al., 2003). Outro conceito de ESUs, dado por Crandall et. al. (2000) consiste em populações que apresentam baixo fluxo gênico entre si e estão sob efeito de forças seletivas, tais como seleção e



deriva genética. Essa proposta aborda diferenças adaptativas entre populações baseadas em modificações genética e ecológicas, além do fato de se existirem possibilidades históricas ou recentes de ocorrência de fluxo gênico (CRANDALL et al., 2000; FRANKHAM et. al., 2002).

Aliado ao conceito de ESUs existe também o conceito de Unidades Operacionais (UOs ou Unidades de Manejo – UM), que segundo Moritz (1994), são populações com divergência significativa na frequência dos alelos, independente do quão distintos sejam esses alelos entre si. Isso significa que o baixo nível de contanto atual entre essas populações tornaria improvável uma recolonização da área de uma delas, no caso de sua extinção, o que implicaria em eliminação de genótipos únicos nos ecossistemas locais, com efeitos deletérios em termos demográficos, ecológicos e mesmo econômicos para comunidades humanas locais que utilizam estes recursos (EIZIRIK, 1996). Estas unidades são as mais apropriadas para conservação a curto prazo (FERNADÉZ-STOLZ, 2007), pois ocorrem em populações com separação geográfica suficiente para que haja divergência das frequências alélicas (EIZIRIK, 1996). Portanto, a definição de UO é a forma mais adequada de se fazer a conservação genética, de forma que não ocorra perda de alelos em regiões que estão sujeitas a forte impacto.

Diniz-Filho e Telles (2002, 2006) propuseram uma metodologia baseada no padrão espacial da variabilidade genética para definição de unidades operacionais intraespecíficas. Essa abordagem possibilita a otimização de estratégias de conservação da variabilidade intrapopulacional, de forma a definir unidades para conservação *in situ* e delinear esquemas de amostragem para coleções de germoplasma. Estas unidades possuem entre si uma alta divergência genética, o que reduz o esforço ou custo para indicação de áreas prioritárias para a conservação (DINIZ-FILHO et al., 2003; MANEL et al., 2003; TELLES et al.,

2003; PEARSE; CRANDALL, 2004; TOMIMATSU et al., 2004; WATTS et al., 2004).

A indicação de locais que possuem populações com atributos genéticos significativos capazes de garantir a manutenção de parte da herança evolutiva (ESU e UO), discernindo entre as diferentes populações é uma informação valiosa, pois estas seriam prioritárias para a conservação. Essa seria também uma investigação importante e pré-requisito fundamental para o estabelecimento de estratégias eficazes de conservação genética. Além disso, como cada população ou espécie apresenta características particulares, como nível de fluxo gênico, distribuição e história de vida, os objetivos associados a conservação devem ser atenciosamente analisados, e ainda, os riscos de extinção devem ser identificados e considerados para que finalmente possam ser definidas as unidades de conservação (TAYLOR; DIZON, 1999).

### 3. CONCLUSÕES

- As populações de araticum (*Annona crassiflora*) estudadas apresentaram altos níveis de diversidade genética (0,35), sendo que a maioria da variabilidade genética se encontra distribuída dentro das populações (85,61%);
- O fluxo alélico entre as populações é de 2,03, valor este que pode não estar sendo o suficiente para homogeneizar a diversidade genética entre as populações, uma vez que o valor da divergência genética bayesiana entre as populações estudadas foi considerado alto (0,16);
- Nas populações Curvelo 2 (C2), Grão Mogol (GM) e Januária (JAN) os genótipos encontraram-se distribuídos de forma aleatória, enquanto os indivíduos das demais populações apresentaram estrutura genética espacial (EGE) positiva, que pode ser resultado de um fluxo alélico restrito entre os

indivíduos dentro destas populações, sugerindo que a fragmentação do Cerrado e a perturbação do habitat natural dessa espécie tem afetado a estruturação genética espacial dentro das populações de araticum, bem como a distribuição da variabilidade genética entre as mesmas;

- Foi possível indicar seis possíveis Unidades Operacionais para a conservação da diversidade genética de *Annona crassiflora* no estado de Minas Gerais, sendo ela: Montes Claros (MC), Grão Mogol (GM), Januária (JAN), Morro da Garça (MG), Carmo da Cachoeira e uma composta pelas três populações de Curvelo (C1, C2 e C3). Além disso, seria indicado que as amostragens nessas áreas respeitassem a distância genética indicada pelo correlograma matricial, que foi de 295 km.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 464 p.

ALMEIDA, S. P. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Org.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. p. 245-285.

AVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. Frutos do cerrado: preservação gera muitos frutos. **Biociência**, Brasília, n. 15, jul-ago 2000. Disponível em: <<http://www.biociencia.com.br/revista/bio15/frutos.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2009.

BARBOSA, L. M.; MANTOVANI, W. Degradação ambiental: conceituação e bases para o repovoamento vegetal. In: BARBOSA, L. M. (Org.). Workshop sobre recuperação de áreas degradadas da serra do mar e formações florestais

litorâneas, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2000. p. 34-40.

BAWA, K. S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**, New Jersey, USA, v. 28, p. 85-92, jan. 1974.

BELLUCCI, E. et al. Genetic diversity and geographic differentiation in the alternative legume *Tripodion tetraphyllum* (L.) Fourr. in North African populations. **Plant biology**, Marylan, USA, v. 13, n. 2, p. 381-190, mar. 2011.

BRAGA FILHO, J. R. **Comportamento produtivo do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) nos cerrados do Estado de Goiás.** 2003. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2003.

BRAGA FILHO, J. R. et al. Danos de *Telemus chapadanus* (Casey 1922) sobre o florescimento do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) no Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 1, p. 25-29, 2005.

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais.** 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.

CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from brazilian savannas, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n. 2, p.253-259, jun. 2004.

CAVALCANTE, T. R. M. et al. Polinização e formação de frutos em araticum. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.1. p.13-21, jul. 2009.

CAVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J. A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L.

(Meliaceae) in Costa Rica. **Conservation Genetics**, Utah, v. 4, n. 5, p. 571–580, set. 2003.

COTA, L. G. **Diversidade genética de *Annona crassiflora* Mart. (annonaceae) do norte do estado de Minas gerais**. 2008. 45 f. Monografia (Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros. 2008.

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

CULLEY, T. M.; WOLFE, A. D. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens*, as indicated by isozyme and ISSR molecular markers. **Heredity**, Sheffield, v.86, n.5, p.545–556, maio. 2001.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotropica**, Itabuna, v. 3, n.3, p.119-127, set. 1991.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; TELLES, M. P. C. Optimization procedures for establishing reserve networks for biodiversity conservation taking into account population genetic structure. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 207-214. 2006.

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

DINIZ-FILHO, J. A. F. et al. Spatial autocorrelation and red herrings in geographical ecology. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 53-64, jan. 2003.

DROS, J. M. **Administrando os Avanços da Soja: Dois Cenários de Expansão do Cultivo da Soja na América do Sul.** Amsterdã: AIDEnvironment,. 2004. 73 p.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 4, p 23-29. 1996.

EPPERSON, B. K.; ALLARD, R. W. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. **Genetics**, Austin, v. 121, n. 2, p. 369-377, fev. 1989.

ESSELMAN, E. J. et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. Inesperata (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, New Jersey, v.8, v. 3, p. 443-451, mar. 1999.

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v. 95, n. 3, p. 408-417, ago. 1997.

FERNADÉZ-STOLZ, G. P. **Estudos evolutivos, filogeográficos e de conservação em uma espécie endêmica do ecossistema de dunas costeiras do Sul do Brasil, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia – Ctnomydae) através de marcadores moleculares microssatélites e DNA mitocondrial.** 2007. 193 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

FERNANDES, R.C., **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) no Norte de Minas Gerais - 2008.** 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.

FILHO, M. A. Pesquisadores mapeiam propriedades funcionais de frutas nativas do Cerrado. **Jornal da Unicamp**, Campinas, v. 295, p. 5, ago. 2005.

FONSECA, G. A. **The Designing Sustainable Landscapes**. Washington: Conservation International. 2000.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press. 2002. 612 p.

FUTUYMA, D. J. **Biologia reprodutiva**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 1992. 631 p.

GALLETI, J. R. P. M., et al. 2008. Genética da Conservação da Biodiversidade Brasileira. In: FRANKHAM R.; BALLOU. J. D.; BRISCOE, D. A. (Org.). **Fundamentos da genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2008. 280 p.

GANJERA, B. B. et al. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, Utah, v. 32, n. 3, p.491–498, nov. 2010.

GOLIN, V.; SANTOS-FILHO, M.; PEREIRA, M. J. B. Dispersão e predação de sementes de araticum no Cerrado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n.1, p. 101-107, jan. 2011.

GOMES, A. A. et al. Avaliação do impacto da fragmentação de florestas nativas sobre a mesofauna edáfica na região de Dourados-MS. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 612-618, maio-jun. 2007.

GOMES, M. A.; AMÂNCIO, R. **Relatório do diagnóstico participativo de agroecossistemas**. Lavras: Editora UFLA. 1995. 69 p.

GONÇALVES, A. C. **Estrutura genética em populações naturais de *Dimorphandra mollis* Benth.** 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BROYLES, S. L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, Amsterdam, v. 6, n. 1-4, p. 95-124, mar. 1992.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKY, D. A. The breeding structure of tropical tree populations. **Plant Species Biology**, Utah, v. 5, n. 1, p. 157-165, jun. 1990.

HEYWOOD, J. S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Califórnia, v. 22, p. 335-355, nov. 1991.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 out. 2009.

KAGEYAMA, P. Y. Conservação 'in situ' de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, Piracicaba, n. 35, p. 7-37, abr. 1987.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Montpellier, v. 19, n. 3, p. 707-713, jun. 2005.

LAURANCE, W. F. et al. Ecosystem decay of Amazonian forest fragments: a 22-year investigation. **Conservation Biology**, Montpellier, v.13, n.3, p. 605-618, jun. 2002.

LEITE, K. C. E. **Análise da Estrutura Genética e Biologia Reprodutiva do Papagaio – Verdadeiro (*Amazona aestiva*)**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília, Brasília. 2007.

LI, S. et al. Genetic diversity and differentiation of cultivated ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) populations in North-east China revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Genet Resource and Crop Evolution**, Witzhausen, v. 57, n. 1, p. 1-10, jan. 2010.



LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 205-208, set. 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras/ Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v. 02. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. 384 p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Califórnia, v. 15, p. 65-95, nov. 1984.

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

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação "in situ". **IPEF**, Piracicaba, v. 35, p.71-78, abr. 1987.

MELO JÚNIOR, A. F. **Diversidade, estrutura genética e fenologia de populações naturais de *Cavanillesia arborea* K. Schum no norte do estado de Minas Gerais**. 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG. 2010.

MELO, D. L. B. **Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart**. 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG. 2005.

MITTERMEIER, R. A. et al. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil, **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v.1, n.1, p.14-21, jul. 2005.

MMA. **Mapa de cobertura vegetal dos biomas brasileiros**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 2007. 16 p.

MORITZ, C. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 9, n. 10, p. 373-375, out. 1994.

MURCIA, C. Edge effects in fragmented forest: implications for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 10, n. 2, p. 58-62, fev. 1995.

MYAMOTO, M.; KURAMOTO, N.; YAMADA, H. Differences in spatial autocorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand. Mazz. (Betulaceae). **Heredity**, Sheffield, v. 89, n. 4, p. 273-279, out. 2002.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, New York, v. 403, n. 24, p. 853-858, fev. 2000.

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

NEWTON, A. C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 14, n. 4, p. 140-145, abr. 1999.

NG, K. K.; LEE, S.; KOH, C. L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, n. 3, p. 657-669, mar. 2004.

OLIVEIRA, L. O. et al. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p.86-93, jan. 2010.

PATZAK, J. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). **Euphytica**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 9-18, ago. 2001.

PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. Beyond F-ST: Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, Amsterdam v. 5, n. 5, p. 585-602, set. 2004.

REIS, M. S. **Distribuição e dinâmica a variabilidade genética em populações naturais de Palmitreiro *Euterpe edulis* - Mart.** 1996. 210 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1996.

RIBEIRO, J. F. et al. **Araticum (*Annona crassiflora* Mart.)**. Jaboticabal: Embrapa Cerrados. 2000. 52 p.

RIBEIRO, J. F., et al. Aspectos fenológicos de espécies nativas do cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 32, 1981. Teresina. **Anais...** Teresina: Sociedade Botânica do Brasil. 1981.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado, **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 5, n. 3, p. 253-260, set-dez. 2006.

RYDER, O. A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v.1, n. 1, p. 9-10, jul. 1986.

SEBBENN, A. M. **Distribuição da variação genética de populações de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* Mart., O.ktze) por caractere quantitativos e isoenzimas.** 210 f. 2001. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2001.

SEBBENN, A. M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiáceas) a partir de isoenzimas.** 1997. 107 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 1997.

SILVERTOWN, J. W.; DOUST, J. L. **Introduction to plant population biology**. Oxford: Blackwell Scientific. 1993. 210 p.

SLATKIN, M. Estimating level of gene flow in natural populations. **Genetics**, Austin, v. 99, n. 2, p. 323-335, out. 1981.

SLOTTA, T. A. B.; PORTER, D. M. Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 151, n. 3, p. 345-354, jul. 2006.

SOKAL, R. R.; MENOZZI, P. Spatial autocorrelation of HLA frequencies in Europe support demic diffusion of early farmers. **American Naturalist**, Chicago, v. 119, n. 1, p. 1-17, jan. 1982.

SOUZA, V. Q. et al. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 569-575, 2005.

TAYLOR, B. L.; DIZON, A. E. First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 8, supl. 1, p. 11-18, dez. 1999.

TELLES, M. P. C. et al. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC (‘cagaiteira’ - Myrtaceae) in Central Brazil: spatial analysis and implications for conservation and management. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 4, n. 6, p. 685-595, nov. 2003.

TOMIMATSU, H. et al. Genetic diversity and multilocus genetic structure in the relictual endemic herb *Japonolirion osense* (Petrosaviaceae). **Journal Of Plant Research**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 13-18, fev. 2004.

TURNER, I. M. Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 200-209, abr. 1996.

VIANA E SOUZA, H. A.; LOVATTO, M. B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Utah, v. 38, n. 1, p. 49-56, fev. 2010.

VIANA, V. M. Conservação da biodiversidade de fragmentos florestais em paisagens tropicais intensamente cultivadas. In: \_\_\_\_\_. **Abordagens interdisciplinares para a conservação da biodiversidade biológica e dinâmica do uso da terra no novo mundo**. Gainesville: Belo Horizonte. 1995. p. 135-154.

WATTS, P. C. et al. D. J. Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale*. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, n. 10, p. 2931-2945, out. 2004.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DOYLE, J. J. (Org.). **Molecular Systematics of Plants II**. 1998.

WOLFE, A. D.; RANDLE, C. P. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. **Systematic Botany**, Laramie, v. 26, n. 1, p. 120-130, jan. 2001.

WOLFE, A. D.; XIANG, Q. Y.; KEPHART, S. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat markers. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 7, n. 9, p. 1107-1125, set. 1998.

WU, Y. et al. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, Utah, v. 38, n. 1, p. 63–72, fev. 2010.

WOODS, K. et al. Pattern of variation and systematics of *Nymphaea odorata*: I. evidence from morphology and inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Systematic Botany**, Laramie, v. 30, n. 3, p. 471-480, jul. 2005.

XIAO, M. et al. ISSR analysis of the genetic diversity of the endangered species *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) ying from Western Sichuan Province, China. **Journal of Integrative Plant Biology**, Xiangshan, v. 48, n. 10, p. 1140-1146, out. 2006.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. **Genomics**, Utah, v. 20, n. 2, p. 176–183, mar. 1994.

**SEGUNDA PARTE**  
**ARTIGOS\***

**\*Artigos sem identificação de periódicos, com as normas NBR 6022da ABNT.**

**ARTIGO 1: DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE  
*Annona crassiflora* Mart. EM POPULAÇÕES DO ESTADO DE  
MINAS GERAIS**

**RESUMO**

Com o intenso processo de fragmentação no qual o Cerrado se encontra, a variabilidade genética das espécies deste bioma tem se tornado cada vez mais comprometida, podendo ser perdida com o avanço desse processo de degradação. Dentre estas espécies, a *Annona crassiflora*, conhecida como araticum, possui grande importância ecológica e econômica, nos setores alimentícios, farmacêuticos e de cosméticos, e por isso sofre intenso extrativismo. Com o objetivo de caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações de *A. crassiflora*, foram coletados 192 indivíduos de oito localidades no Estado de Minas Gerais. Dez *primers* ISSR foram utilizados para obter os dados genéticos desta espécie. Obteve-se 61 fragmentos amplificados, sendo que 57 foram polimórficos (93,4%). A diversidade genética ( $\hat{H}_e$ ) para o total das populações foi de 0,35, mostrando razoável reserva de variabilidade genética da espécie nos locais amostrados. A AMOVA mostrou que 14,39% e 85,61% da variação genética foram distribuídas entre e dentro das populações, respectivamente, uma taxa considerada moderada para espécies arbóreas. A partir do dendrograma, construído pelo método UPGMA, pode-se distinguir dois grupos, sendo o grupo I constituído pelas três populações Curvelo (C1, C2 e C3), Morro da Garça (MG) e Carmo da Cachoeira (CC), e o grupo II por Montes Claros (MC), Grão Mogol (GM) e Januária (JAN). O teste de Mantel apontou a existência de correlação positiva e significativa entre distância genética e geográfica ( $r = 0,46$ ;  $P = 0,03$ ). Os dados obtidos para *A. crassiflora* mostram



que a espécie e os ambientes de sua ocorrência devem ser priorizados em programas de conservação genética

## **INTRODUÇÃO**

A contínua degradação e fragmentação dos ecossistemas florestais são considerados atualmente um dos grandes desafios ambientais (LAURANCE et al. 2002), podendo afetar diretamente a redução populacional das espécies animais e vegetais (TURNER, 1996). Perturbações antrópicas constantes em regiões onde o processo de destruição e fragmentação se iniciou há décadas se tornam importantes ameaças a biodiversidade (GOMES et al., 2007; VIANA, 1995; TURNER 1996). Dessa forma faz-se necessário uma mudança na forma de utilização dos recursos naturais, seja para ocupação urbana, industrial e/ou para exploração agropecuária (BARBOSA; MANTOVANI, 2000).

Processos ecológicos são altamente influenciados pela fragmentação, que pode levar a redução e divisão das populações, e segundo Lowe et al. (2005), dependendo das alterações e das características da fragmentação, as espécies vegetais podem responder de várias maneiras a este processo. Em programas de conservação os dados sobre ecologia e genética das espécies devem ser considerados, uma vez que a partir destes dados podem-se inferir informações sobre padrões populacionais, tais como distribuição da diversidade genética, fluxo alélico, taxas e sistemas de cruzamento, dentre outras (NG; LEE; KOH, 2004). Essas informações são extremamente relevantes, já que elas revelam o potencial genético das espécies, condição esta primordial para perpetuação das espécies (MYAMOTO; KURAMOTO; YAMADA, 2002).

O Cerrado é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade com a presença de diversos ecossistemas (FONSECA, 2000), e é o segundo maior bioma do Brasil, ocupando 21% do território nacional

(BORLAUG, 2002). Além disso, o Cerrado é considerado um dos *hotspots* mundiais de diversidade (MYERS et al., 2000). Conforme descrito por Machado et al. (2004) a área desmatada do Cerrado até o ano de 2002 era de 54,9% da área original (cerca de 1,58 milhões de hectares), e, de acordo com relatório realizado pelo Ministério do Meio Ambiente, restam apenas 46,74% de áreas naturais preservadas neste bioma (MMA, 2007). Com o grande aumento do extrativismo e pela crescente expansão das fronteiras agrícolas, o Cerrado está perdendo sua área, sua riqueza e potencial (KLINK; MACHADO, 2005). As consequências deste aumento de áreas fragmentadas nesse bioma têm sido foco de várias abordagens de estudos, tais como em ecologia e genética, não somente pela importância deste bioma, mas também para que os conhecimentos adquiridos possam ser utilizados na sua gestão.

Dentre as inúmeras frutíferas nativas do Cerrado que apresentam potencial de utilização em sistemas tradicionais de produção agrícola, o araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.), da família Annonaceae, destaca-se pelo sabor de seus frutos, que são muito apreciados e, por isso, facilmente comercializáveis. Os frutos do araticunzeiro podem ser consumidos *in natura*, como, também, ser utilizados na fabricação de compotas, doces, geleias, sorvetes, sucos, licores e vinagres. Trata-se de uma planta que apresenta valor ornamental e medicinal, sendo empregada popularmente como antidiarréica (sementes) e como antimicrobiana, por suas propriedades antifúngicas e antibacterianas (ALMEIDA, 1998).

As populações naturais de *A. crassiflora* encontram-se em regiões que estão sofrendo intenso processo de devastação, principalmente em áreas utilizadas para pasto e intenso de extrativismo (RIBEIRO; PASQUAL, 2005), o que a torna uma espécie importante para pesquisas referentes à caracterização genética, com vista à sua conservação. Espera-se que as populações que se

encontrem em regiões de extrativismo possuam menor diversidade genética que as demais populações.

Considerando que o conhecimento genético, como a estrutura e diversidade genética entre populações naturais, é importante para adoção de iniciativas de manejo e conservação, o objetivo deste trabalho foi quantificar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Annona crassiflora* Mart. no Estado de Minas Gerais, em áreas do Cerrado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Locais de coleta**

Os locais de coleta estão situados no estado de Minas Gerais, abrangendo as regiões de ocorrência da *Annona crassiflora* (Tabela 1). Folhas jovens de 24 indivíduos adultos foram coletadas em cada população, identificadas, acondicionadas em sacos de papel e mantidas em sacos de plástico com sílica gel. Essa amostragem foi realizada de forma aleatória ao longo das áreas, sem distância mínima determinada para inclusão dos indivíduos. Todos os indivíduos foram marcados e identificados quanto às suas coordenadas geográficas. Esse material foi conduzido ao Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas da Universidade Federal de Lavras - UFLA, e ficou armazenado a -20°C até o momento dos procedimentos de extração do DNA. Foi utilizado o método proposto por Santos e Vieira (2005) para avaliação do estado de preservação das áreas amostradas, onde foi avaliada a presença de gado, corte seletivo e fogo, e atribuiu-se notas de 1 a 5, e realizando a somatória dessas notas ao final, onde os maiores valores correspondem ao maior grau de preservação (Tabela 1). Foi avaliada também a intensidade do extrativismo

nessas áreas, e foram atribuídas notas de 0 a 5, com os maiores valores indicando maior intensidade de extrativismo da espécie (Tabela 1).

Tabela 1 Populações amostradas de *Annona crassiflora* no Estado de Minas Gerais. *n* = número de indivíduos. **P** = grau de preservação; **E** = intensidade de extrativismo

<b>Pop</b>	<b>Localidade</b>	<b>Latitude S</b>	<b>Longitude W</b>	<b>n</b>	<b>P</b>	<b>E</b>
JAN	Januária	15° 48' 33"	44° 36' 65"	24	3	5
GM	Grão Mogol	16° 56' 66"	42° 89' 98"	24	3	5
MC	Montes Claros	16° 71' 67"	43° 86' 66"	24	4	4
C1	Curvelo	18° 88' 45"	44° 44' 64"	24	2	1
C2	Curvelo	18° 82' 34"	44° 52' 73"	24	2	1
C3	Curvelo	18° 77' 03"	44° 49' 16"	24	2	1
MG	Morro da Garça	18° 50' 18"	44° 57' 93"	24	2	1
CC	Carmo da Cachoeira	21° 44' 92"	45° 08' 99"	24	3	2

As oito populações encontram-se em ambientes diversificados, descritos a seguir.

### ***População JAN***

Esta área se encontra dentro da Área de Proteção Ambiental do Rio Pandeiros (APA-PANDEIROS), no município de Januária, sendo que foi constatada a presença de gado, e mesmo assim não apresenta sinais de degradação, com ausência de desmatamento e queimadas, podendo assim ser considerada como uma área preservada. Nesta região é realizado o extrativismo dos frutos de *Annona crassiflora* para produção de produtos alimentícios e vendidos a cooperativas da região.

### ***População GM***

A população GM encontra-se em uma reserva agroextrativista denominada Projeto de Assentamento Americana, do município de Grão Mogol,

MG. Até a década de oitenta explorou-se nessa área espécies nativas com o intuito de produção de carvão vegetal, com ocorrência frequente de incêndio. Atualmente, esta área se encontra em processo de regeneração, com ausência de incêndios, sendo que o último aconteceu há cinco anos. Não há presença de pasto nesta área, e os moradores realizam coleta de frutos de *Annona crassiflora*, com a preocupação de não coletar todos os frutos, deixando alguns nas árvores. Estes frutos são utilizados na produção de polpas e doces, que são revendidos para cooperativas da região.

### ***População MC***

A área de estudo pertence a uma reserva ecológica bem preservada, existente há dez anos, com predominância de vegetação nativa de Cerrado *Stricto Sensu*, com ausência de pastos, cortes e queimadas. Atualmente não há coleta predatória dos frutos de *A. crassiflora*, porém, antes da implantação da reserva, os moradores coletavam frutos para a comercialização.

### ***População CI***

Área de fragmento de Cerrado que não apresenta vestígios de corte raso para a produção de carvão, porém há coleta de lenha seca caída no chão por parte da população local. O fragmento é limitado por estradas, pastagens e plantios de eucalipto, e há vestígios de fogo no interior do fragmento. A *A. crassiflora* é uma das espécies mais abundantes neste fragmento, sendo que há presença de regenerantes.

### ***População C2 e C3***

Estas áreas são formadas principalmente por pastagem, *A. crassiflora*, com regenerantes, e *Caryocar brasiliense* (pequi).

### ***População MG***

Nessa área o pasto presente se encontra degradado e é arborizada principalmente com *A. crassiflora* e *C. Brasiliense*. Apesar de haver relatos de roçada, a maior parte dos arbustos e regenerantes de *A. crassiflora* e *C. brasiliense* foi deixada na área, inclusive os de pequeno porte, e além disso não há coleta de frutos para fins comerciais, segundo os moradores da localidade.

### ***População CC***

Pertencente a uma propriedade rural no Sul de Minas, esta área era uma região original de Cerrado *Stricto Sensu*, porém foi modificada em um sistema silvopastoril, de aproximadamente 30 anos, com a presença de *Annona crassiflora* e *Brachiaria decumbens*. (MELO, 2009).

A Figura 1 mostra a localização geográfica das oito populações estudadas e a Tabela 2 representa a matriz de distância geográfica entre as populações.

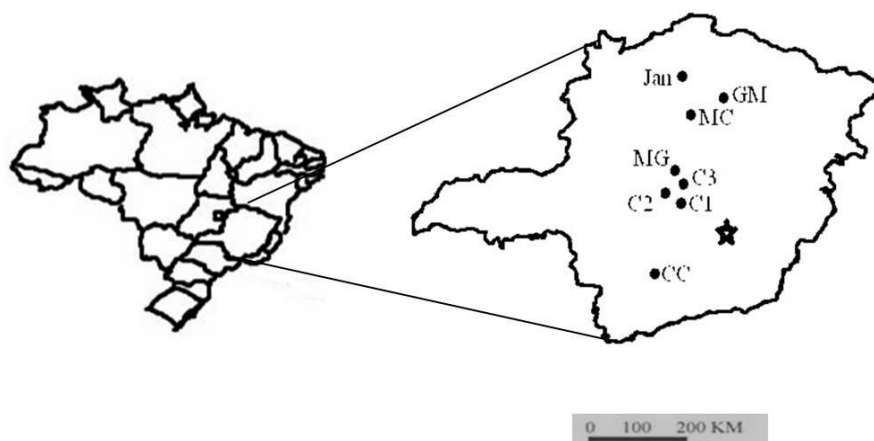


Figura 1 Localização geográfica das oito populações de *Annona crassiflora*, no Estado de Minas Gerais, selecionadas para o estudo (JAN, população de Januária; GM, população de Grão Mogol; MC, população de Montes Claros; MG, população de Morro da Garça; C1, C2, C3, populações de Curvelo; CC, população de Carmo da Cachoeira. Estrela: Belo Horizonte)

Tabela 2 Matriz de distância geográfica entre as populações de *Annona crassiflora*, em quilômetros

	C1	C2	C3	MG	CC	MC	GM	JAN
C1	-							
C2	10,9	-						
C3	13,9	6,9	-					
MG	44,9	36,2	31,1	-				
CC	291,8	296,6	303,1	330,8	-			
MC	247,7	243,5	236,8	211,4	539,4	-		
GM	304,5	303,6	296,7	278,7	587,6	104,5	-	
JAN	376,5	370,1	364,0	334,8	664,7	146,6	197,5	-

### Extração do DNA genômico

O método de extração utilizado foi o Moog e Bond (2003), sendo utilizado 50mg de material foliar, macerado em 600µL de tampão de extração e PVP (polivinilpirrolidona), em um almofariz. O tampão extração constituiu de 100mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA 0,5M pH 8,0; 500mM de NaCl 5M;

0,7% de SDS 7%; 50µg/mL de Proteinase K (10mg/mL) e 50µg/mL de RNase (10mg/mL). O material macerado foi colocado em tubos de 1,5mL, incubados em estufa a uma temperatura de 37°C e deixados por aproximadamente 12 horas. Em seguida os tubos foram retirados da estufa e adicionou-se 320µL de NaCl 5M. Após serem agitados (vortex), centrifugou-se por 5 minutos a 12000 rpm e pipetou-se a fase superior (aquosa) para um novo tubo. Para precipitação do DNA, adicionou-se 800µL de isopropanol e as amostras foram deixadas a -20°C por 3 horas. Foi feita uma centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm a 4° C. A este material acrescentou-se 500µL de etanol 70% e centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos, sendo que este procedimento foi realizado por duas vezes. Efetuou-se então uma última lavagem, utilizando-se 500µL de etanol 100%. O pellet foi deixado em temperatura ambiente para secar e, finalmente, os ácidos nucléicos foram solubilizados com tampão 200µL de TE (1mM de Tris e 0,1mM EDTA).

### **Amplificação do DNA com *primers* ISSR**

As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador GeneAmp PCR System 9700, com volume total de 12µL, contendo 2µL de DNA genômico diluído 50X; 1,2µL de Tampão PCR 10X (500mM de Tris-HCl pH 8,0; 200mM de KCl; 2,5mg/mL de BSA; 200mM de Tartrazine e 1% de Ficol); 1,20µL de de dNTP + MgCl<sub>2</sub> (dNTP a 2,5mM; MgCl<sub>2</sub> a 25mM; 0,15µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 2µL de cada *primer* (2 mM). Os *primers* utilizados encontram-se descritos na Tabela 2. Após uma desnaturação inicial a 94°C, por 5 minutos, as reações foram submetidas a 37 ciclos de amplificação iguais para todos os *primers*. Cada ciclo consistiu de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 47°C e 1 minuto a 72°C. Ao final do último ciclo, a extensão final, foi por 7 minutos, a 72°C. Após as reações, os fragmentos amplificados foram



separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (5 mg/mL). O tamanho dos fragmentos foi estimado em comparação com um marcador de peso molecular (“DNA ladder”) de 1 kb, e os géis foram interpretados quanto à presença (1) e à ausência (0) de fragmentos, onde cada fragmento amplificado foi considerado como um loco. Com base nesses resultados, foi construída uma matriz de dados binários para avaliar o nível de polimorfismo referente às populações.

### **Análise Genética dos Dados**

A partir da matriz de dados binários foi estimado o conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), cujo objetivo é indicar o quanto o marcador utilizado (*primer*) poder ser informativo. Este parâmetro é calculado pela fórmula  $PIC = 2p_i(1-p_i)$  (BHAT, 2002), onde,  $P_i$  é a frequência de ocorrência de bandas polimórficas e  $1-P_i$  é a frequência do alelo nulo, nos diferentes *primers*. Este valor de PIC significa a probabilidade de encontrar o marcador em dois estados diferentes (ausente e presente) em duas plantas aleatoriamente da população. O valor de PIC varia de zero para os marcadores monomórficos e 0,5 para os polimórficos (ROLDÁN-RUIZ, et al., 2000).

O número de marcadores polimórficos foi analisado por *bootstrap*, realizado pelo do programa GENES (CRUZ, 2001), para determinar se estes foram suficientes para estimar precisamente os parâmetros genéticos desejados nas populações. A análise da diversidade genética intrapopulacional e de fluxo alélico entre as populações foi realizada com o auxílio do programa computacional PopGene (versão 1.32) (YEH et al, 1997), assumindo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) entre as populações. Foram estimados o número de alelos observados ( $na$ ), o número efetivo de alelos ( $ne$ ), a heterozigosidade esperada ( $\hat{H}_e$ ), a porcentagem de locos polimórficos e o fluxo

alélico indireto, calculado da seguinte forma:  $Nm = 0,5 (1 - GST)/GST$  (MCDERMOTT; MCDONALD, 1993).

Para inferir sobre a estrutura genética das populações foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992). Por meio da decomposição total dos componentes entre e dentro das populações utilizando o software ARLEQUIN, versão 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007), assumindo-se que todos os indivíduos dentro das populações possuíam o mesmo padrão de acasalamento.

Foi realizada uma estimativa da divergência genética bayesiana  $\theta^b$  entre os pares de populações, com auxílio do programa HICKORY v. 1.0 (HOLSINGER; LEWIS, 2003). A partir dessa estimativa foram realizados os agrupamentos, pelo coeficiente de Jaccard, por meio do método UPGMA (método da média aritmética não ponderada). A consistência dos agrupamentos foi obtida por meio da utilização de 1.000 permutações com o programa TFPGA (*Tools for Population Genetic Analysis*) versão 1.3 (MILLER, 1997). Adicionalmente, foi realizado o teste de Mantel entre as populações, pelo programa computacional NTSYS 2.0 (ROHLF, 2001), com 1.000 permutações, para testar a correlação entre as distâncias genética e geográfica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Seleção dos *primers* ISSR, qualidade do Marcador e número ótimo de fragmentos amplificados**

Dentre 15 *primers* testados, 10 foram escolhidos, que apresentaram fragmentos de amplificação e de boa intensidade. Com a utilização desses *primers* foi gerado um total de 61 fragmentos amplificados, sendo 57

polimórficos e quatro monomórficos. O número de fragmentos por *primers* variou de 3 a 8 (Tabela 3).

Na Tabela 2 é descrito o valor do PIC (Conteúdo Informativo de Polimorfismo). Este parâmetro é utilizado para indicar a qualidade do marcador. Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com PIC superior a 0,5 são considerados satisfatórios em conteúdo informativo, com valores entre 0,25 e 0,50 mediantemente informativos, e, com valores inferiores a 0,25 possuem pouca informação. Analisando os 10 *primers* utilizados nesse estudo, pode-se observar que este parâmetro variou de 0,34 a 0,47, com valor médio de 0,39, o que classifica esses locos como marcadores medianos em conteúdo de informação.

Tabela 3 Nome, seqüências, número de fragmentos e o Conteúdo Informativo de Polimorfismo (PIC) de cada *primer*

<i>Primer</i>	Seqüência	Nº de fragmentos	PIC
(CA)6-R	CAC ACA CAC ACA <b>R</b>	3	0,47
JOHN (AG)7-YC	AGA GAG AGA GAG AGY <b>C</b>	6	0,38
MANNY (CAC)4-RC	CAC CAC CAC CAC <b>RC</b>	7	0,34
UBC 807 (AG)8-T	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GT</b>	8	0,39
UBC 834 (AG)8-YT	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GYT</b>	7	0,37
UBC 835 (AG)8-YC	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GYC</b>	8	0,44
UBC 840 (GA)8-YT	GAG AGA GAG AGA GAG <b>AYT</b>	6	0,38
UBC 841 (GA)8-YC	GAG AGA GAG AGA GAG <b>AYC</b>	5	0,46
UBC 855 (AC)8-YT	ACA CAC ACA CAC ACA <b>CYT</b>	3	0,38
UBC 857 (AC)8YG	ACA CAC ACA CAC ACA <b>CYG</b>	8	0,42
<b>TOTAL</b>		<b>61</b>	<b>0,39</b>

R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T).

A Figura 2 mostra um gel de agarose fotografado com luz ultravioleta e corado com brometo de etídeo (5mg/mL) com o perfil de amplificação do

*primer* UBC 841. Os fragmentos que apresentaram coloração fraca e baixa resolução foram descartados.

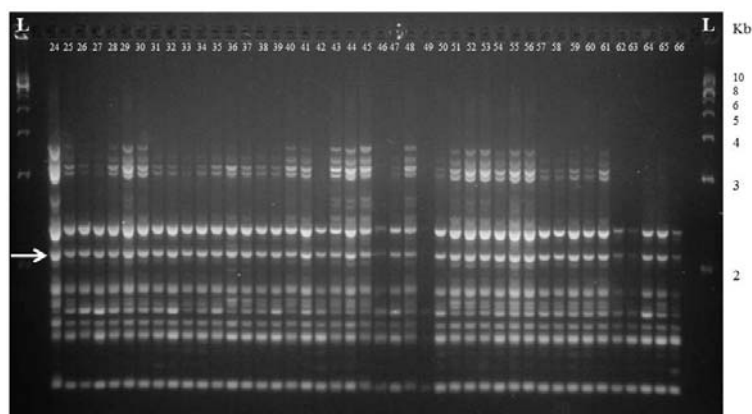


Figura 2 Padrão de fragmentos resultante da amplificação do *primer* UBC 841 em indivíduos de *Annona crassiflora* Mart. L: ladder 1Kb. Seta: fragmentos amplificados. Kb: peso molecular dos fragmentos do ladder

O número ótimo de fragmentos para se estimar com confiabilidade a diversidade genética da espécie foi estimado em 41 (Figura 3), a partir do qual o valor de estresse foi inferior a 0,05 e a correlação de 0,948. A correlação se aproximou do seu valor máximo (1) a partir desse número de fragmentos, sugerindo que a quantidade de *primers* utilizados e o número de fragmentos amplificados obtidos foram suficientes para se analisar e obter associações entre os indivíduos (KRUSKAL, 1964; SILVEIRA; RUAS; RUAS, 2003). Outros estudos que utilizaram marcadores dominantes obtiveram resultados semelhantes. Cavallari (2004), estudando a estrutura genética de *Encholirium* (Bromeliaceae) por meio de marcadores RAPD, mostrou que a partir de 50 fragmentos já era o suficiente se analisar a diversidade genética da espécie. Brandão (2008), ao caracterizar a diversidade genética de *Myrcia splendens* (Mytaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento, estimou 55 como número ótimo de fragmentos. Para a espécie *Aspidosperma polyneuron*

(Apocynaceae), Torezan et al. (2005) observaram que a obtenção de 50 fragmentos RAPD foi suficiente para caracterizar a variabilidade genética da espécie. Estudando a diversidade genética de *Cavanillesia arborea* em populações do Norte de Minas Gerais, Melo Júnior (2010) estimou em 57 fragmentos como número suficiente para suas análises.

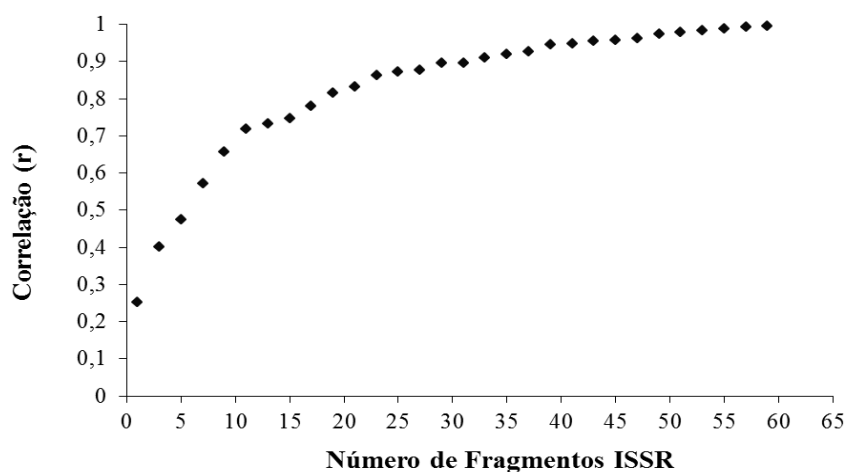


Figura 3 Coeficiente de correlação do número ótimo de fragmentos amplificados para *Annona crassiflora* Mart.

### Diversidade e Estrutura Genética das Populações

Os 10 *primers* utilizados geraram um total de 61 locos, dos quais 57 foram considerados polimórficos, o que representa 93,4% do total. Os locos são considerados polimórficos quando a frequência do alelo mais comum for menor ou igual a 95% (NEI, 1987). Os valores dos parâmetros genéticos populacionais são apresentados na Tabela 4. O número de alelos observados ( $N_a$ ) variou de

1,50 a 1,82, e o número de alelos efetivos ( $N_e$ ) variou de 1,32 a 1,65, nas populações JAN e C2, respectivamente. Os valores médios de  $N_a$  e  $N_e$  foram 1,93 e 1,61, respectivamente.

A porcentagem de locos polimórficos variou de 49,18%, para os indivíduos da população JAN a 81,97% para os indivíduos da população C2. Alguns trabalhos utilizando marcadores dominantes (BRANDÃO, 2008; CHEN et al., 2006; XIA et al., 2007) têm considerado a porcentagem de locos polimórficos como medida de diversidade genética. Utilizando marcadores ISSR, Su, Wang e Ouyang (2009) encontraram 73,14% de locos polimórficos para *Pseudotaxus chienii*, enquanto Shao et al. (2009) obtiveram uma porcentagem de locos polimórficos de apenas 44,28% em *Primula merrilliana*. Viana e Souza e Lovato (2010), estudando as espécies *Dimorphandra wilsonni* e *D. mollis*, por meio de marcadores ISSR, encontraram uma porcentagem de locos polimórficos menor na primeira espécie (40%) em relação à segunda (70,4%), indicando uma alta diferenciação genética para populações de *D. wilsonni*. Jeong et al. (2010) encontraram 44,3% de locos polimórficos para a espécie *Megaleranthis saniculifolia* com este mesmo tipo de marcador molecular.

Tabela 4 Estimativas de diversidade genética em oito populações de *A. crassiflora*.  $N_a$ : número de alelos observados;  $N_e$ : número de alelos efetivos;  $H_e$ : diversidade genética de Nei; P: porcentagem de locos polimórficos e Nm: fluxo gênico

Populações	$N_a$	$N_e$	$H_e$	P(%)	Nm
JAN	1,50 (0,50)	1,32 (0,36)	0,19 (0,20)	49,18	-
GM	1,60 (0,50)	1,40 (0,39)	0,23 (0,20)	59,02	-
MC	1,60 (0,50)	1,42 (0,40)	0,24 (0,21)	59,02	-
C1	1,72 (0,45)	1,55 (0,38)	0,31 (0,20)	72,13	-
C2	1,82 (0,38)	1,65 (0,35)	0,35 (0,18)	81,97	-
C3	1,65 (0,47)	1,52 (0,42)	0,28 (0,21)	65,57	-
MG	1,80 (0,40)	1,64 (0,36)	0,35 (0,18)	80,33	-
CC	1,72 (0,45)	1,56 (0,41)	0,30 (0,21)	72,13	-
Conj. das pops.	1,93 (0,25)	1,61 (0,30)	0,35 (0,14)	93,44	2,03

( ): desvio padrão.

Utilizando marcadores RAPD, também dominante, Batistini et al. (2010) conseguiram revelar 72,8% de locos polimórficos para *Anemopaegma arvense*. Também com marcador RAPD, Cota (2008) obteve, em populações naturais de *Annona crassiflora* nos municípios de Montes Claros, Grão Mogol e Campo Azul, no Norte de Minas Gerais, um total de 91,72% de locos polimórficos, valor este próximo ao encontrado para este parâmetro no presente estudo (93,44%). Estas duas primeiras populações são próximas as amostradas no presente estudo. Porém os valores deste índice para as populações MC (59,02%), GM (59,02) e JAN (49,18) são menores do que os encontrado por Cota (2008) em populações próximas a essas, cujos valores foram 59,31% na população de Grão Mogol, 71,05% em Montes Claros e 76,55% em Campo Azul.

Avaliando-se a diversidade genética de Nei ( $H_e$ ), observou-se que o menor índice foi de 0,19 para a população JAN, enquanto as populações C2 e MG apresentaram o maior valor, de 0,35. Analisando o conjunto das populações, a diversidade genética média foi de 0,35, o que é considerado um alto índice de diversidade genética para espécies arbóreas. As populações JAN, GM são as populações que estão sob extrativismo, e a população MC, mesmo não havendo relatos de extrativismo atual, já sofreu coleta de forma intensa há mais de 10 anos atrás. Esses fatores podem ter refletido em uma diversidade genética mais baixa nessas populações, cujos valores foram de 0,19, 0,23 e 0,24 respectivamente. Utilizando marcadores ISSR, Fernandes (2008) obteve um índice de diversidade genética de 0,35 para populações de *Caryocar brasiliense* no Norte de Minas Gerais, espécie esta que também sofre extrativismo. Telles et al. (2010) também encontraram um valor razoável de diversidade genética (0,27) para *Tibouchina papyrus* com o uso de marcadores RAPD e Oliveira et al. (2008), estudando a variabilidade genética de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), obtiveram um valor de  $H_e$  de 0,30 para as populações estudadas.

Em outros trabalhos com o auxílio de isoenzimas e com espécies da mesma família da *Annona crassiflora* (Annonaceae), como a *Xylopia emarginata* (JAEGER et al., 2007), foi encontrado o valor de *He* de 0,39 e 0,45 para duas populações em campos rupestres e para a pindaíba (*Xylopia brasiliensis*), o valor médio de *He* foi de 0,36 (PINTO; CARVALHO, 2004). Observa-se que os valores aqui encontrados foram próximos aos trabalhos supracitados, mesmo que os marcadores tenham natureza diferente, no caso as isoenzimas, que são codominantes.

Telles et al. (2003), pesquisando populações naturais de *A. crassiflora* com o auxílio de marcadores isoenzimáticos, encontraram valores de diversidade genética que variaram entre 0,189 a 0,460, com um média de 0,357. Com o uso de marcadores moleculares RAPD, Cota (2008) observou um valor de *He* médio de 0,30 para *A. crassiflora*, sendo que esse índice variou de 0,21 a 0,30 entre as populações estudadas.

Os valores encontrados nos trabalhos citados se assemelham aos níveis de diversidade genética das populações analisada no presente estudo. No entanto, é importante salientar que estes dados foram obtidos de estimativas históricas, pois os indivíduos estudados são adultos, e provavelmente já se encontravam nos ambientes antes do início do processo de fragmentação do Cerrado. Para obter resultados mais definidos dos efeitos da fragmentação de ambientes na diversidade genética seriam necessários estudos com várias gerações. No entanto, considerando a longevidade das espécies arbóreas, estes estudos se tornam inviáveis, sendo que estudos com progênies dessas populações podem ser considerados para se acessar a diversidade genética das demais gerações.

A Tabela 5 apresenta valores de diversidade genética para algumas espécies arbóreas, obtidos com diferentes marcadores moleculares.



Tabela 5 Índices de diversidade genética (*He*) em espécies arbóreas, obtidos por diferentes marcadores moleculares

<b>Espécie</b>	<b>Marcador molecular</b>	<b><i>He</i></b>	<b>Referência</b>
<i>Annona crassiflora</i>	Isoenzima	0,35	Telles et al. (2003)*
<i>Annona crassiflora</i>	RAPD	0,30	Cota (2008)*
<i>Astronium urundeuva</i>	Microsátelite	0,63	Caetano et al. (2008)
<i>Caryocar brasiliensis</i>	ISSR	0,35	Fernandes (2008)
<i>Caryocar brasiliensis</i>	Microsátelite	0,84	Collevatti, Grattapaglia e Hay (2001)
<i>Cavanillesia arborea</i>	ISSR	0,43	Melo Júnior (2010)
<i>Dimorphandra mollis</i>	Isoenzima	0,46	Gonçalves et al. (2010)
<i>Dimorphandra mollis</i>	RAPD	0,30	Oliveira et al. (2008)
<i>Eremanthus erythopappus</i>	ISSR	0,36	Arriel (2009)
<i>Eremanthus glomerulatus</i>	ISSR	0,40	Arriel (2009)
<i>Eremanthus incanus</i>	ISSR	0,34	Arriel (2009)
<i>Mabea fistulifer</i>	RAPD	0,39	Goulart (2005)
<i>Machaerium villosum</i>	Isoenzima	0,48	Botrel; Carvalho (2004)
<i>Myrcia splendens</i>	ISSR	0,33 e 0,37	Brandão (2008)
<i>Tabebuia aurea</i>	Microsátelite	0,89	Braga et al. (2007)
<i>Tabebuia ochracea</i>	Microsátelite	0,40	Moreira; Fernandes; Collevatti (2009)
<i>Tibouchina papyrus</i>	RAPD	0,27	Telles et al. (2010)
<i>Vellozia epidendroides</i>	Isoenzima	0,46	Franceschinelli et al. (2006)
<i>Vellozia leptopetalas</i>	Isoenzima	0,22	Franceschinelli et al. (2006)
<i>Xylopia brasiliensis</i>	Isoenzima	0,36	Pinto; Carvalho (2004)*
<i>Xylopia ermaginata</i>	Isoenzima	0,39 e 0,45	Jaeger et al. (2007)*

\***Annonaceae**

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi calculada de acordo com Nei (1978). Na Tabela 6 encontram-se os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as populações de *A. crassiflora*.

Tabela 6 Análise da variância molecular (AMOVA) em oito populações de *Annona crassiflora* Mart. GL = graus de liberdade e SQ = soma do quadrado dos desvios.  $F_{st} = 0,14$

Fonte de Variação	GL	SQ	Componentes da variância	Varição Total (%)	P
Entre populações	7	136,02	0,64888	14,39	< 0,001
Dentro de populações	184	710,08	3,85915	85,61	< 0,001
Total	191	846,11	4,50		
$F_{st}$	0,14				

Esta análise mostra que 85,61% ( $P < 0,001$ ) da diversidade genética se encontra dentro das populações de *A. crassiflora*. Estes resultados, além de serem condizentes com os de outros trabalhos (APTE et al., 2006; FERNANDES, 2008; FREITAS; LEMOS-FILHO; LOVATO, 2008; GOULART; RIBEIRO; LOVATO, 2005; NYBOM, 2004; SOARES et al., 2008; TELLES et al., 2003), corroboram o pressuposto de que em populações de espécies perenes e de fecundação cruzada, as estimativas de diferenciação genética entre populações, obtidas por meio de marcadores dominantes, são normalmente menores que 28% (NYBOM; BARTISH, 2000). De uma forma geral, as espécies arbóreas apresentam sistema misto de reprodução, bem como uma eficiência na dispersão de sementes e de pólen, o que favorece um fluxo gênico que ocorra a longas distâncias, aumentando assim a variação genética encontrada dentro das populações diminuindo a divergência genética entre as mesmas (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Por outro lado, o tipo de polinização pode limitar o movimento do pólen, interferindo assim na distribuição genética entre e dentro das populações. No caso do araticum, na ausência do agente polinizador, ocorre a autopolinização, porém os frutos não são formados (CAVALCANTE et al., 2009). Além disso, segundo Nybom (2004), espécies que têm suas sementes dispersadas por gravidade possuem uma maior variação genética entre

populações, quando comparadas com espécies que possuem dispersão por mecanismos mais eficientes, como animais, vento e/ou água. Em *A. crassiflora*, a polinização ocorre por coleópteros e a dispersão primária é barocórica. Estes dois fatores podem resultar em valores intermediários de divergência genética entre as populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984), como o encontrado no presente trabalho (14,39%).

As estimativas de distância genética bayesiana ( $\theta^B$ ) entre as oito populações de *A. crassiflora* são mostradas na Tabela 7.

A média da distância genética  $\theta^B$  entre as oito populações foi de 0,16. A menor distância genética foi de 0,10 entre as populações C1 e C2, enquanto que C2 e MC e C3 e MC são as mais distantes geneticamente (0,23). Vale ressaltar que as menores distâncias estão associadas aos genótipos mais semelhantes e as maiores aos mais divergentes.

Tabela 6 Distâncias genéticas entre pares de populações ( $\theta^B$ ) de *Ammona crassiflora*. C1, C2, C3, populações de Curvelo; MG, população de Morro da Garça; CC, população de Carmo da Cachoeira; MC, população de Montes Claros; GM, população de Grão Mogol; JAN, população de Januária

POP	C1	C2	C3	MG	CC	MC	GM	JAN
<b>C1</b>	-							
<b>C2</b>	0,10	-						
<b>C3</b>	0,12	0,9	-					
<b>MG</b>	0,13	0,11	0,05	-				
<b>CC</b>	0,11	0,15	0,17	0,12	-			
<b>MC</b>	0,20	0,23	0,23	0,19	0,18	-		
<b>GM</b>	0,17	0,17	0,18	0,15	0,15	0,11	-	
<b>JAN</b>	0,19	0,22	0,23	0,18	0,15	0,20	0,11	-

O valor de distância genética (0,16) indica uma alta divergência genética entre as populações, que pode ter sido influenciada pela distância geográfica entre as mesmas, e pelo sistema de polinização e dispersão dos frutos, que estão

intimamente relacionados ao fluxo alélico entre as populações. Neste estudo o valor de fluxo alélico observado para o conjunto das populações foi igual a 2,03 (Tabela 4). Este valor pode não estar sendo o suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética nessas populações, uma vez que a dispersão dos frutos é realizada pela gravidade e a polinização por pequenos besouros e ambos mecanismos não alcançam longas distâncias. Em princípio, seria necessário um fluxo alélico superior a quatro migrantes por geração, para que os efeitos da deriva genética sejam contrapostos com consequente redução da divergência genética entre as populações (SLATKIN, 1987; WRIGHT, 1951).

Um dendrograma foi construído pelo método do UPGMA a partir dos dados de distância genética bayesiana ( $\theta^B$ ) das populações de *A. crassiflora* (Figura 4). Pela análise do dendrograma pode-se observar a formação de dois grupos principais, apresentando consistência máxima do nó (100%). Um grupo foi formado por cinco populações (C1, C2, C3, MG e CC) e outro grupo formado por três populações (MC, GM, JAN).

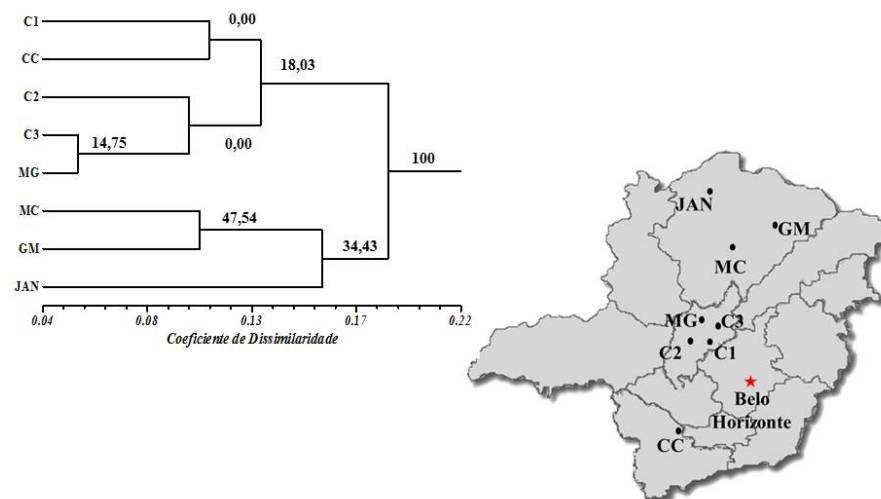


Figura 4 Dendrograma upgma das populações de *annona crassiflora*, calculado de acordo com a distância genética bayesiana ( $\Theta^B$ ). Os números acima dos nós indicam a consistência dos mesmos, em porcentagem, após 1.000 permutações. C1, C2 e C3: populações de Curvelo; MG: Morro da Garça; CC: Carmo da Cachoeira; MC: Montes Claros; GM: Grão Mogol; JAN: Januária

Esta divisão em dois grupos pode estar associada a localização geográfica dessas populações, já que houve um agrupamento das populações localizadas geograficamente, (Figura 4),

O resultado do Teste de Mantel revelou haver correlação positiva e significativa entre as distâncias genética e a geográfica nas populações de *A. crassiflora* ( $r = 0,46$ ;  $P = 0,03$ ). Telles et al. (2003) também reportaram a existência de correlação entre distribuição espacial e genética em populações naturais de *A. crassiflora*, mas salientaram a importância de se amostrar um número maior de populações.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As populações de *Annona crassiflora* estudadas apresentaram um valor médio de diversidade genética igual a 0,35, porém, nas populações MC, GM e JAN esta diversidade genética foi baixa (0,19, 0,23 e 0,24 respectivamente). A maioria da variabilidade genética se encontra distribuída dentro das populações (85,61%), o que evidencia o potencial destas para a conservação genética da espécie. Apesar disso, a distância genética bayesiana média encontrada entre as populações foi de 0,16, valor este considerado intermediário para espécies arbóreas tropicais, o que pode ser reflexo do fluxo alélico baixo entre as populações ( $Nm=2,03$ ). Níveis mais altos de fluxo alélico poderiam diminuir a perda da diversidade genética e manter as populações viáveis em longo prazo (GONÇALVES et al., 2010). Porém, estas populações de *A. crassiflora* se encontram em ambientes fragmentados, principalmente as populações do Norte de Minas Gerais que sofrem intenso extrativismo de seus frutos, e assim acabam impedindo a dispersão natural das sementes. Conseqüentemente os níveis de diferenciação genética entre essas populações pode aumentar nas próximas gerações, tornado assim, essencial a realização de estudos nas progênies dessas populações, para deste modo, então, avaliar os impactos genéticos causados pela fragmentação e o extrativismo nesta espécie.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. P. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Org.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. p.245-285.

APTE, G.S., et al. Genetic diversity analysis in *Gaultheria fragrantissima* Wall. (Ericaceae) from the two biodiversity hotspots in India using ISSR markers. **Current Science**, Bangalore, v. 91, n.12, p. 1634-1640, dec. 2006.

ARRIEL, D. A. A. **Diversidade genética e distribuição genética espacial de três espécies de *Eremanthus erythropappus* no Parque Ecológico Quedas do Rio Bonito, Lavras, Minas Gerais**. 2009. 47 f. Monografia (Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. MG. 2009.

BARBOSA, L. M.; MANTOVANI, W. Degradação ambiental: conceituação e bases para o repovoamento vegetal. In: BARBOSA, L. M. (Org.). **Workshop sobre recuperação de áreas degradadas da serra do mar e formações florestais litorâneas**, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2000. p. 34-40.

BATISTINI, A. P. et al. Genetic diversity of natural populations of *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae) in the Cerrado of São Paulo State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 52-63, jan., 2009.

BHAT, K. V. Molecular data analysis. In: \_\_\_\_\_. **Proceedings of the Short-Term Training Course on Molecular Marker Application in Plant Breeding**, New Delhi: ICAR. 2002. 378 p.

BORLAUG, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: BAILEY, R. (ed.). **Global warming and other eco-myths**. Roseville: Competitive Enterprise Institute, 2002, p. 29-60.

BOTREL, M. C. G.; CARVALHO, D. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.27, n.4, p.621-627, out-dez. 2004.

BOTSTEIND. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, Utah, v. 32, p.314–331, mai. 1980.

BRAGA, A. C. et al. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, New Jersey, v.7, n.1, p.53-56, jan. 2007.

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.

CAETANO, S. et al. The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology**, New Jersey, v. 17, p. 3147-3159, jul. 2008.

CAVALCANTE, T. R. M. et al. Polinização e formação de frutos em araticum. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.1. p.13-21, jul. 2009.

CAVALLARI, M. M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.



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

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, New Jersey, v. 10, n. 2, p. 349-356, fev. 2001.

COTA, L. G. **Diversidade genética de *Annona crassiflora* Mart. (annonaceae) do norte do estado de Minas gerais**. 2008. 45 f. Monografia (Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros. 2008.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: versão Windows. Viçosa: UFV, 2001. 642 p.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin: a software for population data analysis**. Version 3.1. Geneva: University of Geneva, 2007. Disponível em: <<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>>. Acesso em: 10 set. 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, p. 179–191, jun. 1992.

FERNANDES, R.C., **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no Norte de Minas Gerais** - 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras-UFLA-Lavras. 2008.

FONSECA, G. A. **The Designing Sustainable Landscapes**. Washington: Conservation International. 2000.

FRANCESCHINELLI, E. V. et al. The genetic diversity of two brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, n. 4, p. 585–592, abr. 2006.

FREITAS, V. L. O.; LEMOS-FILHO, J. P. ; LOVATO, M. B. Contrasting genetic diversity and defferentiations of populations of two sucessional stages in a Neotropical pionner tree (*Eremanthus erythropappus*, Asteraceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 388-398, abr. 2008.

GOMES, A. A. et al. Avaliação do impacto da fragmentação de florestas nativas sobre a mesofauna edáfica na região de Dourados-MS. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 612-618, maio-jun. 2007.

GONÇALVES A. C. et al. Conservação de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae) baseada na estrutura genética de populações naturais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 95-101, jan-fev. 2010.

GOULART, M. F.; RIBEIRO, S. P.; LOVATO, M. B. Genetic, morphological and spatial characterization of two populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in different successional stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 275-284, mar. 2005.

HOLSINGER K. E.; LEWIS P. O. **HICKORY v. 1.0**. 2003. Department of Ecology and Evolutionary Biology, The University of Connecticut. Disponível em: <[www/eeb.uconn.edu](http://www/eeb.uconn.edu)>. Acesso em: 05 out. 2010.

JAEGER, P. et al. Caracterização genética de populações naturais de *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 73, p. 91-99, mar. 2007.

JEONG, J. H. et al. Genetic diversity and structure of the endangered species *Megaleranthis saniculifolia* in Korea as revealed by allozyme and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, Jena, v. 289, n. 1-2, p. 67–76, out. 2010.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Montpellier, v. 19, n. 3, p. 707-713, jun. 2005.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1-27, mar. 1964.

LAURANCE, W. F. et al. Ecosystem decay of Amazonian forest fragments: a 22-year investigation. **Conservation Biology**, Montpellier, v.13, n.3, p. 605-618, jun. 2002.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Califórnia, v. 15, p. 65-95, nov. 1984.

LOWE, A. J. et al. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, Sheffield, v. 95, p. 255-273, fev. 2005.

MACHADO, R. B. et al. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Relatório Técnico não publicado. Conservação Internacional do Brasil, Brasília – DF. 2004. 23 p.

MCDERMOTT, J. M.; MCDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 353-373, set. 1993.

MELO JÚNIOR, A. F. **Diversidade, estrutura genética e fenologia de populações naturais de *Cavanillesia arborea* K. Schum no norte do estado de Minas Gerais.** 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG. 2010.

MELO, D. L. B. **Dispersão, Fenologia e Conservação de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae).** 2009. 75 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG. 2009.

MILLER, M. P. **Tools for population genetics analyses (TFPGA) 1.3:** A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Disponível em: <<http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>. 1997>. Acesso em: 13 ago. 2010.

MMA. **Mapa de cobertura vegetal dos biomas brasileiros.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 2007. 16 p.

MOGG, R. J.; BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, Dordrecht, v. 3, n. 4, p. 666-668, out. 2003.

MOREIRA, P. A.; FERNANDES, G. W.; COLLEVATTI, R. G. Fragmentation and spatial genetic structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. **Forest Ecology and Management**, Utah, v. 258, n. 12, p. 2690–2695, nov. 2009.

MYAMOTO, M.; KURAMOTO, N.; YAMADA, H. Differences in spatial autocorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand. Mazz. (Betulaceae). **Heredity**, Sheffield, v. 89, n. 4, p. 273-279, out. 20.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, New York, v. 403, n. 24, p. 853-858, fev. 2000.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York : Columbia University Press, 1987. 512 p.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Austin, v. 89, n. 3, p. 586-590, jul. 1978.

NG, K. K.; LEE, S.; KOH, C. L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, n. 3, p. 657-669, mar. 2004.

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

NYBOM, H.; BARTISH, I. V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Utah, v. 3, n. 2, p. 93-114, nov. 2000.

OLIVEIRA, D. A. et al. Variabilidade genética de populações de fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) da região norte do Estado de Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 355-363, mar-abr. 2008.

PINTO, S. I. C.; CARVALHO, D. Estrutura genética de populações de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Sprengel) por isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 597-605, jul-set. 2004.

RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M. **Tecnologia da produção do marolo**. Lavras: Editora UFLA. 2005.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 2.11. New York: Applied Biostatistics. 2000. 470 p.

ROLDÁN-RUIZ, et al. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 125–134, abr. 2000.

SANTOS, R. M.; VIEIRA, F. A. Análise estrutural do componente arbóreo de três áreas de Cerrado em diferentes estádios de conservação no Município de Três Marias, Minas Gerais, Brasil. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 4, p. 399-408, out-dez. 2005.

SHAO, J. W. et al. Genetic diversity within and among populations of the endangered and endemic species *Primula merrilliana* in China. **Biochemical Systematics and Ecology**, Utah, v. 37, n. 6, p. 699–706, dez. 2009.

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F. Assessment of genetic variability within and among coffee progênies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 329-336. 2003.

SLATKIN, M. The average number of sites separating DNA sequences drawn from a subdivided population. **Theoretical Populations Biology**, Utah, v. 32, n. 1, p. 42-49, ago. 1987.

SOARES, T. N. et al. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. **Genetica**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 9–19, jan. 2008.

SU, Y.; WANG, T.; OUYANG, P. High genetic differentiation and variation as revealed by ISSR marker in *Pseudotsaxus chienii* (Taxaceae), an old rare conifer endemic to China. **Biochemical Systematics and Ecology**, Utah, v. 37, n. 5, p.579–588, nov. 2009.

TELLES, M. P. C. et al. Estrutura genética em populações naturais de *Tibouchina papyrus* (pau-papel) em áreas de campo rupestre no cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 291-300, abr-jun. 2010.

TELLES, M. P. C. et al. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 123-129, mar. 2003.

TOREZAN, J. M. D. et al. Genetic variability of pré and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 171-180, mar. 2005.

TURNER, I. M. Species loss in fragments of tropicas rain forest: a review of the evidence. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 200-209, abr. 1996.

VIANA E SOUZA, H. A.; LOVATTO, M. B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Utah, v. 38, n. 1, p. 49-56, fev. 2010.

VIANA, V. M. Conservação da biodiversidade de fragmentos florestais em paisagens tropicais intensamente cultivadas. In: \_\_\_\_\_. **Abordagens interdisciplinares para a conservação da biodiversidade biológica e dinâmica do uso da terra no novo mundo**. Gainesville: Belo Horizonte. 1995. p. 135-154.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, Oxford, v. 15, p. 395-420. 1951.

XIA, T. et al. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Utah, v. 35, n. 4, p. 209-214, abr. 2007.

YEH, F. C. et al. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis molecular biology and biotechnology centre**. Canadá: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta. 1997.



## **ARTIGO 2: ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Annona crassiflora* Mart. NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

### **RESUMO**

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) possui grande potencial frutífero, é amplamente explorado economicamente e utilizado na alimentação regional. Por este motivo, torna-se essencial conhecer a forma como é a estrutura genética da espécie, com o intuito de manejar e conservar o seu potencial evolutivo. Este trabalho objetivou compreender a estrutura genética espacial (EGE) de oito populações de araticum no Estado de Minas Gerais, gerando informações para a sua conservação. Foram utilizados dez *primers* ISSR em 192 indivíduos de oito populações do estado de Minas Gerais, sendo elas C1, C2 e C3 (populações de Curvelo); MG (Morro da Garça); CC (Carmo da Cachoeira); MC (Montes Claros); GM (Grão Mogol) e JAN (Januária). Nas populações C2, GM e JAN os genótipos encontraram-se distribuídos de forma aleatória ( $P > 0,05$ ). Já os indivíduos das demais populações apresentaram EGE positiva. Em C1, a EGE ocorreu na segunda e terceira classe de distância (98 a 288m), com valores de coancestria de 0,19 ( $P = 0,00$ ) e 0,15 ( $P = 0,007$ ) respectivamente; em C3 a coancestria se mostrou positiva e significativa na primeira e na segunda classe (valores de 0,12,  $P = 0,01$  e 0,15,  $P = 0,02$ , respectivamente) e nas populações MG, CC e MC a coancestria foi positiva e significativa na primeira classe de distância (0 a 97, 0 a 42 e 0 a 19m para cada população), assumindo, respectivamente, os valores de 0,19 ( $P = 0,00$ ), 0,17 ( $P = 0,00$ ) e 0,24 ( $P = 0,00$ ). A presença de EGE nestas populações deve ser considerada em estratégias de conservação e de coleta dos frutos de araticum pelo extrativismo.

Palavras-chave: *Annona crassiflora*, distribuição espacial, coancestria.

## INTRODUÇÃO

O Cerrado é considerado a savana de maior diversidade de espécies e animais, resultado da diversidade de ambientes (FONSECA, 2000; MITTERMEIER et al., 2005; MYERS et al., 2000), apesar de se encontrar bastante negligenciado em termos de ações para a sua conservação (KLINK; MACHADO, 2005). Mais da metade da sua paisagem se encontra modificada em pastagens, agricultura e demais ocupações, sendo que essa destruição das florestas e bosques desta savana continua em ritmo acelerado (KLINK; MACHADO, 2005). Além do fato de que muitas famílias são mantidas e dependem economicamente dos recursos gerados pelo extrativismo dessas espécies (ALMEIDA et al., 1998). Como consequência, o Cerrado tem perdido sua riqueza, mesmo existindo várias espécies com grande potencial econômico (CARAMORI et al., 2004). É necessária uma atenção especial para espécies frutíferas nativas, que são amplamente utilizadas pelo seu valor nutritivo na alimentação, pelas propriedades medicinais e até mesmo pelo potencial madeireiro dessas árvores (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006).

Populações contínuas podem ser fragmentadas naturalmente, por processos geológicos, alagamentos, flutuações climáticas, entre outros. Porém o principal fator que atualmente tem levado a essa descontinuidade do habitat é a expansão das atividades humanas (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008), tais como exploração florestal, mineração, desmatamento para agropecuária, urbanização desordenada, construção de barragens e estradas (BRASIL, 2002). Os processos ecológicos e evolutivos podem sofrer alterações em decorrências dessa fragmentação contínua e, conseqüentemente, podem modificar a composição genética das espécies (HAMRICK, 2004).

Informações sobre dados ecológicos e genéticos em populações naturais são essenciais para o entendimento da estrutura genética dessas populações

(SANTANA et al., 2008) e, aliado a esses dados, o conhecimento e o entendimento da estrutura genética espacial ao nível populacional são fundamentais para o manejo e conservação dos recursos genéticos (NG; LEE; KOH, 2004). Isso porque a presença de estruturação genética pode influenciar padrões reprodutivos e evolutivos, sendo imprescindíveis para o estabelecimento de estratégias de amostragem em populações naturais, seja para fins de conservação ou melhoramento genético (MYAMOTO et al., 2002).

Eventos históricos, processos ecológicos e características de história de vida, além de pressões seletivas, podem levar a uma distribuição dos genótipos de forma não aleatória, propiciando a existência de estrutura genética espacial (EGE) nas populações naturais (BORN et al. 2008; COLLEVATTI et al., 2010; VEKEMANS; HARDY, 2004). A presença de EGE na população, ou seja, quando os indivíduos aparentados se encontram próximos geograficamente, pode significar ocorrência de cruzamentos endogâmicos (SEBBENN, 1997), sendo também, um indicativo de processos microevolutivos, tais como migração, fluxo gênico, deriva genética e seleção (SETSUKO; ISHIDA; TOMARU, et al., 2004). Dessa forma, informações sobre a EGE auxiliam o entendimento dessas forças, que direcionam a dinâmica genética local (GONÇALVES et al., 2010) e são essenciais para a continuidade das espécies.

*Annona crassiflora* Mart., conhecida como araticum, marolo, cabeça-de-nego, é uma árvore hermafrodita (LORENZI, 1998), cujas flores têm como vetor de polinização pequenos coleópteros (SILVA JUNIOR et al., 2005) e a sua dispersão primária ocorre por barocoria (ALMEIDA et al., 1998), sendo que a anta (*Tapirus terrestres*) atua como sua dispersora secundária e efetiva (GOLIN; SANTOS-FILHO; PEREIRA, 2011) É considerada uma espécie preferencialmente alógama (BRAGA FILHO et al., 2005), apresentando baixa taxa de frutificação (RIBEIRO et al., 1981; BRAGA FILHO, 2003) e alta taxa de aborto dos botões florais, aproximadamente 50% conforme descreve Braga

Filho et al., (2005). O araticum possui alto potencial frutífero, é explorado economicamente e é amplamente utilizado na alimentação regional (CHAVES; NAVES, 1998; ALMEIDA et al., 1998), entretanto são escassos estudos sobre biologia, ecologia e conservação genética sobre essa espécie.

Assim, este trabalho objetivou conhecer e entender o padrão de distribuição espacial dos genótipos de *Annona crassiflora* em oito populações no Estado de Minas Gerais, gerando informações para a conservação desta espécie. Espera-se que ocorra uma estruturação genética positiva nessas populações, com indivíduos aparentados mais próximos geograficamente, uma vez que a dispersão dos frutos de *A. crassiflora* é limitada.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Locais de Coleta**

As populações analisadas estão localizadas no estado de Minas Gerais, na área de ocorrência da *Annona crassiflora* (Figura 1). Na Tabela 1 encontra-se uma breve descrição de cada área amostrada. De cada população foram amostradas 24 árvores, totalizando 192 indivíduos, sendo que de cada indivíduo coletou-se amostras foliares. Essa amostragem foi realizada aleatoriamente em cada área escolhida, sem distância mínima estabelecida entre os indivíduos, porém só foram incluídos indivíduos em idade reprodutiva (adultos). As amostras foliares foram mantidas em sacos de plástico com sílica gel e foram conduzidas ao Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas da Universidade Federal de Lavras - UFLA, ficando armazenadas a -20°C até o momento dos procedimentos de extração. Todas as localidades e os indivíduos amostrados foram georreferenciados.

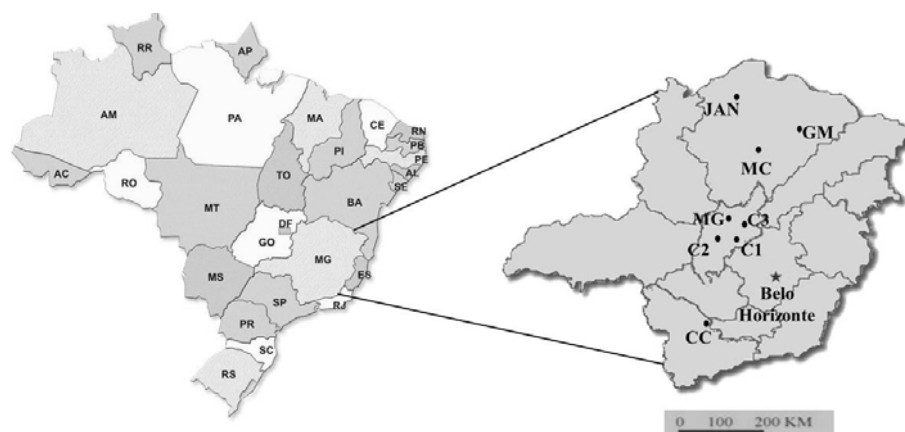


Figura 1 Localização geográfica das oito populações de *Annona crassiflora*, no Estado de Minas Gerais, selecionadas para o estudo (JAN, população de Januária; GM, população de Grão Mogol; MC, população de Montes Claros; MG, população de Morro da Garça; C1, C2, C3, populações de Curvelo; CC, população de Carmo da Cachoeira)

Tabela 1 Populações amostradas de *Annona crassiflora* no Estado de Minas Gerais.

População	Latitude	Longitude	Descrição
C1 (Curvelo)	18° 88' 45"	44° 44' 64"	Fragmento de Cerrado, circundado por pastagens e plantios de <i>Eucalyptus</i>
C2 (Curvelo)	18° 82' 34"	44° 52' 73"	Fragmento de Cerrado utilizado como pastagem
C3 (Curvelo)	18° 77' 03"	44° 49' 16"	Fragmento de Cerrado utilizado como pastagem
CC (Carmo da Cachoeira)	21° 44' 92"	45° 08' 99"	Região original de Cerrado <i>Stricto Sensu</i> , porém foi modificada em um sistema silvopastoril com a presença de <i>Annona crassiflora</i>
GM (Grão Mogol)	16° 56' 66"	42° 89' 98"	Fragmento de Cerrado <i>Stricto Sensu</i> em regeneração pertencente a reserva agroextrativista denominada Projeto de Assentamento Americana
JAN (Januária)	15° 48' 33"	44° 36' 65"	Área de Cerrado <i>Stricto Sensu</i> , preservado há 13 anos mas com atividade extrativista, pertencente a APA-Pandeiros
MC (Montes Claros)	16° 71' 67"	43° 86' 66"	Fragmento de cerrado <i>Stricto Sensu</i> preservado há 10 anos, sem indícios de corte, desmatamento
MG (Morro da Garça)	18° 50' 18"	44° 57' 93"	Fragmento de Cerrado utilizado como pastagem, com indícios de roçada

### **Extração e Amplificação do DNA genômico**

A extração de DNA foi realizada de acordo com o proposto por Mogg e Bond (2003). Posterior a este processo, as amostras de DNA foram submetidas à reações de amplificação conduzidas em um termociclador GeneAmp PCR System 9700, num volume total de 12 $\mu$ L, contendo 2 $\mu$ L de DNA genômico diluído 50X; 1,2 $\mu$ L de Tampão PCR 10X (500mM de Tris-HCl pH 8,0; 200mM de KCl; 2,5mg/mL de BSA; 200mM de Tartrazine e 1% de Ficol); 1,20 $\mu$ L de de dNTP + MgCl<sub>2</sub> (dNTP a 2,5mM; MgCl<sub>2</sub> a 25mM; 0,15 $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5U/ $\mu$ L) e 2 $\mu$ L de cada *primer* (2 mM). Os *primers* utilizados encontram-se descritos na Tabela 3. O ciclo da reação foi composto uma desnaturação inicial a 94°C, por 5 minutos, seguida de 37 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 47°C e 1 minuto a 72°C. Ao final do último ciclo, a extensão final, foi por 7 minutos, a 72°C. Após as reações, os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (5 mg/mL). Os géis foram interpretados quanto à presença (1) e à ausência (0) de fragmentos, onde cada fragmento amplificado foi considerado como um loco. Com base nesses resultados, foi construída uma matriz de dados binários para avaliar o nível de polimorfismo referente às populações.

### **Análise dos Dados**

Para análise da estrutura genética espacial (EGE) dos genótipos dentro das populações de *A. crassiflora*, foi estimado, de acordo com o proposto por Loiselle et al. (1995), o coeficiente de coancestria multiloco ( $F_{ij}$ ) entre plantas para diferentes classes de distância. Esta análise foi realizada com o auxílio do programa SPAGeDi versão 1.2 (HARDY; VEKEMANS, 2002). Este coeficiente estima a probabilidade de identidade dos alelos em dois genes homólogos amostrados da mesma maneira (LOISELLE et al., 1995), sendo que foi assumida ausência de endogamia. O erro padrão da média das estimativas, que foi obtido por reamostragem *jackknife*, foi utilizado na construção de intervalos de confiança a 95% de probabilidade para o coeficiente de coancestria médio, estimado para as classes de distância, conforme Hardy e Vekemans (2002).

Dentro de cada classe, realizou-se 1.000 permutações, com a finalidade de se testar a ocorrência de estrutura genética espacial. A extensão da EGE nas populações foi estimada pela estatística  $S_p$  que permite que se compare a magnitude da EGE entre populações diferentes (VEKEMANS; HARDY, 2004). Essa magnitude foi calculada pela fórmula  $S_p = -b_{\log}/(1-F_{ij(1)})$ , onde  $b_{\log}$  é a inclinação da curva de regressão do coeficiente de coancestria e  $F_{ij(1)}$  é a média do coeficiente de coancestria da primeira classe de distância ( $F_{ij}$ ).

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os 10 *primers* ISSR utilizados geraram um total de 61 locos, com 57 polimórficos (Tabela 3). A média de loco por *primer* foi de 6,1, variando de 3 a 8.

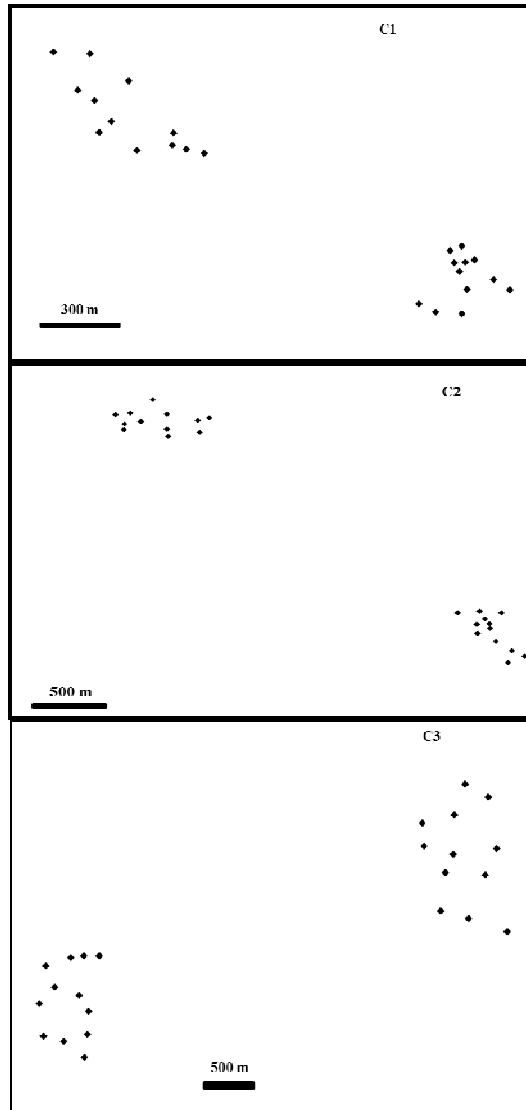
Tabela 3 *Primers* utilizados, suas respectivas seqüências e número de bandas produzidas.

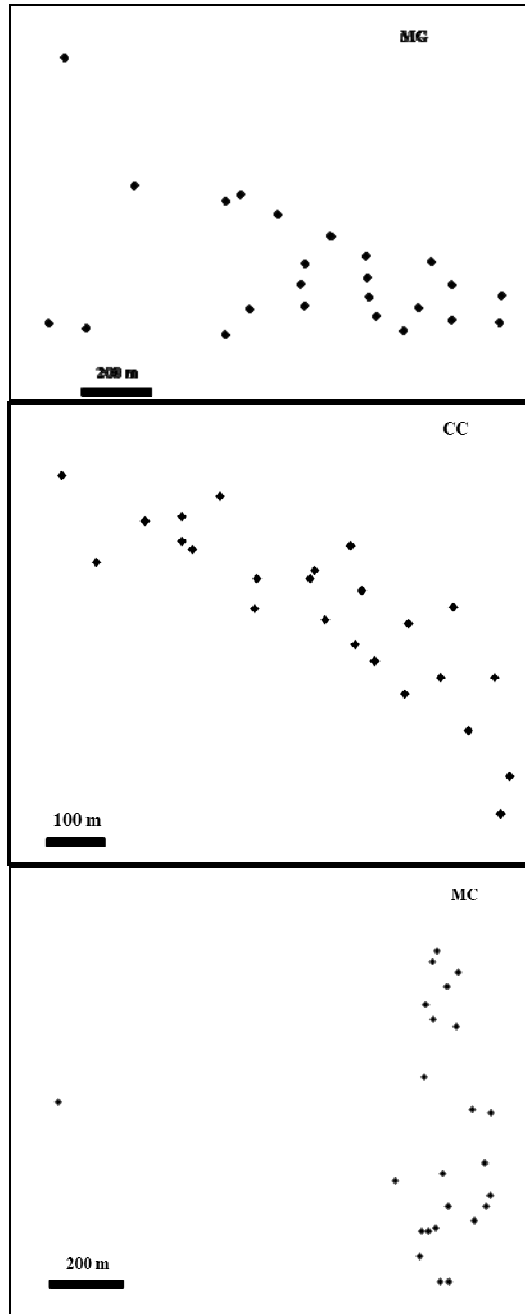
<i>Primer</i>	Seqüência (5' → 3')	Nº de locos
(CA)6-R	CAC ACA CAC ACA <b>R</b>	3
JOHN (AG)7-YC	AGA GAG AGA GAG AGY <b>C</b>	6
MANNY (CAC)4-RC	CAC CAC CAC CAC <b>RC</b>	7
UBC 807 (AG)8-T	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GT</b>	8
UBC 834 (AG)8-YT	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GYT</b>	7
UBC 835 (AG)8-YC	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GYC</b>	8
UBC 840 (GA)8-YT	GAG AGA GAG AGA GAG <b>AYT</b>	6
UBC 841 (GA)8-YC	GAG AGA GAG AGA GAG <b>AYC</b>	5
UBC 855 (AC)8-YT	ACA CAC ACA CAC ACA <b>CYT</b>	3
UBC 857 (AC)8YG	ACA CAC ACA CAC ACA <b>CYG</b>	8
<b>TOTAL</b>		<b>61</b>

R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T).

A distribuição espacial de cada indivíduo dentro de cada população, a partir das coordenadas UTM marcadas pelo GPS, encontra-se representada na Figura 2.







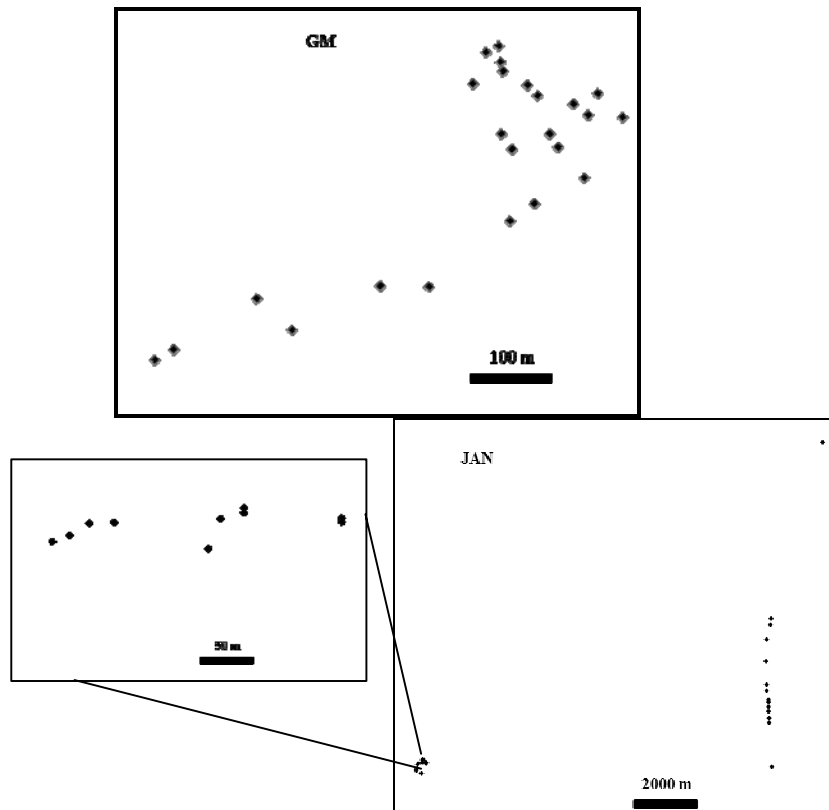


Figura 2 Posição e distribuição espacial de árvores de *Annona crassiflora* em populações naturais de Minas Gerais. C1, C2, C3: populações de Curvelo; MG: Morro da Garça; CC: Carmo da Cachoeira MC: Montes Claros; GM: Grão Mogol; JAN: Januária

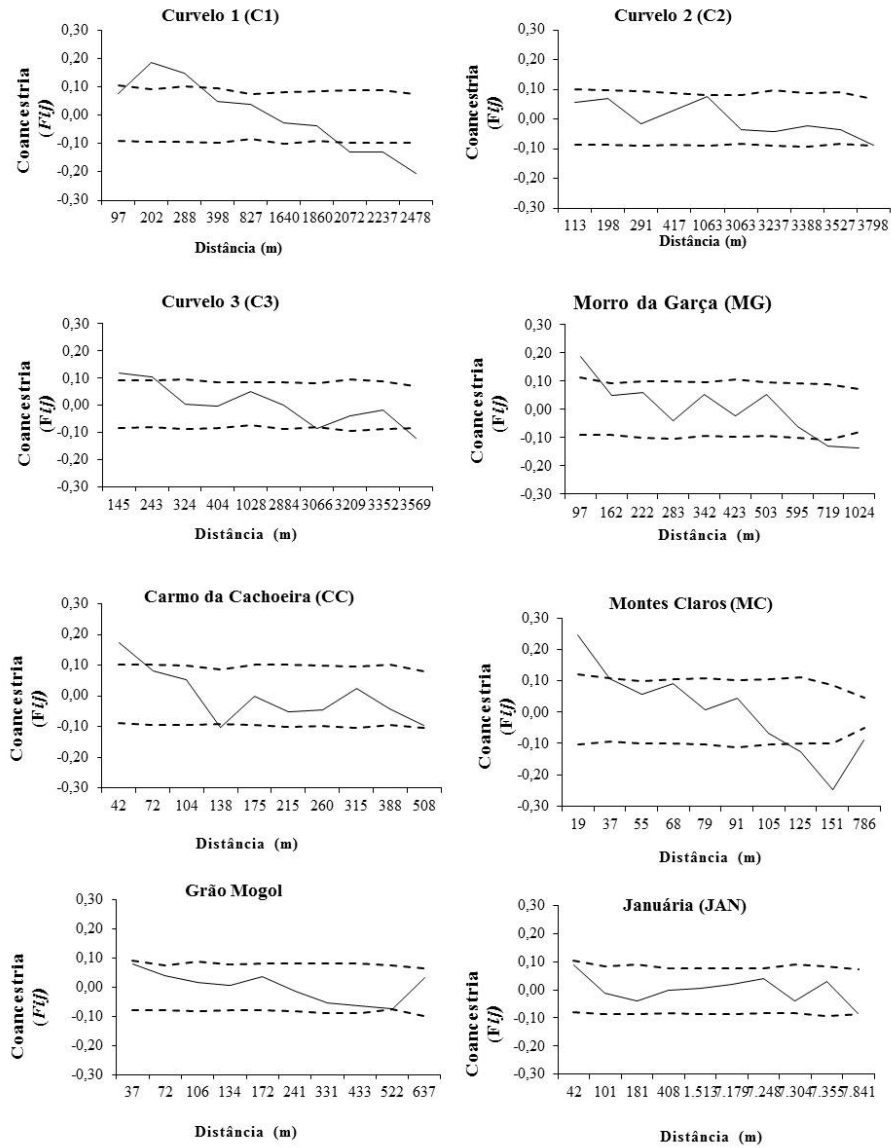


Figura 3 Correlogramas do coeficiente de coancestria (*kinship*), por classes de distância, para indivíduos de *Annona crassiflora* nas populações naturais amostradas no estado de Minas Gerais ---- intervalo de confiança, a 95% de probabilidade

Analisando os correlogramas das populações de *A. crassiflora* estudadas (Figura 3) pode-se perceber uma ausência de estruturação genética significativa nas populações C2, GM e JAN ( $P > 0,05$ ). Isto demonstra a existência de uma distribuição aleatória dos genótipos nestas populações, o que pode ser resultado de um fluxo alélico constante entre os indivíduos de cada uma destas três populações que, segundo Doligez e Joly (1997), é suficiente para impedir a divergência das frequências alélicas locais evitando assim o agrupamento de indivíduos aparentados. Porém, nas demais populações foi observada a presença de estruturação genética, uma vez que os valores de coancestria foram significativos ( $P < 0,05$ ), e os valores da curva de regressão do coeficiente de coancestria ( $b_{log}$ ) foram diferentes de zero e significativos a 95% de probabilidade (Tabela 4).

A população C1 apresentou coeficientes de coancestria significativos na segunda e terceira classe de distância (98 a 288m), com valores de 0,18 ( $P=0,00$ ) e 0,15 ( $P = 0,007$ ) respectivamente; a partir da oitava classe de distância (1861 a 2072m) o coeficiente de coancestria se tornou negativo e significativo (-0,02,  $P = 0,04$ ). Portanto, na população C1 existe EGE nos indivíduos que se encontram a distâncias de 98 a 202m entre si, resultando em uma coancestria positiva, indicando que são mais próximos geneticamente, enquanto que indivíduos que se encontram a distâncias superiores a 1861m entre si possuem uma coancestria negativa e significativa. Isto significa que a partir dessa distância geográfica (1861m) os indivíduos possuem menor similaridade genética.

Na população C3 a coancestria se mostrou positiva e significativa na primeira e na segunda classe (valores de 0,12,  $P = 0,01$  e 0,10,  $P = 0,02$ , respectivamente), tornando-se significativamente negativa na sétima (2885 a 3066m) e na décima classe (3353 a 3569m), cujos valores são de -0,08 ( $P = 0,04$ ) e -0,12 ( $P = 0,00$ ), respectivamente.

Para as populações MG, CC e MC a coancestria foi positiva e significativa na primeira classe de distância (0 a 97, 0 a 42 e 0 a 19m para cada população), assumindo os valores de 0,19 ( $P = 0,00$ ), 0,17 ( $P = 0,00$ ) e 0,24 ( $P = 0,00$ ), respectivamente. Para a população MG, o valor de coancestria se mostrou negativo significativamente na nona (596 a 719m;  $F_{ij} = -0,13$ ;  $P = 0,02$ ) e décima classe (720 a 1024m;  $F_{ij} = -0,14$ .  $P = 0,00$ ). O coeficiente de coancestria ( $F_{ij}$ ), para a população CC, foi negativo e significativo apenas na quarta classe de distância (105 a 138m), apresentando o valor de -0,10 e  $P = 0,03$ . Na população MC, a coancestria assumiu valores negativos e significativos nas três últimas classes de distância (106 a 125, 126 a 151 e 152 a 786m), sendo estes valores de -0,13 ( $P = 0,01$ ), -0,25 ( $P = 0,00$ ) e -0,09 ( $P = 0,00$ ) para cada classe.

Nestas cinco populações, C1, C3, MG, CC e MC, o padrão de estruturação genética espacial foi semelhante: quanto mais próximos geograficamente, os indivíduos também foram mais próximos geneticamente (coancestria positiva), enquanto que a redução da similaridade genética ocorreu com o aumento geográfico dos indivíduos (coancestria negativa). Essa estruturação genética espacial dentro das populações pode ocorrer devido a dispersão limitada de sementes e pólen das espécies (LATTA et al, 1998; LOISELLE et al., 1995; SMOUSE; PEAKALL, 1999). Outro fato que pode ter levado a ocorrência de estruturação genética é que essas populações se encontram em áreas do Cerrado altamente fragmentadas, que pode estar afetando os polinizadores do araticum, com consequente tendência de cruzamento entre indivíduos mais próximos geograficamente.

Tabela 4. Caracterização da estrutura espacial de *Annona crassiflora* nas oito populações, incluindo para cada população o coeficiente de *kinship* ( $F_{ij}$ ) para primeira classe de distância, os valores da curva de regressão do coeficiente de coancestria  $B_{log_2}$ , estatística  $S_p$  e valor de significância ( $P$ )

POPULAÇÕES	$F_{ij}$	$B_{log_2}$	$S_p$	P
C1	0,077	-0,095	0,103	0*
C2	0,057	-0,030	0,032	0,027*
C3	0,119	-0,048	0,054	0,003*
MG	0,188	-0,115	0,142	0,00*
CC	0,173	-0,083	0,100	0,007*
MC	0,245	-0,097	0,128	0,00*
GM	0,079	-0,038	0,04	0,033*
JAN	0,087	-0,006	0,006	0,4066 <sup>NS</sup>
MÉDIA	0,128	-0,0643	0,076	-

\*  $P < 0,05$ ; <sup>ns</sup>, não significativo.

Analisando os resultados da estatística  $S_p$  da estrutura genética espacial (Tabela 4), pode-se observar a existência de EGE significativa para a maioria das populações estudadas. Segundo Wallace (2006), a estatística  $S_p$  pode ser utilizada para comparar padrões de EGE entre populações e espécies diferentes. No presente estudo, os valores de  $S_p$  variaram de 0,006 (JAN) a 0,142 (MG), com média para as populações de 0,076. Esse valor é superior ao encontrado para espécies de dispersão por gravidade (0,028), com polinização por animais (0,017) e para espécies de fecundação cruzada (0,037) (VEKEMANS; HARDY, 2004). Porém, este resultado é semelhante aos de outros trabalhos com espécies polinizadas por animais e dispersas por gravidade (CAUJAPÉ-CASTELLS; PEDROLA-MONFORT, 1997; DUTECH et al., 2002; FRANCESCHINELLI; KESSELI, 1999; ZORO BI; MAQUET; BAUDOIN, 1997). Essa forte presença de estruturação genética espacial para a maioria das populações de araticum pode ser consequência da polinização limitada nesses ambientes, em decorrência da degradação das regiões amostradas, bem como por mudanças na taxa de

recrutamento das espécies, uma vez que a dispersão barocórica atinge distâncias restritas.

Como as populações amostradas nesse trabalho se, encontraram em regiões de Cerrado, e considerando que este Bioma se encontra em constante e avançado processo de fragmentação, o conhecimento sobre a estruturação genética espacial do araticum é de extrema importância para sustentabilidade dos recursos genéticos e ecológicos (EPPERSON; ALLARD, 1989; LACERDA; KAGEYAMA, 2003), seja por meio de conservação *in situ* dessa espécie, bem como para estratégias de amostragem de sementes para conservação *ex situ* (GUSSON; SEBBENN; KAGEYAMA, 2005)

Dessa forma, ao se realizar amostragem de sementes, seja para conservação *ex situ*, programas de melhoramento e/ou para programas de recuperação de áreas degradadas, é necessário que as coletas sejam realizadas em distâncias mínimas, em cada população, indicada pelos correlogramas (Figura 2). Para cada população que apresentou estrutura genética espacial positiva e significativa, a coleta deve ser efetuada com distâncias mínimas entre os indivíduos de 288m (C1), 243m (C3), 97m (MG), 72m (CC) e 37m (MC). Com essas distâncias estabelecidas, aumenta-se a probabilidade de se amostrar e captar a maior variabilidade genética da espécie (FERNANDES, 2008).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As populações C1, C3, MG, CC e MG apresentaram coancestria positiva, que pode ser devido a dispersão limitada de suas sementes. Além disso, com esses resultados, pode-se sugerir que a fragmentação do Cerrado e a perturbação do habitat natural dessa espécie podem estar afetando a estruturação genética espacial dentro das populações de araticum, bem como a distribuição da variabilidade genética entre as mesmas. é necessário um incremento de



informações, como por exemplo, sobre biologia reprodutiva, estudos de diversidade genética em progênies e regenerantes (GONÇALVES et al., 2010). Assim, aliado aos resultados da EGE nessas populações, é possível indicar atitudes sustentáveis para a compreensão da dinâmica dessa espécie, bem como para validação de práticas efetivas de conservação do araticum.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 464 p.

BORN, C. et al. Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. **Molecular Ecology**, New Jersey, v. 17, p. 2041-2050, mar. 2008.

BRAGA FILHO, J. R. **Comportamento produtivo do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) nos cerrados do Estado de Goiás**. 2003. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2003.

BRAGA FILHO, J. R. et al. Danos de *Telemus chapadanus* (Casey 1922) sobre o florescimento do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) no Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 35, n. 1, p. 25-29, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. PROBIO. **Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica brasileira: relatório de atividades**. Brasília: MMA, 2002.

CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical Characterization of Selected Plant Species from Brazilian Savannas, **Brazilian**

**Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.47, n. 2, p.253-259, jun. 2004.

CAUJAPÉ-CASTELLS, J.; PEDROLA-MONFORT, J. Space-time patterns of genetic structure within a stand of *Androcymbium gramineum* (Cav.) McBride (Colchicaceae). **Heredity**, Sheffield, v. 79, p. 341–349, oct. 1997.

CHAVES, L. J.; NAVES, R. V. O Cerrado do Brasil: uma fonte potencial de recursos genéticos. **Anais do encontro sobre temas de genética e melhoramento**, Piracicaba: ESALQ, v. 15. p. 74-86. 1998.

COLLEVATI, R. G. et al. Spatial Genetic Structure and Life History Traits in Cerrado Tree Species: Inferences for Conservation. **Natureza & Conservação**, Curitiba, v. 8, n. 1, p.54-59, jul. 2010.

DOLIGEZ, A.; JOLY, H.I. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. **Heredity**, Sheffield, v. 79, v. 1, p. 72-82, jul. 1997.

DUTECH, C. et al. Evidence of low gene flow in a neotropical clustered tree species in two rainforest stands of French Guiana. **Molecular Ecology**, New Jersey, v. 11, n. 4, p. 725–738, abr. 2002.

EPPERSON, B. K.; ALLARD, R. W. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. **Genetics**, Austin, v. 121, n. 2, p. 369-377, fev. 1989.

FERNANDES, R.C., **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) no Norte de Minas Gerais** - 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras-UFLA-Lavras. 2008.

FONSECA, G. A. **The Designing Sustainable Landscapes**. Washington: Conservation International. 2000.

FRANCESCHINELLI, E. V.; KESSELI, R. Population structure and gene flow of the Brazilian shrub *Helicteres brevispira*. **Heredity**, Sheffield, v. 82, n. 4, 355–363, abr. 1999.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A., **Fundamentos de Genética da Conservação**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2008. 280p.

GOLIN, V.; SANTOS-FILHO, M.; PEREIRA, M. J. B. Dispersão e predação de sementes de araticum no Cerrado de Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n.1, p. 101-107, jan. 2011.

GONÇALVES A. C. et al. Conservação de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae) baseada na estrutura genética de populações naturais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 95-101, jan-fev. 2010.

GUSSON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Eschweilera ovata*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.1, n.67, p.123-135, abr. 2005.

HAMRICK, J. L. Response of forest trees to global environmental changes, **Forest Ecology and Management**, Utah, v.197, n. 1-3, p.323–335, ago. 2004.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Dordrecht, v. 2, n. 4, p. 618-620, dez. 2002.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Montpellier, v. 19, n. 3, p. 707-713, jun. 2005.

LACERDA, C. M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* M. Alemão na região semi-árida, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 2, p.145-150, mar-abr. 2003.

LATTA, R. G. et al. Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of ponderosa pine. **Evolution**, Washington, v. 52, n. 1, p. 61-67, fev. 1998.

LOISELLE, B. A. et al. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, n. 11, p. 1420-1425, nov. 1995.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras/ Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v. 02. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. 384 p.

MITTERMEIER, R. A. et al. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil, **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v.1, n.1, p.14-21, jul. 2005.

MOGG, R. J.; BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, Dordrecht, v. 3, n. 4, p. 666-668, out. 2003.

MYAMOTO, M.; KURAMOTO, N.; YAMADA, H. Differences in spatial autocorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand. Mazz. (Betulaceae). **Heredity**, Sheffield, v. 89, n. 4, p. 273-279, out. 2002.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, New York, v. 403, n. 24, p. 853-858, fev. 2000.

NG, K. K.; LEE, S.; KOH, C. L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, n. 3, p. 657-669, mar. 2004.

RIBEIRO, J. F., et al. Aspectos fenológicos de espécies nativas do cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 32., 1981. Teresina. **Anais...** Teresina: Sociedade Botânica do Brasil. 1981.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado, **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 5, n. 3, p. 253-260, set-dez. 2006.

SANTANA, G. C. et al. Diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. no baixo rio São Francisco, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 427-433, maio-jun. 2008.

SEBBENN, A. M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiáceas) a partir de isoenzimas.** 1997. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 1997.

SETSUKO, S.; ISHIDA, K.; TOMARU, N. Size distribution and genetic structure in relation to clonal growth within a population of *Magnolia tomentosa* Thunb. (Magnoliaceae). **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, n. 9, p. 2645-2653, set. 2004.

SILVA JUNIOR, M. C. et al. **100 árvores do cerrado, guia de campo**, Brasília: Rede de sementes do cerrado, 2005. 278 p.

SMOUSE, P. E.; PEAKALL, R. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. **Heredity**, Sheffield, v. 82, n. 5, p. 561-573, maio. 1999.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, n. 4, p. 921-935, abr. 2004.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, n. 4, p. 921-935, abr. 2004.

WALLACE, L. E. Spatial genetic structure and frequency of interspecific hybridization in *Platanthera aquilonis* and *P. dilatata* (Orchidaceae) occurring in sympatry. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 93, n. 7, p. 1001-1009, jul. 2006.

ZORO BI, I.; MAQUET, A.; BAUDOIN, J-P. Spatial patterns of allozyme variants within three wild populations of *Phaseolus lunatus* L. from the central valley of Costa Rica. **Belgian Journal of Botany**, Meise, v. 129, n. 2, p. 149-155. 1997.

### **ARTIGO 3: CONSERVAÇÃO GENÉTICA DE *Annona crassiflora* MART. (ANNONACEAE) NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

#### **RESUMO**

O Cerrado se encontra atualmente em intenso processo de fragmentação, degradação e desmatamento. Composto por inúmeras espécies vegetais de grande importância ecológica e econômica é necessário que programas mais efetivos de conservação comecem a ser praticados nesse bioma. Nesse sentido, o araticum, *Annona crassiflora*, espécie frutífera, é alvo de grande extrativismo, sendo que suas populações naturais encontram-se devastadas, seja pela coleta inadequada de seus frutos, ou para formação de pastos. Assim, este trabalho teve como objetivo analisar os níveis de diferenciação genética em oito populações de *A. crassiflora* do Estado de Minas Gerais, e indicar as possíveis unidades operacionais para conservação *in situ*. Foram analisados locos gênicos obtidos de 10 *primers* ISSR em 192 indivíduos de araticum distribuídos em oito populações naturais de araticum. Foi efetuada a abordagem bayesiana nos dados, que revelou alta diversidade genética entre as populações ( $\theta^b = 0,16$ ). Por meio da abordagem bayesiana pode-se observar que as oito populações, previamente determinadas, se constituem de cinco populações distintas ( $K=5$ ). Seis possíveis unidades operacionais foram definidas para a conservação de *Annona crassiflora* no estado de Minas Gerais pelas análises do correlograma de Mantel e dos limites genéticos e descontinuidade genética entre as populações. Com esta estratégia pode se tornar a conservação da diversidade genética desta espécie mais efetiva e com menor esforço amostral.

*Palavras chaves:* *Annona crassiflora*, correlograma de Mantel, Unidades Operacionais

## INTRODUÇÃO

O potencial das espécies vegetais, principalmente as frutíferas, do Cerrado é enfatizado por Ribeiro e Rodrigues (2006), em razão destas espécies possuírem importância para a alimentação regional, além de propriedades medicinais e de ornamentação. A preservação da biodiversidade sofre uma significativa ameaça devido à redução do tamanho de áreas cobertas pela vegetação original e à constante fragmentação destes remanescentes florestais (BATISTINI et. al., 2009). Estudos de conservação genética de espécies arbóreas têm aumentando significativamente nos últimos anos, devido a necessidade de se avaliar a extensão dos impactos causados pela ação humana na natureza e com a finalidade de se propor medidas para reduzir a destruição dos habitat naturais (VIANA e SOUZA; LOVATO, 2010).

O araticum, *Annona crassiflora* Mart., é uma das frutas nativas do Cerrado brasileiro, ainda não domesticadas, pode ser consumida *in natura*, possuindo várias receitas de doces, bebidas, além da utilização em indústrias farmacêuticas e de cosméticos, pelas propriedades medicinais existentes (MELO, 2009). O extrativismo do araticum é lucrativo, especialmente, para famílias que têm a exploração como principal fonte de renda, devido ao importante potencial frutífero, uma vez que existe mercado para o fruto, sendo possível encontrar o araticum sendo vendido nos mercados e nas feiras durante os meses de fevereiro a abril (MELO, 2009). Desse modo, é importante ressaltar que, se o extrativismo continuar ocorrendo de forma descontrolada, poderá afetar a perpetuação da espécie (RIBEIRO; PASQUAL, 2005).

O Cerrado tem perdido sua área, sua riqueza e potencial devido ao grande aumento do extrativismo e crescente expansão das fronteiras agrícolas (KLINK; MACHADO, 2005) e a falta de diretrizes técnicas e de consciência ecológica na sua exploração tem acarretado em prejuízos ambientais irreparáveis



(PAULA, 2006). Os remanescentes encontram-se perturbados e empobrecidos, tanto em abundância quanto em riqueza de espécies, tornando-se cada vez mais escassos e em alarmante processo de perda de variabilidade genética (CHAVES; USBERTI, 2003).

Devido a este desmatamento do Cerrado as populações de araticum correm risco de extinção local ao longo das gerações. O repovoamento e a preservação de reservas ainda existentes que tenham *A. crassiflora* possuem, além do valor econômico, um valor ambiental inestimável, pois as árvores, geralmente, são consideradas as espécies chave dos ecossistemas florestais e muitas associações da fauna e flora dependem do ambiente, em decorrência de sua interação (RAJORA; MOSSELER, 2001).

A identificação de diferenciação genética entre as populações tem se tornado uma ferramenta útil para a elaboração de propostas de conservação de espécies (LEITE, 2007), bem como para auxiliar no manejo racional e sustentável dessas populações (NEWTON et al., 1999). Uma abordagem proposta por Diniz-Filho e Telles (2002, 2006), permite que estratégias de conservação da diversidade genética intrapopulacional seja otimizada, podendo assim, ser possível definir unidades operacionais de conservação *in situ*, além de delinear esquemas mais práticos de amostragem para bancos de germoplasma. Estas unidades devem possuir entre si uma alta divergência genética, o que reduz o esforço ou custo para indicação de áreas prioritárias para a conservação (DINIZ-FILHO et al., 2003; MANEL et al., 2003; PEARSE; CRANDALL, 2004, TELLES et al., 2003; TOMIMATSU et al., 2004; WATTS et al., 2004).

Espera-se que populações que apresentem maior divergência genética entre si sejam consideradas como Unidade Operacionais distintas para conservação da espécie. Dessa forma, neste trabalho, a divergência genética e o padrão espacial da variabilidade genética foram quantificados em populações de *Annona crassiflora*, utilizando-se abordagem bayesiana, com o objetivo de

definir unidades operacionais, de forma que estas sejam priorizadas em programas de conservação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Locais de estudo e amostragem**

O material utilizado para as análises genéticas foi oriundo de árvores naturais de oito localidades do Estado de Minas Gerais (Figura 1). Folhas de 24 árvores de cada localidade foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos com sílica, transportadas ao laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, da Universidade Federal de Lavras, UFLA, e guardadas em freezer a -20°C até o momento da extração do DNA. As populações escolhidas abrangem as regiões de ocorrência da espécie ao longo do Estado de Minas Gerais, sendo que o rio São Francisco separa a população de Januária das demais populações (Figura 1).

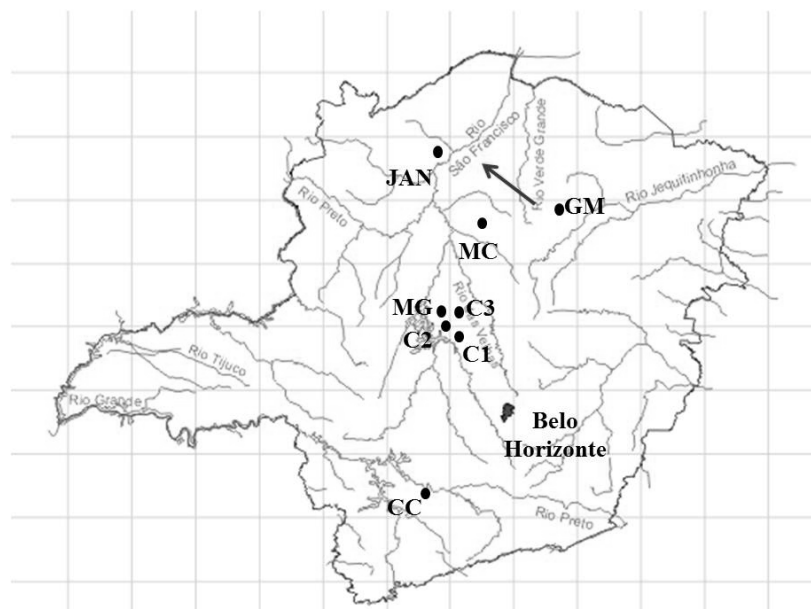


Figura 1 Localização geográfica das oito populações de *Annona crassiflora*, no Estado de Minas Gerais, selecionadas para o estudo (JAN, população de Januária; GM, população de Grão Mogol; MC, população de Montes Claros; MG, população de Morro da Garça; C1, C2, C3, populações de Curvelo; CC, população de Carmo da Cachoeira). Seta: Rio São Francisco

Os dados sobre as localidades, o código das populações e as coordenadas geográficas das áreas amostradas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 Populações amostradas de *Annona crassiflora* no Estado de Minas Gerais. *n* = número de indivíduos

População	Localidade	Latitude S	Longitude W	<i>n</i>
C1	Curvelo	18° 88' 45"	44° 44' 64"	24
C2	Curvelo	18° 82' 34"	44° 52' 73"	24
C3	Curvelo	18° 77' 03"	44° 49' 16"	24
CC	Carmo da Cachoeira	21° 44' 92"	45° 08' 99"	24
GM	Grão Mogol	16° 56' 66"	42° 89' 98"	24
JAN	Januária	15° 48' 33"	44° 36' 65"	24
MC	Montes Claros	16° 71' 67"	43° 86' 66"	24
MG	Morro da Garça	18° 50' 18"	44° 57' 93"	24

## **Descrição dos sítios de amostragem e das populações**

### ***População C1***

O local da coleta é conhecido como Mascarani no município de Curvelo–MG. Este fragmento de Cerrado não apresenta vestígios de corte raso para a produção de carvão, porém há coleta de lenha caída no chão por parte da população local. O fragmento é limitado por estradas vicinais, pastagens de *Brachiaria* e plantios de *Eucalyptus*. Há vestígios de fogo no interior do fragmento. O local é utilizado para a caça de minhocaçu, sendo encontrados muitos buracos feitos pelos caçadores.

Neste local é relatada alta densidade de *A. crassiflora*, sendo esta uma das espécies de maior presença na área. São também observadas plantas jovens de diversos tamanhos de *A. crassiflora*, indicando que há indivíduos regenerantes no fragmento.

### ***População C2***

O local da coleta é conhecido como Olhos d'Água no município de Curvelo–MG. A população amostrada se encontra em pastagem de *Brachiaria*, com a presença de *A. crassiflora* e *Caryocar brasiliense* (pequi). São observadas plantas jovens de *A. crassiflora*, indicando que há indivíduos regenerantes na pastagem.

### ***População C3***

O local da coleta é conhecido como Falcão no município de Curvelo–MG. A população amostrada está sobre pastagem de *Brachiaria*, arborizada

principalmente com *A. crassiflora* e *C. brasiliense*. A presença de plantas jovens na área indica a ocorrência de regeneração de *A. carassiflora*.

### ***População CC***

Essa área de estudo pertence a uma propriedade rural no município de Carmo da Cachoeira, no sul de Minas Gerais. O local da coleta era uma região original de Cerrado *Stricto Sensu*, porém foi modificada em um sistema silvopastoril com a presença de araticuns, distribuídos aleatoriamente, e *Brachiaria decumbens* associados nos últimos 30 anos (MELO, 2009)

### ***População GM***

A população GM encontra-se em uma reserva agroextrativista denominada Projeto de Assentamento Americana, no município de Grão Mogol, MG. Até a década de 1980 explorou-se nessa área espécies nativas com o intuito de produção de carvão vegetal. Entretanto atualmente a área se encontra em processo de regeneração. Incêndios ocorrem frequentemente nessa área, sendo que o último aconteceu a aproximadamente cinco anos. Não há presença de pasto nesta área, e os moradores realizam coleta de frutos de araticum para produção de polpas e doces, que são revendidos para cooperativas da região.

### ***População JAN***

Esta população pertence a Área de Proteção Ambiental do Rio Pandeiros (APA-PANDEIROS), no município de Januária, regulamentada pelo Decreto Estadual nº 38.744, de 09/04/1997 (BELO HORIZONTE, 1997). Na área em que foi realizada a amostragem, há presença de gado, porém é uma região que

pode ser considerada como preservada, com ausência de desmatamento e queimadas.

### ***População MG***

O local da coleta é conhecido como Morro da Garça no município de Morro da Garça – MG. A população amostrada está sobre pastagem degradada de *Brachiaria*, arborizada principalmente com *A. crassiflora* e *C. brasiliense*. Neste local há relato de roçada, sendo que a maior parte dos arbustos e regenerantes de *A. crassiflora* e *C. brasiliense* foi deixada na área, inclusive os de pequeno porte. Os moradores da localidade informaram que nesse local não é realizada a coleta comercial de frutos.

### ***População MC***

Esta localidade se encontra em uma comunidade rural a aproximadamente 20 km da cidade de Montes Claros, chamada Abóboras. As coletas desta área foram realizadas dentro de uma reserva ecológica bem preservada, existente há dez anos, com predominância de vegetação nativa de Cerrado *Stricto Sensu*, com ausência de pastos, cortes e queimadas.

### **Extração e Amplificação do DNA genômico**

A extração de DNA foi realizada de acordo com o proposto por Mogg e Bond (2003). Posterior a este processo, as amostras de DNA foram submetidas à técnica de PCR com a utilização de *primers* ISSR. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador GeneAmp PCR System 9700, num volume total de 12 $\mu$ L, contendo 2 $\mu$ L de DNA genômico diluído 50X; 1,2 $\mu$ L de

Tampão PCR 10X (500mM de Tris-HCl pH 8,0; 200mM de KCl; 2,5mg/mL de BSA; 200mM de Tartrazine e 1% de Ficol); 1,20 $\mu$ L de de dNTP + MgCl<sub>2</sub> (dNTP a 2,5mM; MgCl<sub>2</sub> a 25mM; 0,15 $\mu$ L de Taq DNA polimerase (5U/ $\mu$ L) e 2 $\mu$ L de cada *primer* (2 mM). Os *primers* utilizados encontram-se descritos na Tabela 3. Após uma desnaturação inicial a 94°C, por 5 minutos, as reações foram submetidas a 37 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 47°C e 1 minuto a 72°C. Ao final do último ciclo, a extensão final, foi por 7 minutos, a 72°C. Após as reações, os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (5 mg/mL). Os produtos da reação foram analisados por meio da eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo, por duas horas e meia a 120V.

### **Análise dos Dados**

#### ***Divergência genética bayesiana***

A partir da genotipagem dos marcadores pela leitura dos géis de agarose, foi gerada uma matriz binária, na qual se analisou a presença (1) e ausência (0) dos locos gênicos.

Para estimar a magnitude relativa da divergência genética entre as populações, foi utilizada uma metodologia baseada em estimadores obtidos pela estatística Bayesiana (HOLSINGER; LEWIS; DEY, 2002). A distribuição *a posteriori* do estimador  $\theta^B$  (também análogo ao *Fst* de Wright, 1951) foi numericamente aproximada pela simulação de Cadeia de Monte Carlo Markov (MCMC). Esta análise foi realizada com o programa HICKORY v. 1.0 (HOLSINGER; LEWIS, 2003), que permite a estimação de quatro modelos diferentes.

O primeiro modelo, denominado *full model* (Modelo Completo), permite a estimativa de  $\theta^B$  e  $f$  (o coeficiente de endogamia, similar ao *Fis* de Wright, 1951). O segundo e terceiro modelos assumem, respectivamente, que o  $\theta^B$  e  $f$  sejam iguais a zero. No quarto modelo o valor de  $f$  é considerado livre para variar, uma vez que as estimativas de  $f$  são geralmente viesadas, quando baseadas em dados de marcadores dominantes. Sendo assim, este modelo escolhe valores de  $f$  aleatórios para uma distribuição *a priori*.

Após as análises pelos quatro modelos, compararam-se os resultados por meio do *Deviance Information Criterion* (DIC – desvio do critério de informação), onde os menores valores de DIC determinam o melhor modelo (HOLSINGER 1999; HOLSINGER; LEWIS; DEY, 2002; HOLSINGER; WALLACE, 2004; SPIEGELHALTER et al., 2002). Outros dois parâmetros também são utilizados para auxiliar na escolha do melhor modelo, sendo eles o  $I_e$  e a distância *H-d* (HOLSINGER; LEWIS, 2003). O primeiro representa a informação fornecida na estimativa do parâmetro obtido para o conjunto de dados, sendo que quanto maior o seu valor, mais informações foram extraídas dos dados (HOLSINGER; LEWIS, 2003). Já o valor de *H-d*, conforme descrevem Holsinger e Lewis (2003), consiste na “distância” ou diferença entre as simulações das distribuições *a posteriori* e a sua aproximação da distribuição  $\beta$ , ou seja, representa a porcentagem da não sobreposição entre essas distribuições. Quando este valor tende a zero, isso significa que as distribuições são idênticas, por outro lado, se tende a um, elas são completamente diferentes (HOLSINGER; LEWIS, 2003).

Foi realizada também uma estimativa de  $\theta^B$  entre os pares de populações e adicionalmente o teste de Mantel para teste de correlação entre as distâncias genética e geográfica entre as populações, pelo programa computacional NTSYS 2.0 (ROHLF, 2001), com 1.000 permutações.



### ***Número provável de populações distintas***

Para avaliar a relação parental entre as populações e seu fluxo gênico, e assim, obter o número provável de populações distintas, foram realizadas análises de agrupamento bayesiana por meio do programa STRUCTURE 2.3 (PRITCHARD; WEN; FALUSH, 2002). Utilizando o modelo de ancestralidade não misturada com os alelos correlacionados (*no admixture*), foi estimado o número de populações (K), sendo que K variou de um a oito. Dez corridas independentes foram realizadas, com 100.000 repetições em Cadeia de Monte Carlo Markov (MCMC), e um *burn-in* de 50.000, para cada valor de K. De acordo com Falush, Stephens e Pritchard. (2003), o número exato de populações discretas é esperado ser o valor K máximo estimado pelo modelo log-likelihood,  $\log(P(X/K))$ , no qual é considerado mais confiável quando o mesmo possui o menor número negativo de  $\ln P(D)$ .

### ***Padrões Espaciais***

As distâncias genéticas foram analisadas por escalonamento multidimensional não-métrico (*non-metric multidimensional scaling - NMDS*) que visa representar graficamente a dissimilaridade entre as populações. Além disso, com o propósito de se avaliar o padrão da estrutura espacial entre as populações, foram utilizados as correlações matriciais e o teste de Mantel, gerando o correlograma de Mantel. Foram definidas sete classes de matrizes de conectividade, de acordo com as distâncias geográficas entre cada par de populações que estejam “ligadas” uma com a outra, de modo que o número de conexões entre as populações fossem os mesmo. O limite superior de cada classe definida se encontra na Tabela 2.

Tabela 2 As sete matrizes de conectividade estabelecidas para populações de *Annona crassiflora* com seus respectivos limites superiores, em quilômetros (Km)

CLASSE	LIMITE SUPERIOR (Km)
1 <sup>a</sup>	35
2 <sup>a</sup>	150
3 <sup>a</sup>	245
4 <sup>a</sup>	295
5 <sup>a</sup>	305
6 <sup>a</sup>	373
7 <sup>a</sup>	665

Dessa forma foram calculados coeficientes de correlação matricial entre as distâncias genéticas e as matrizes de conectividade espacial, com o programa NTSYS 2.0 (ROHLF, 2001), atribuindo-se valor 1,00 para pares de populações conectadas quando a distância geográfica entre elas se encontra dentro das classes de distância. Assim, foi possível gerar um correlograma multivariado, relacionando-se o coeficiente de correlação matricial com a distância geográfica (SOKAL; SMOUSE; NEEL, 1986).

### ***Descontinuidade Genética***

As populações foram localizadas em um mapa de acordo com suas posições geográficas e conectadas entre si pelo método da triangulação de Delauney (LEGENDRE; LEGENDRE 1998) com a finalidade de analisar a descontinuidade genética baseada nas distâncias genéticas, conforme o proposto por Manel et al. (2003) e Telles et al. (2003). A rede de Delauney só pode ser formada quando um conjunto de três populações (A, B e C) são conectadas de forma que essa ligação só ocorra se e somente se, quando se passar um círculo

sobre elas, não haja nenhuma outra população incluída além das três (LEGENDRE; LEGENDRE 1998).

Por meio desta rede e dos valores de distância genética, as descontinuidades dos dados foram obtidas pela divisão das distâncias genéticas, associadas a cada ligação entre as populações ABC na rede de Delauney, pela distância geográfica (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). Dessa forma, analisou-se a descontinuidade genética mapeando uma dada proporção dos valores mais elevados da distribuição global das razões ao longo da rede de Delauney (LEGENDRE; LEGENDRE 1998; MANEL et al., 2003), sendo que a proporção escolhida neste trabalho foi de 30%, utilizando-se o programa computacional BARRIER 2.2 (MANNI; GUÉRARD; HEYER, 2004).

#### ***Definição de Unidades Operacionais para a conservação da diversidade genética de *Annona crassiflora****

Foi aplicado o procedimento proposto por Diniz-Filho e Telles (2002), que utiliza o correlograma de Mantel como base para indicar quantas unidades operacionais seriam necessárias para se conservar a variabilidade genética medida pelos marcadores ISSR, em algumas populações de *A. crassiflora*. Nesta metodologia, as populações que se apresentam como unidades genéticas independentes entre si são consideradas como Unidades Operacionais (UOs). Estas UOs são as unidades indicadas como prioritárias para a conservação genética. A eficiência desse conjunto reduzido de populações, no sentido de representar efetivamente a variabilidade genética, foi avaliada pela proporção de Unidades Operacionais que contém pelo menos um indivíduo com bandas para todos os locos ISSR.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a utilização de 10 *primers* ISSR foi gerado um total de 61 fragmentos amplificados, sendo 57 polimórficos e quatro monomórficos. O número de fragmentos por *primers* variou de 3 a 8 (Tabela 3).

Tabela 3 Nome, sequência e o número de fragmentos de cada *primer*

<i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Nº de fragmentos
(CA)6-R	CAC ACA CAC ACA <b>R</b>	3
JOHN (AG)7-YC	AGA GAG AGA GAG AGY <b>C</b>	6
MANNY (CAC)4-RC	CAC CAC CAC CAC <b>RC</b>	7
UBC 807 (AG)8-T	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GT</b>	8
UBC 834 (AG)8-YT	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GYT</b>	7
UBC 835 (AG)8-YC	AGA GAG AGA GAG AGA <b>GYC</b>	8
UBC 840 (GA)8-YT	GAG AGA GAG AGA GAG <b>AYT</b>	6
UBC 841 (GA)8-YC	GAG AGA GAG AGA GAG <b>AYC</b>	5
UBC 855 (AC)8-YT	ACA CAC ACA CAC ACA <b>CYT</b>	3
UBC 857 (AC)8YG	ACA CAC ACA CAC ACA <b>CYG</b>	8
<b>TOTAL</b>		<b>61</b>

**R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T).**

A estatística bayesiana foi utilizada para estimar parâmetros de variabilidade genética. Os valores de  $\theta^b$  e  $f$  para o conjunto de populações, obtidos pelos quatro modelos estão representados na Tabela 4. O *full model* (modelo completo) foi o modelo escolhido, uma vez que este apresenta o menor valor de DIC (1635,62), no qual o  $\theta^b$  assumiu valor de 0,16. Este valor sugere uma alta divergência genética entre as populações amostradas. Porém, pode-se observar que o valor de  $f$  é alto em todos os modelos utilizados. De acordo com Holsinger e Lewis (2003) isso ocorre devido a artefatos gerados pelo pequeno tamanho amostral de populações.

Tabela 4 Resultados da análise bayesiana de divergência entre as oito populações de *Annona crassiflora*, incluindo os modelos testados, as estimativas de  $f$ ,  $\theta^b$ , e DIC (*Deviant Information Criterion*)

Modelo	$\theta^b$	$f$	DIC
<b>completo</b>	0,16	0,36	1635,62
<b><math>f=0</math></b>	0,13	0,00	1685,98
<b><math>\theta^b=0</math></b>	0,00	0,18	2670,46
<b><math>f</math> (livre)</b>	0,19	0,51	1825,43

Analisando, ainda, qual dos quatro modelos apresenta estimativas mais consistentes desses parâmetros pode-se então confirmar esses resultados (Tabela 5). A estimativa de  $\theta^b$ , de maior interesse, apresentou mais estabilidade entre os quatro modelos, com o menor valor de  $H-d$  (0,0002), porém o maior valor de  $Ie$  foi apresentado pelo modelo onde  $f$  assume valor igual a zero. Porém, na natureza pressupõe-se que  $f$  possua valor diferente de zero, o que leva, então, a escolher o modelo completo como o mais adequado para representar os dados, com valor de  $Ie$  igual a 2,4593. Deve-se levar em consideração o fato de que o valor  $f$  esteja superestimado.

Tabela 5 Resultados da análise bayesiana de divergência entre oito populações de *Annona crassiflora*, incluindo as estimativas de  $f$ ,  $\theta^b$ , a medida de informação ( $Ie$ ) e as distância  $H-d$  entre a distribuição *a posteriori* e uma distribuição  $\beta$ , para os modelos testados

Modelo		$f$	$\theta^b$
<b>completo</b>	<b>Ie</b>	0,2639	2,4593
	<b>H-d</b>	0,0030	0,0002
<b><math>f=0</math></b>	<b>Ie</b>	-	2,6317
	<b>H-d</b>	-	0,0008
<b><math>\theta^b=0</math></b>	<b>Ie</b>	1,119	-
	<b>H-d</b>	0,009	-
<b><math>f</math> (livre)</b>	<b>Ie</b>	0,0006	2,1727
	<b>H-d</b>	0,0018	0,0036

A variação das distâncias genéticas, avaliadas por meio do parâmetro  $\Theta^B$ , entre os pares de populações foram de 0,05 entre C3 e MG a 0,23, entre C2 e MC (Tabela 6). O Teste de Mantel mostrou haver correlação significativa entre as distâncias geográfica e genéticas estimadas ( $r = 0,46$ ;  $P = 0,02$ ).

Tabela 6 Distâncias genéticas entre pares de populações ( $\Theta^B$ ) de *Annona crassiflora*. C1, C2, C3, populações de Curvelo; MG, população de Morro da Garça; CC, população de Carmo da Cachoeira; MC, população de Montes Claros; GM, população de Grão Mogol; JAN, população de Januária

POP	C1	C2	C3	MG	CC	MC	GM	JAN
<b>C1</b>	-							
<b>C2</b>	0,10	-						
<b>C3</b>	0,12	0,09	-					
<b>MG</b>	0,13	0,10	0,05	-				
<b>CC</b>	0,11	0,15	0,17	0,12	-			
<b>MC</b>	0,20	0,23	0,22	0,19	0,17	-		
<b>GM</b>	0,17	0,17	0,17	0,14	0,15	0,10	-	
<b>JAN</b>	0,19	0,22	0,22	0,18	0,15	0,20	0,11	-

O padrão de distância genética entre as populações de *A. crassiflora*, definido pelo método NMDS e agrupadas de acordo com as distâncias  $\Theta^B$ , sugere a presença de um grupo separado dos demais, formado pelas populações C1, C2, C3 e MG (Figura 2), cujo estresse foi de 0,18. Esse valor significa que o padrão de distância genética está representado de forma eficiente e ajustado. Entretanto, para melhor análise da variabilidade genética e sua distribuição entre as populações de *A. crassiflora*, é necessário que se faça uma amostragem de maior número de populações e de localidades.

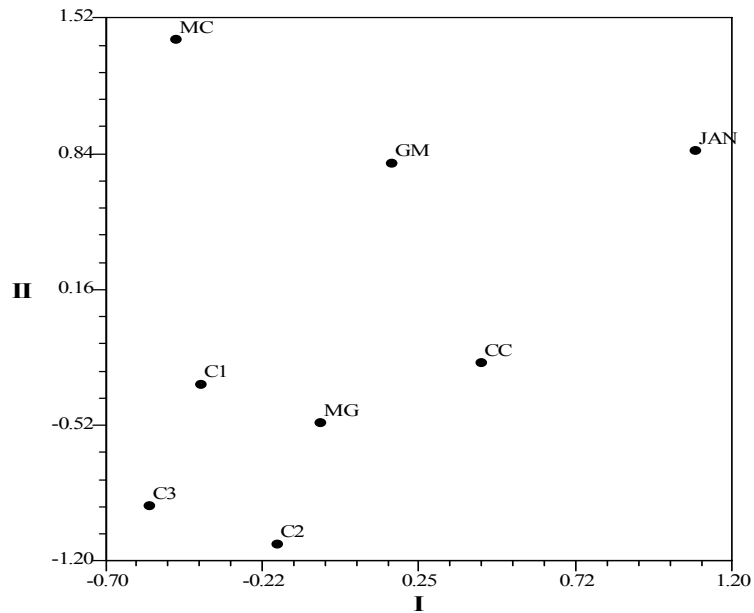


Figura 2 Distribuição das populações pelo método NMDS em 2D, agrupadas de acordo com as distâncias  $\theta^B$ . C1, C2 e C3 = populações de Curvelo; MG = Morro da Garça; CC = Carmo da Cachoeira; MC = Montes Claros; GM = Grão Mogol e JAN = Januária

A análise do número provável de populações distintas resultou em um total de cinco grupos, identificados por K, como número ideal de populações existentes na amostragem, e não oito, como foi definido previamente (Figura 3). Na Tabela 7 é descrito os valores de  $\ln P(D)$  para cada valor de K assumido.

Analisando o resultado por meio do gráfico que representa o valor Q (Figura 4), pode-se observar nitidamente a presença de apenas cinco grupos reais. Este valor de Q é a estimativa do coeficiente de participação de cada indivíduo em cada grupo.

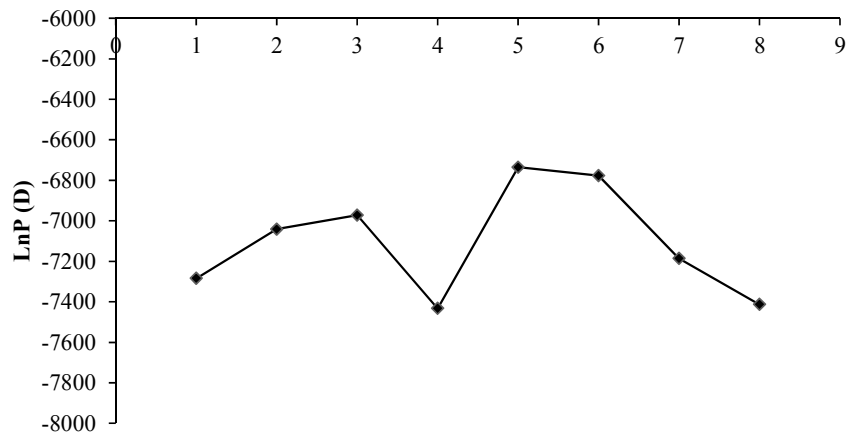


Figura 3 Representação do número provável de populações distintas de *Annona crassiflora*, de acordo com a metodologia de Falush, Stephens e Pritchard, (2003). LnP (D) = probabilidade log dos dados, mostrando cinco como o número provável de populações distintas.

Tabela 7 Valores de LnP (D) após 10 corridas independentes para cada valor de K

<b>K</b>	<b>LnP (D)</b>
1	-7284,42
2	-7041,73
3	-6972,14
4	-7432,8
5	-6735,34
6	-6776,89
7	-7186,4
8	-7413,23



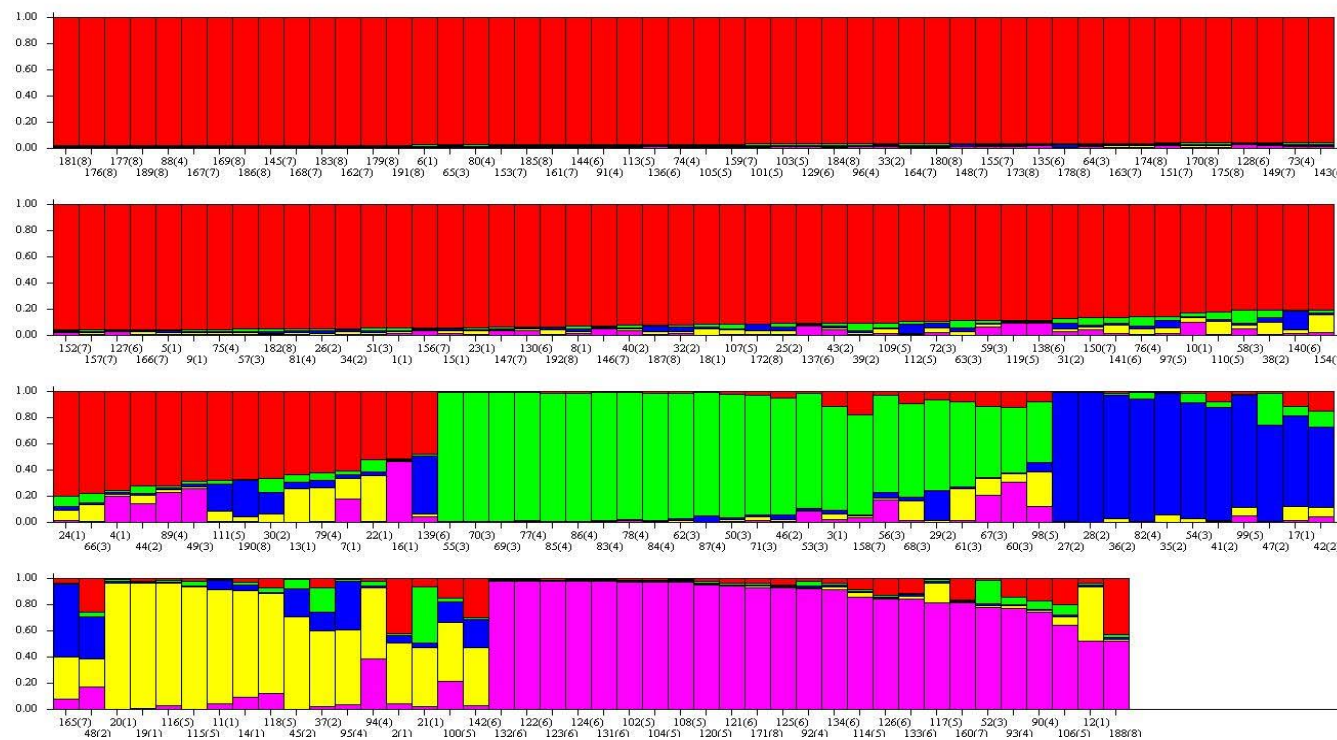


Figura 4 Distribuição dos 192 indivíduos de *Annona crassiflora* nos grupos de acordo com a análise do Structure ( $k=5$ ), baseado em 61 marcadores ISSR. Os indivíduos estão representados por barras verticais, sendo que cada cor está associada a um grupo diferente. Eixo x = indivíduos das populações amostradas; eixo y = estimativa do coeficiente de participação de cada indivíduo em cada grupo. 1, 2 e 3 = populações de Curvelo; 4 = Morro da Garça; 5 = Carmo da Cachoeira; 6 = Montes Claros; 7 = Grão Mogol e 8 = Januária

Essa formação das populações amostradas em cinco grupos distintos pode ser explicada pela proximidade geográfica entre algumas populações (Tabela 8).

Tabela 8 Matriz de distância geográfica entre as populações de *Annona crassiflora*, em quilômetros

	C1	C2	C3	MG	CC	MC	GM	JAN
C1	-							
C2	10,9	-						
C3	13,9	6,9	-					
MG	44,9	36,2	31,1	-				
CC	291,8	296,6	303,1	330,8	-			
MC	247,7	243,5	236,8	211,4	539,4	-		
GM	304,5	303,6	296,7	278,7	587,6	104,5	-	
JAN	376,5	370,1	364,0	334,8	664,7	146,6	197,5	-

A Figura 5 representa a contribuição dos genótipos para cada população. Assim, pode-se notar que as populações C1, C2, C3 e MG possuem grande quantidade de genótipos compartilhados, isso provavelmente pela pequena distância geográfica entre elas (Tabela 8).

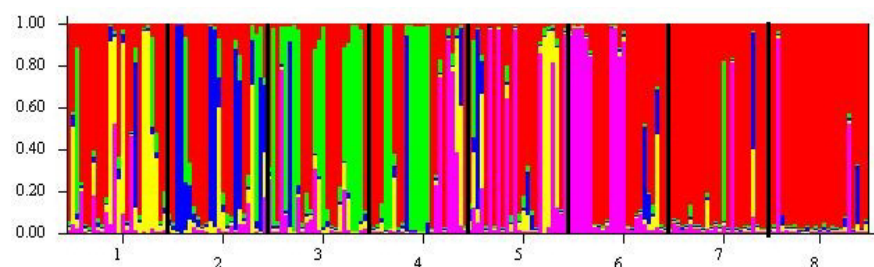


Figura 5. Representação da atribuição dos genótipos para cada população. As cores (vermelho, amarelo, azul, verde e rosa) representam cada atribuição, assumindo 5 populações. 1=C1, 2=C3, 3=C3, 4=MG, 5=CC, 6=MC, 7=GM e 8= JAN

O correlograma multivariado, representado na Figura 6, mostrou a existência de similaridade genética entre populações próximas geograficamente e a presença de um padrão de isolamento por distância (IBD), sendo significativo a partir da quarta classe de distância (295 km), onde o intercepto corta o eixo 'x'.

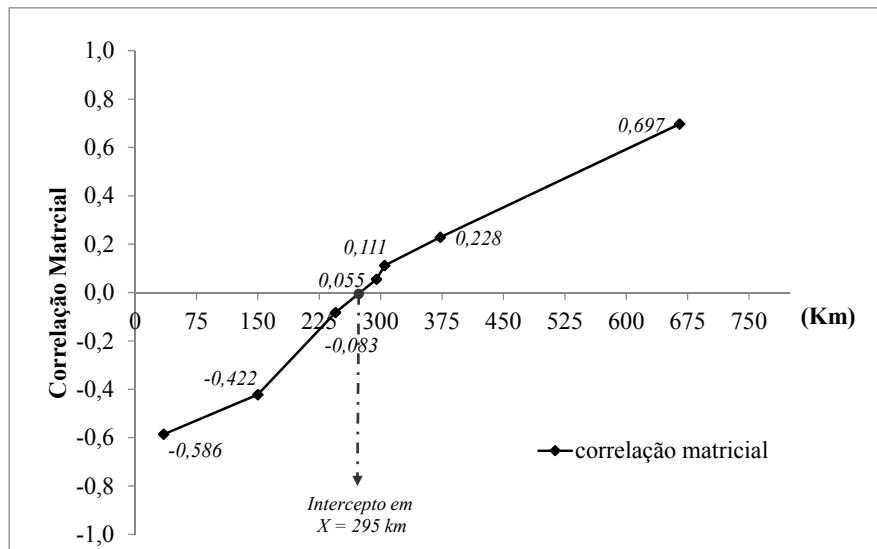


Figura 6 Correlograma de Mantel para a divergência genética estimada pelo  $\Theta^b$  entre oito populações de *Annona crassiflora* em sete classes de distâncias geográficas. A seta indica a correlação matricial sobre a hipótese nula de ausência de agregação espacial

Este intercepto pode ser interpretado como o ponto no qual a distância genética se torna um indicador de manchas, ou áreas, genéticas (*genetic patches*) que são geneticamente independentes. Ou seja, populações que se encontram em distâncias menores que a do intercepto podem ser consideradas como um único grupo genético. Já populações que possuem distâncias entre si superiores ao valor do intercepto podem ser consideradas como grupos distintos geneticamente ou unidades genéticas independentes para a conservação da variabilidade genética desta espécie (SOARES et al., 2008).

Essa metodologia pode ser utilizada para estabelecer unidades operacionais de conservação (UOs), de acordo com Diniz-Filho e Telles (2002). Dessa forma, o intercepto do correlograma pode ser utilizado com a finalidade de se otimizar as estratégias de amostragem e,

consequentemente, em planos de conservação (DINIZ-FILHO; TELLES, 2002).

De acordo com a divergência genética ( $\theta^b$ ) das populações amostradas e de acordo com as distâncias geográficas entre elas, pode-se indicar três possíveis unidades operacionais, as quais possuem distâncias entre si superiores a 295 km (Figura 7). A primeira formada pelas populações de Januária (JAN), Montes Claros (MC) e Grão Mogol (GM), a segunda pelas três populações de Curvelo (C1, C2 e C3) e Morro da Garça (MG), e a terceira representada pela população de Carmo da Cachoeira (CC).

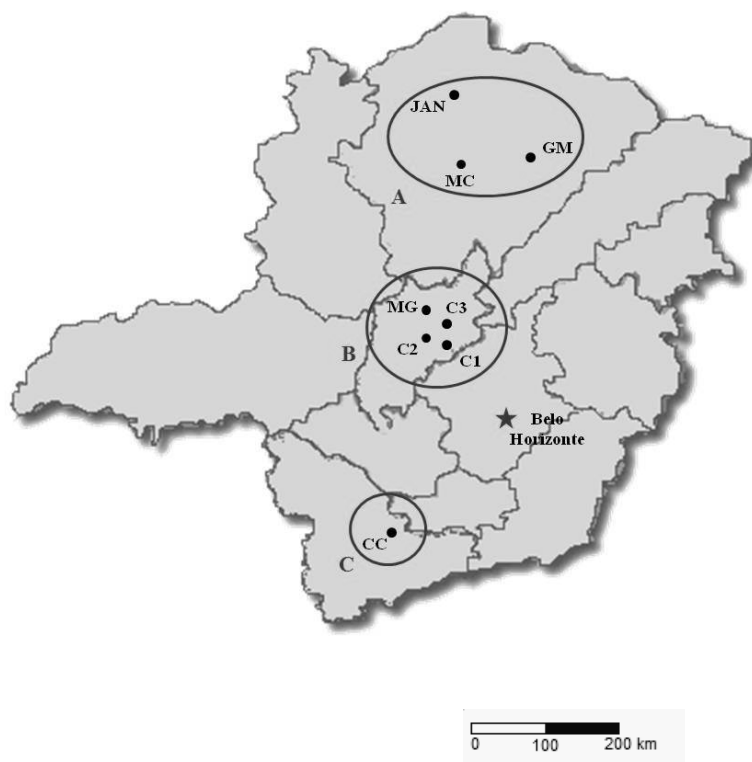


Figura 7 Possibilidade para a definição de Unidades Operacionais Intraespecíficas para *Annona crassiflora* definidas com base no correlograma multivariado.

A triangulação de Delauney mostrou a existência de um único limite genético entre as populações estudadas (Figura 8). Este limite separa a população de Januária (JAN) das demais, inclusive daquelas que se encontram mais próximas geograficamente desta (GM e MC). Pode-se supor que isso se deva pela presença do Rio São Francisco, que separa fisicamente a cidade de Januária das demais cidades. Essa barreira física pode estar interferindo nos processos de polinização e dispersão dessa população, que são realizados por coleópteros e gravidade, respectivamente, considerados mecanismos poucos eficientes mesmo em ambientes naturais e conservados. Portanto, o rio São Francisco pode estar atuando como uma barreira para o fluxo alélico entre a população de Januária (JAN) e as demais populações.

Porém, os 30% dos maiores valores da relação entre as distâncias genéticas e geográficas que foram mapeados sugerem a existência de descontinuidade genética entre alguns pares de populações, apesar da pequena distância entre elas, que são: C2-MG, C1-MG, C3-MG, MC-JAN, MC-GM, C3-MC, C2-MC, MG-MC, C1-MC. Essa descontinuidade pode causar, segundo Telles (2005), uma subestimativa da magnitude da redundância na variabilidade genética medida pelo teste de Mantel. Dessa forma, conforme Diniz-Filho e Telles (2002) propõem, é necessário modificar o procedimento de escolha das UOs, corrigindo essas descontinuidades espaciais.

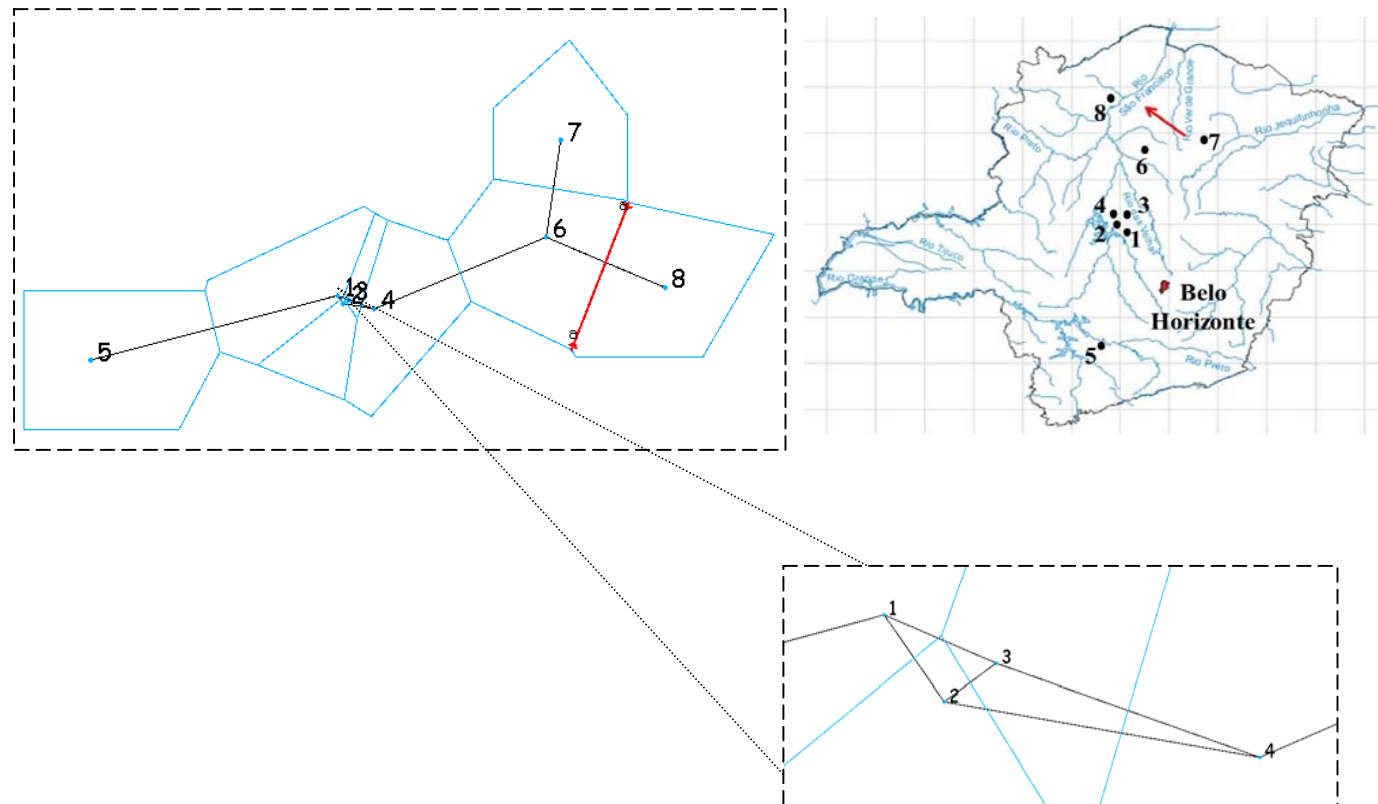


Figura 8 Triangulação de Delaunay com o limite genético (linha em vermelho) e a posição das localidades no mapa de Minas Gerais. 1, 2 e 3 = populações de Curvelo; 4 = Morro da Garça; 5 = Carmo da Cachoeira; 6 = Montes Claros; 7 = Grão Mogol e 8 = Januária

Assim, um novo mapeamento foi feito, com as possíveis unidades operacionais de conservação, levando em consideração a presença de limite genético e descontinuidade genética, totalizando em seis grupos genéticos independentes entre si (Figura 9). Nota-se que cinco destas unidades são formadas somente por uma população, JAN, MC, GM, MG e CC e que, uma unidade compreende as três populações de Curvelo, C1, C2 e C3.

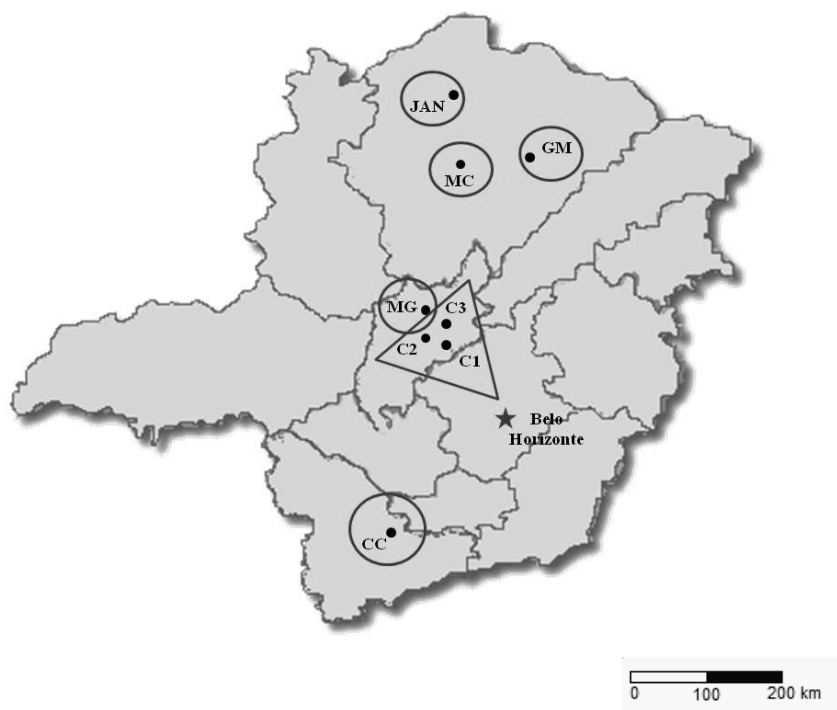


Figura 9 Possibilidade para a definição de Unidades Operacionais Intraespecíficas para *Annona crassiflora* definidas com base no correlograma multivariado e levando-se em conta a presença de limite genético e descontinuidade genética

Utilizando essas unidades operacionais como fontes para bancos de germoplasma e para conservação da diversidade genética dessa espécie, qualquer população que faz parte da mesma UO pode ser utilizada sem

prejuízos para a variabilidade genética, pois elas possuem o mesmo conjunto gênico. Isto permitiria preservar a maior parte da variabilidade genética na área, com menos esforço, o que é uma importante consideração em razão dos altos níveis de perda de habitat nas regiões de estudo e dos altos custos e esforços para a conservação genética.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

As populações de *Annona crassiflora* estudadas aqui possuem alto valor de divergência genética entre si ( $\Theta^B = 0,16$ ), o que torna essencial a conservação genética das mesmas. Apesar de terem sido amostradas oito populações previamente definidas como diferentes entre si, a análise do número provável de populações indicou um total de cinco populações reais e distintas nesta amostragem ( $K = 5$ ), o que pode ser explicado pela proximidade geográfica entre algumas populações.

Pela análise do correlograma multivariado e considerando a presença de limite genético e a existência de descontinuidade genética, pode-se indicar seis possíveis Unidades Operacionais para a conservação da diversidade genética de *A. crassiflora* no estado de Minas Gerais, sendo elas MC, JAN, GM, CC, MG e uma formada pelas três populações de Curvelo, C1, C2 e C3. Em estratégias de conservação, e até mesmo para coleção de germoplasma, seria indicado que as amostragens ocorram em localidades com distância entre si superior a 295 km, como indicado pelo correlograma matricial. E esta distância deve ser considerada também para se preservar outras populações de *A. crassiflora*. Com esta estratégia seria possível conservar a maior parte da diversidade genética na área, com menor esforço, sendo isto, de extrema importância considerando os altos níveis de fragmentação no Cerrado.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTINI, A. P. et al. Genetic diversity of natural populations of *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae) in the Cerrado of São Paulo State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 52-63, jan., 2009.

CHAVES, M. M. F.; USBERTI, R. Previsão da longevidade de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 557-564, out-dez. 2003.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; TELLES, M. P. C. Optimization procedures for establishing reserve networks for biodiversity conservation taking into account population genetic structure. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 207-214. 2006.

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

DINIZ-FILHO, J.A.F. et al. Spatial autocorrelation and red herrings in geographical ecology. **Global Ecology and Biogeography**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 53-64, jan. 2003

FALUSH, D; STEPHENS M; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, Austin, v. 164, p. 1567-1587, ago. 2003.

HOLSINGER K. E.; LEWIS P. O. **HICKORY v. 1.0**. 2003. Department of Ecology and Evolutionary Biology, The University of Connecticut. Disponível em: <[www/eeb.uconn.edu](http://www/eeb.uconn.edu)>. Acesso em: 05 out. 2010.

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

HOLSINGER, K. E. Analysis of genetic diversity in geographically structured populations: a Bayesian perspective. **Hereditas**, Londres, v. 130, n. 3, p. 245–255, ago. 1999.

HOLSINGER, K. E.; WALLACE, L. E. Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, n. 3, p. 887–894, mar. 2004.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Montpellier, v. 19, n. 3, p. 707-713, jun. 2005.

LEGENDRE P.; LEGENDRE, L. **Numerical Ecology**. Amsterdam: Elsevier. 1998. 870 p.

LEITE, K. C. E. **Análise da Estrutura Genética e Biologia Reprodutiva do Papagaio – Verdadeiro (*Amazona aestiva*)**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília, Brasília. 2007.

MANEL, S. et al. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 18, n. 4, p. 189–197, abr. 2003.

MANNI, F.; GUÉRARD E.; HEYER, E. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’s algorithm”. **Human Biology**, Paris, v. 76, n. 2, p. 173-190, abr. 2004.

MELO, D. L. B. **Dispersão, Fenologia e Conservação de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)**. 2009. 75 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG. 2009.

MOGG, R. J.; BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, Dordrecht, v. 3, n. 4, p. 666-668, out. 2003.

NEWTON, A. C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, Londres, v. 14, n. 4, p. 140-145, abr; 1999.

PAULA, M. F. B. **Estudo da variabilidade genética da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* BENTH.) na região norte do estado Minas Gerais**. 2006. 38 f. Monografia (Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros. 2006.

PEARSE, D. E.; CRANDALL, K. A. Beyond F-ST: Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, Amsterdam v. 5, n. 5, p. 585-602, set. 2004.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W.; FALUSH, D. **Structure software: version 2.3**. 2004. Disponível em :< [http:// pritch.bsb.uchicago.edu](http://pritch.bsb.uchicago.edu)>. Acesso em: 23 out. 2010.

RAJORA, O. P.; MOSSELER, A. Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources. **Euphytica**, Amsterdam, v. 118, n. 2, p. 197–212, mar. 2001.

RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M. **Tecnologia da produção do marolo**. Lavras: Editora UFLA. 2005. 53 p.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado, **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 5, n. 3, p. 253-260, set-dez. 2006.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 2.11. New York: Applied Biostatistics. 2000. 470 p.

SOARES, T. N. et al. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. **Genetica**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 9–19, jan. 2008.

SOKAL; R. R.; SMOUSE, P. E.; NEEL, J. V. The genetic structure of a tribal population, the *Yanomama* indians. XV patterns inferred by autocorrelation analysis. **Genetics**, Austin, v. 114, n. 1, p. 259-287, set. 1986.

SPIEGELHALTER, D. J. et al. Bayesian measures of model complexity and fit. **Journal of the Royal Statistical Society Series B**, Londres, v. 64, n. 4, 483–689, mar. 2002.

TELLES, M. P. C. **Estrutura genética populacional de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae) e padrões de ocupação humana no estado de Goiás**. 2005. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais). Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia. 2005.

TELLES, M. P. C. et al. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC (‘cagaiteira’ - Myrtaceae) in Central Brazil: spatial analysis and implications for conservation and management. **Conservation Genetics**, Amsterdam, v. 4, n. 6, p. 685-595, nov. 2003.

TOMIMATSU, H. et al. Genetic diversity and multilocus genetic structure in the relictual endemic herb *Japonolirion osense* (Petrosaviaceae). **Journal Of Plant Research**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 13-18, fev. 2004.

VIANA E SOUZA, H. A.; LOVATTO, M. B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, Utah, v. 38, n. 1, p. 49–56, fev. 2010.

WATTS, P. C. et al. D. J. Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale*. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, n. 10, p. 2931-2945, out. 2004.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, Oxford, v. 15, p. 395-420. 1951.

## IMPLICAÇÕES PARA O EXTRATIVISMO SUSTENTÁVEL E CONSERVAÇÃO DE *Annona crassiflora* Mart. NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Conhecer os aspectos ecológicos e genéticos das espécies, que se encontram em ambientes degradados e fragmentados, permite elaborar e implementar medidas mais efetivas para a conservação *in situ* e *ex situ*. Neste estudo a *Annona crassiflora* teve seus aspectos genéticos abordados e por meio dos resultados obtidos foi possível indicar unidades operacionais para a sua conservação e manejo.

O trabalho permitiu analisar a diversidade e diferenciação genética entre as populações, e estas, mesmo apresentando alta reserva de variabilidade genética, já apresentam taxas intermediárias de diferenciação genética, podendo ser explicada pelo baixo fluxo alélico entre as mesmas. Por este motivo, deve-se ter uma atenção prioritária ao extrativismo dessa espécie, principalmente no norte de Minas Gerais, região de intenso extrativismo predatório da espécie, uma vez que esta diferenciação genética entre as populações tende a aumentar ao longo das gerações.

Além disso, pode-se perceber que em algumas populações amostradas, os indivíduos encontram-se estruturados espacialmente, indicando que o processo de fragmentação do Cerrado pode estar afetando os padrões de reprodução desta espécie, o que pode levar ao cruzamento entre indivíduos aparentados gerando endogamia. Esse processo faz com que a espécie, em longo prazo, perca sua capacidade produtiva.

Dessa forma, os resultados deste trabalho demonstram a necessidade de se conservar as populações naturais de *A. crassiflora* para que a sua variabilidade genética não seja perdida ao longo das gerações, afetando o seu potencial evolutivo. Assim, seis Unidades Operacionais para a conservação da

mesma foram indicadas, baseada no correlograma de Mantel, nos limites genéticos e nas descontinuidades genéticas existentes entre essas populações. Estas unidades são formadas pelas populações de Montes Claros (MC), Grão Mogol (GM), Januária (JAN), Carmo da Cachoeira (CC), Morro da Garça (MG) e pelas três populações de Curvelo (C1, C2 e C3).

Aliado aos demais dados de ecologia existentes sobre a *A. crassiflora*, os dados obtidos aqui servirão de subsídios para o desenvolvimento de metodologias para a preservação e manejo dessa espécie. É necessária uma atenção especial às práticas extrativistas, de forma a não prejudicar a perpetuação local da espécie, e que esta continue sendo fonte de renda para as diversas populações que dependem desse recurso.