

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE ARATICUNZEIRO (*Annona crassiflora* Mart.) POR MEIO DA ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE cpDNA¹

Angel José Vieira Blanco², Marlei de Fátima Pereira²,
Alexandre Siqueira Guedes Coelho², Lázaro José Chaves³

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY OF NATURAL POPULATIONS
OF *Annona crassiflora* (MART.) BY cpDNA
SEQUENCE ANALYSIS

The severe degradation of Cerrado and the predatory extractivism that threatens many species calls for research to support future conservation programs. The "araticunzeiro" (*Annona crassiflora* Mart.) is a tropical fruit tree species from Cerrado (Brazilian savannah) with high economic potential. Eighty-two individuals from eleven natural populations were submitted to genetic analysis to search for the genetic status of the species and to guide future conservation strategies. The analysis of the polymorphism present in sequences of the *trnL* of the chloroplastial genome and further application of the models associated to the coalescent theory lead to the detection of high levels of genetic diversity in the species. The results showed that, in spite of the high level of genetic similarity among different populations, there is an incipient, but statistically significant, increasing differentiation process taking place due to current status of geographical isolation and genetic drift. The genetic differentiation coefficient among populations was 7.3%. The spatial genetic divergence analyses showed that genetic distances are not associated to geographical distances between populations, suggesting the absence of current gene flow among them. Populations from well conserved status and down to dangerous very low levels of genetic diversity were detected.

KEY WORDS: genetic diversity, cpDNA, chloroplast DNA.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é um extenso bioma brasileiro que abriga milhares de espécies de aves, mamíferos, plantas e outros organismos. Em meio à sua rica

RESUMO

A forte degradação do bioma Cerrado, aliada ao extrativismo predatório a que muitas espécies vêm sendo submetidas, justifica a necessidade de pesquisas que subsidiem a sua conservação. O araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) é uma espécie de árvore frutífera nativa do bioma Cerrado, com elevado potencial de utilização econômica. Objetivando obter informações que indiquem o status genético desta espécie e orientem futuras estratégias de conservação, 82 indivíduos provenientes de onze populações naturais foram analisados geneticamente. A análise do polimorfismo presente em seqüências da região *trnL* do genoma cloroplastidial e posterior aplicação dos modelos associados à teoria da coalescência permitiram a detecção de elevados níveis de diversidade genética na espécie. Os resultados indicam que, embora as populações amostradas tenham demonstrado elevada similaridade genética entre si, há uma incipiente, mas significativa diferenciação genética entre elas, que tende a aumentar progressivamente devido ao efeito do isolamento geográfico e à força da deriva. O coeficiente de diferenciação genética entre as populações foi de 7,3%. A análise espacial de divergência entre as populações não revelou correlação entre distâncias genéticas e geográficas, sugerindo ausência de fluxo gênico atual entre elas. Dentre as populações amostradas, identificaram-se desde aquelas em bom estado de conservação até populações com baixíssimos níveis de diversidade genética.

PALAVRAS-CHAVE: araticum, diversidade genética, cpDNA, DNA cloroplastidial.

diversidade encontram-se plantas que guardam muitas propriedades interessantes, algumas particularmente importantes para o homem, quer seja como alimento, fármaco ou ainda como cosmético, entre

1. Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Goiás (UFG).

Trabalho recebido em nov./2005 e aceito para publicação em set./2007 (registro nº 659).

2. Laboratório de Genética Vegetal, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Caixa Postal 131, Campus II-UFG, CEP 74001-970 Goiânia, GO. E-mails: angelblanco@gmail.com; acoelho@icb.ufg.br

3. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. Goiânia, GO. E-mail: Ichaves@agro.ufg.br

outras utilizações. Dentre as muitas espécies de plantas com características especiais existentes no Cerrado encontra-se *Annona crassiflora*, comumente conhecida como araticunzeiro.

O araticunzeiro destaca-se por possuir propriedades farmacológicas especiais que incluem a sua utilização por populações regionais no tratamento de picadas de cobras (Santos *et al.* 1996) e em afecções parasitárias no couro cabeludo (Almeida *et al.* 1998). Substâncias extraídas do araticunzeiro já foram também testadas no combate a células tumorais (Santos *et al.* 1998) e micoses sistêmicas (Ribeiro *et al.* 2000). Seus frutos são ainda utilizados como fonte de matéria prima na confecção de uma ampla diversidade de produtos alimentícios, como sorvetes, geléias, cremes e licores. O valor comercial dos frutos e dos produtos deles derivados confere a esta espécie elevado potencial de utilização econômica. Apesar disso, poucos estudos têm sido feitos no sentido de subsidiar uma exploração racional e melhor aproveitamento desta frutífera nativa (Naves *et al.* 1994).

A falta de informações sobre os aspectos genéticos das espécies é um dos principais problemas na avaliação de recursos genéticos e decorre, principalmente, da carência de estudos sobre diversidade genética. Esse problema dificulta o estabelecimento de estratégias que assegurem não só a conservação de populações naturais de plantas ecologicamente importantes, mas também a de outros recursos genéticos potencialmente úteis às populações humanas.

A despeito de sua importância alimentar, farmacológica e medicinal, o araticunzeiro vem sofrendo uma forte pressão devido ao impacto causado pela fragmentação das suas populações seja pelo extrativismo inadequado, ou pela expansão das fronteiras agrícolas. A literatura mostra que processos de fragmentação de populações naturais culminam com a interrupção no fluxo gênico, perda de diversidade, aumento da deriva genética e endogamia, com conseqüente diminuição dos tamanhos efetivos e depressão por endogamia (Young *et al.* 1996). Esses processos podem conduzir as populações à extinção, pois aquelas com baixos níveis de diversidade acabam sucumbindo-se à pressão da seleção natural.

Apesar de ainda não existirem muitas informações sobre a diversidade genética do araticunzeiro, a variação fenotípica encontrada nos

frutos (peso, forma e volume) e na qualidade da polpa (coloração, sabor, consistência e volume) permite inferir que existe considerável variabilidade genética em seu ambiente natural (Ribeiro *et al.* 2000).

O objetivo principal deste trabalho foi analisar a magnitude e a distribuição da diversidade genética em populações naturais de *A. crassiflora*, no Estado de Goiás, utilizando-se seqüências não codificantes (*trnL*) do DNA de cloroplastos (cpDNA). Um segundo objetivo foi ampliar a caracterização genética desta espécie, de modo a subsidiar a adoção de estratégias adequadas de conservação e melhoramento dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal foi coletado no Estado de Goiás, em áreas que há algum tempo já vêm sendo estudadas por pesquisadores da UFG. A amostra total consistiu de onze populações, cada uma sendo representada por oito indivíduos. As populações foram identificadas de acordo com a numeração pré-existente, estabelecida pelos pesquisadores em estudos anteriores. Assim, das quatorze populações descritas em estudos prévios (Bandeira 2002, Braga Filho 2003), apenas onze foram utilizadas (Tabela 1).

As coletas foram realizadas entre os meses de setembro e novembro, período do ano em que as folhas jovens geralmente desabrocham. A estratégia de coleta para essa época do ano levou em consideração o fato de as folhas adultas conterem

Tabela 1. Coordenadas geográficas relacionadas à localização das populações de *Annona crassiflora* avaliadas.

População ¹	Município	Latitude	Longitude	Altitude (m)
2	Orizona	16°48'10"	48°12'06"	940
4	Rio Verde	17°19'25"	51°33'47"	1000
5	Serranópolis	17°58'46"	52°28'48"	820
6	Mineiros	18°19'39"	52°52'91"	836
7	Itarumã	18°43'31"	51°24'21"	570
8	Aragoiânia	16°51'30"	49°28'10"	880
10	Água Fria	14°59'26"	47°46'30"	870
11	Alto Paraíso	14°07'47"	47°32'21"	1280
12	Campos Belos	12°59'10"	46°31'13"	710
13	Posse	14°06'47"	46°18'39"	820
14	Cabeceiras	15°36'07"	47°06'25"	990

¹- A identificação numérica das populações seguiu ao padrão adotado por (Braga Filho 2003).

quantidade muito grande de compostos secundários, o que dificulta a extração do DNA. Assim, procurou-se coletar apenas brotos ou folhas ainda no início do seu desenvolvimento.

Extração e amplificação de cpDNA

O protocolo utilizado nas extrações de DNA foi semelhante ao que é utilizado na maioria dos estudos de genética de plantas nativas do Cerrado, descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), baseado no uso do detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Apesar da semelhança com outros protocolos utilizados para outras espécies, algumas adaptações foram feitas no sentido de atender às peculiaridades do araticunzeiro. As modificações consistiram na adição de 0,2% de Polivinil-polipirrolidone (PVPP) ao tampão de extração original (Ferreira & Grattapaglia 1998) e no aumento da quantidade de β -mercaptoetanol para 1%.

As reações para amplificação do fragmento de cpDNA desejado foram realizadas utilizando-se um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados: 2,0 ng de DNA; KCl (50 mM); Tris-HCl pH 8,3 (10 mM); MgCl₂ (3,5 mM); dNTPs (0,2 mM de cada); 1,25 pmoles de cada primer; 1U de Taq DNA polimerase, para um volume final de 13 μ L. A reação foi realizada a partir de uma desnaturação inicial a 94°C por 3', ao longo de 44 ciclos constituídos por 94°C por 1', 55°C por 1' e 72°C por 2'; com polimerização final a 72°C por 10'.

Após a amplificação, alíquotas dos produtos resultantes foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose (1%), submersa em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM e EDTA 2 mM), por cerca de duas horas, sob voltagem constante (100 V). Os géis foram corados com brometo de etídeo (1,0 mg.mL⁻¹), visualizados e fotodocumentados sob luz UV pelo sistema eletrônico de captura de imagem EDAS 290 (Kodak). Este procedimento teve como objetivo confirmar o sucesso das reações de amplificação.

Seqüenciamento da região *trnL* de cpDNA

Os fragmentos amplificados foram submetidos à reação de seqüenciamento, com base no método de Sanger *et al.* (1977), utilizando-se dideoxynucleotídeos marcados com fluorescência. Essa reação obedeceu trinta ciclos, constituídos dos seguintes passos: 45" a 92°C, 45" a 55°C e 4' a 60°C, além de

um passo final de 10' a 60°C. As reações de seqüenciamento foram estabelecidas a partir de 2 μ L do produto da PCR (fragmento de cpDNA de interesse); 1 μ L de pré-mix Dyanamic (Amersham, Inc.); 2,5 pmoles do primer 1 (Tabela 2); 2 μ L do tampão save-money (Tris-HCl 0,2 mM; MgCl₂ 5 mM), para uma quantidade final de 10 μ L.

Tabela 2. Par de primers, originalmente desenvolvido por Taberlet *et al.* (1991), utilizado na amplificação e seqüenciamento da região *trnL* do cpDNA de *Annona crassiflora*.

Primer 1	Primer 2
5' CGAAATCGGTAGACGCTACG 3'	5' GGGGATAGAGGGACTTGAAC 3'

Os fragmentos produzidos durante a reação de seqüenciamento foram purificados, removendo-se os nucleotídeos não incorporados durante a reação, através de precipitação com isopropanol, posterior lavagem com etanol e submissão à eletroforese capilar, utilizando-se um analisador automático de fragmentos ABI-3100 (Applied Biosystems, Inc.). Para tanto, os fragmentos purificados foram ressuspensos em formamida Hi-Di e desnaturados por 5' a 95°C.

Análise dos resultados

As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal-X (Thompson *et al.* 1997). O ajuste do alinhamento foi realizado para reduzir o número de inserções e deleções. Para isso, utilizou-se o programa BioEdit (Hall 1999).

As seqüências obtidas foram caracterizadas em termos do número de haplótipos encontrados, diversidade de haplótipos e diversidade de nucleotídeos por sítio, dentro e entre populações, utilizando-se os programas Mega (*Molecular Evolution Genetic Analysis*), versão 3.0 (Kumar *et al.* 2004) e Arlequin, versão 2.0 (Schneider *et al.* 1992).

A estrutura genética de *A. crassiflora* foi explorada por meio do coeficiente de variação genética (G_{ST}) (Nei 1973), análogo ao F_{ST} (Wright 1951), que mede a proporção da variação genética total existente que está distribuída entre as populações. Esse procedimento também foi conduzido utilizando-se o programa Mega 3.0. Este software também foi utilizado para a obtenção da matriz com as estimativas das distâncias genéticas entre as populações e na análise de agrupamento das populações, utilizando-se o algoritmo de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei

1987). O gráfico de dispersão entre distâncias genéticas e distâncias geográficas foi obtido utilizando-se o programa NTSysPc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*), versão 2.1 (Rohlf 2000). O programa NTSysPc foi utilizado ainda para a realização da análise de coordenadas principais (PCo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversidade genética

A amplificação e o seqüenciamento da região *trnL* de cpDNA gerou um alinhamento composto por 519 pares de bases. Foram observados nesse fragmento 147 sítios polimórficos (28,3%) e 372 sítios conservados (71,7%). A análise das seqüências mostrou ainda que o conjunto total de populações apresentou as seguintes proporções médias de nucleotídeos: 24,5%, 18,7%, 36,3%, 20,5%, para timina (T), citosina (C), adenina (A) e guanina (G), respectivamente. As proporções encontradas para os nucleotídeos A e T foram maiores do que as proporções de C e G. Juntos, A e T somaram aproximadamente 61%. Essa proporção é semelhante à composição nucleotídica encontrada (64%) na maioria dos trabalhos com regiões não codificantes de cloroplastos (Chiang *et al.* 2001, Lu *et al.* 2002, Su *et al.* 2005).

A análise genética das populações de *A. crassiflora* permitiu a detecção de níveis elevados de diversidade de haplótipos ($H_d = 0,875$) e de diversidade nucleotídica ($\pi = 0,0335$). A análise global revelou uma variação de 0,778 (Posse) a 0,875 (Orizona, Serranópolis, Mineiros, Itarumã e Campos Belos) na diversidade de haplótipos, enquanto a variação encontrada na diversidade de nucleotídeos foi de 0,0014 (Orizona e Alto Paraíso) a 0,0335 (Mineiros) (Tabela 3). Esses resultados sugerem a existência de um elevado nível de diversidade genética nas populações amostradas, em conformidade com achados de outros autores (Bandeira 2002, Telles *et al.* 2003), que também encontraram um elevado nível de diversidade genética em populações naturais de araticunzeiro.

Os resultados apresentados na Tabela 3 e na Figura 1 mostram que apesar da ocorrência de populações com a mesma diversidade de haplótipos, foram encontradas algumas diferenças importantes entre os níveis de diversidade nucleotídica das populações. Deve-se ressaltar que, em princípio, não

Tabela 3. Valores observados de diferentes medidas de diversidade genética em nível molecular, na região *trnL* de cpDNA de onze populações naturais de *Annona crassiflora* (n: número de indivíduos avaliados; S: número de sítios segregantes; h: número de haplótipos diferentes encontrados; H_d : diversidade de haplótipos; π : diversidade nucleotídica).

Populações ¹	n	S	h	H_d	π (erro padrão)
Orizona	8	16	8	0,875	0,0014 (0,0008)
Rio Verde	8	54	8	0,875	0,0245 (0,0037)
Serranópolis	8	33	8	0,875	0,0136 (0,0028)
Mineiros	8	59	8	0,875	0,0335 (0,0040)
Itarumã	8	20	8	0,875	0,0127 (0,0026)
Aragoiânia	7	26	7	0,857	0,0130 (0,0029)
Água Fria	7	36	7	0,857	0,0161 (0,0030)
Alto Paraíso	8	10	7	0,844	0,0014 (0,0008)
Campos Belos	8	29	8	0,875	0,0129 (0,0026)
Posse	6	31	6	0,833	0,0148 (0,0031)
Cabeceiras	6	15	6	0,833	0,0052 (0,0020)

¹- As populações estão identificadas pelo município de origem.

existe relação direta entre as estimativas de diversidade de haplótipos e de nucleotídeos. Com apenas um nucleotídeo de diferença em cada par de seqüências, a diversidade de haplótipos de qualquer população já assumirá valores relativamente altos. O mesmo não se pode dizer da estimativa de diversidade nucleotídica. Esta, para ser alta, requer muitas diferenças entre os sítios das seqüências comparadas e, por isso, se torna uma medida de diversidade genética mais robusta.

Quando comparadas às demais, as populações Mineiros e Rio Verde apresentaram níveis de diversidade nucleotídica muito superiores. A razão da diferença entre os níveis de diversidade pode estar na presença de dois haplótipos (04.01 e 06.04), que parecem ter exercido uma grande influência sobre o

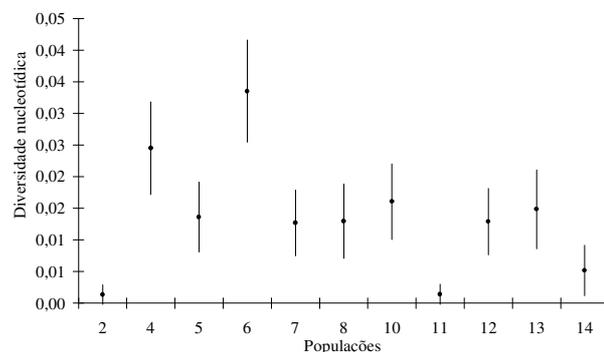


Figura 1. Gráfico ilustrativo dos valores observados de diversidade nucleotídica em onze populações naturais de *Annona crassiflora* (2- Orizona; 4- Rio Verde; 5- Serranópolis; 6- Mineiros; 7- Itarumã; 8- Aragoiânia; 10- Água Fria; 11- Alto Paraíso; 12- Campos Belos; 13- Posse; e 14- Cabeceiras; o comprimento das linhas verticais denota a magnitude do intervalo de confiança a 95%).

parâmetro π . Uma análise posterior dos cromatogramas referentes a estes dois haplótipos revelou que os níveis de confiança associados à qualidade do seqüenciamento, nestes casos, é apenas razoável. A retirada destes dois haplótipos da análise tornou os níveis de diversidade encontrados nestas duas populações similares às populações Serranópolis, Itarumã, Aragoiânia, Água Fria, Campos Belos e Posse. Como a presença dos haplótipos não exerceu influência detectável sobre as estimativas dos demais parâmetros analisados, optou-se pela sua manutenção no restante do trabalho. Digno de nota são os baixos níveis de diversidade nucleotídica encontrados nas populações Orizona e Alto Paraíso, e em menor escala, na população Cabeceiras. Em tais populações, entretanto, não foi verificado qualquer sinal evidente de perturbação antrópica, sugerindo que os baixos índices de diversidade nucleotídica observados possam estar refletindo a ocorrência recente de gargalos demográficos (*bottlenecks*) associados a outros fatores.

Estrutura genética

Embora os níveis observados de diversidade nucleotídica possam ser considerados elevados, de modo geral, pode-se afirmar que a relação entre os agrupamentos formados pelas populações amostradas e a distância geográfica entre elas é apenas razoável. O dendrograma apresentado na Figura 2 mostra que populações próximas geograficamente não necessariamente o são do ponto de vista genético. Esse resultado pode ser explicado levando-se em consideração

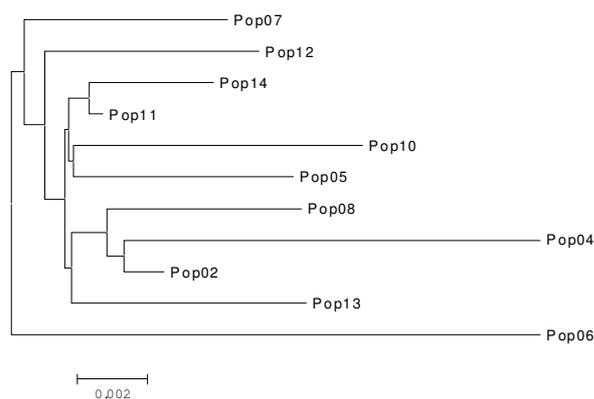


Figura 2. Dendrograma baseado na proporção média de diferenças entre pares de haplótipos encontrados em populações (Pop) de *Annona crassiflora* localizadas no Estado de Goiás (02- Orizona; 04- Rio Verde; 05- Serranópolis; 06- Mineiros; 07- Itarumã; 08- Aragoiânia; 10- Água Fria; 11- Alto Paraíso; 12- Campos Belos; 13- Posse; e 14- Cabeceiras).

o fato de que a fragmentação do Cerrado ocorreu apenas recentemente, isto é, a ocupação e a exploração desse bioma ocorreram ao longo dos últimos sessenta anos. Assim, aparentemente não houve ainda tempo suficiente para que as populações exibam diferenças genéticas significativas.

O gráfico de dispersão entre os valores de distância genética e distância geográfica é apresentado na Figura 3 (ver também Tabela 4). Embora o padrão de dispersão encontrado apresente a tendência de que o aumento da distância geográfica seja acompanhado por aumento da divergência genética, este efeito não foi estatisticamente significativo em nível de 5% de probabilidade. Deve-se considerar que a distância geográfica mínima entre as populações avaliadas é de 58 km (Tabela 4). Estes resultados não eliminam a possibilidade de que os efeitos decorrentes do isolamento por distância (Wright 1943), no qual o fluxo gênico diminui à medida que a distância geográfica entre as populações aumenta, estejam ocorrendo em escalas menores. Ao mesmo tempo, deve-se considerar que o isolamento recente entre estas populações pode ainda não ter exercido efeito, de modo a estabelecer um padrão claro de associação entre as distâncias geográficas e genéticas.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que uma parte razoável da diversidade genética encontrada em *A. crassiflora* (7,3%) está distribuída entre as populações. Segundo Hamrick & Godt (1996), a distribuição da diversidade genética é influenciada pelo sistema reprodutivo, de forma que em espécies que se autofecundam, mais de 50% da diversidade é encontrada entre as populações e, em espécies de fecundação cruzada, em média, 20% da variação genética está distribuída entre as populações.

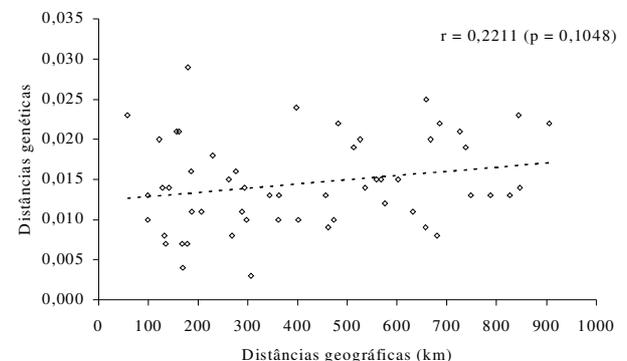


Figura 3. Gráfico de correlação entre distâncias genéticas e geográficas observadas entre diferentes populações de araticunzeiro localizadas no Estado de Goiás.

Tabela 4. Matriz de distâncias genéticas e geográficas entre onze populações de araticunzeiro no Estado de Goiás (abaixo da diagonal principal estão as distâncias genéticas – proporção média de diferenças entre haplótipos de populações diferentes, e acima desta diagonal, as distâncias geográficas entre populações, em km).

Populações	(OR)	(RV)	(SE)	(MI)	(IT)	(AR)	(AF)	(AP)	(CB)	(PO)	(CA)
Orizona (OR)		363	473	525	401	135	207	306	462	362	178
Rio verde (RV)	0,013		122	179	157	229	482	559	726	667	513
Serranópolis (SE)	0,010	0,020		58	141	344	602	680	847	788	631
Mineiros (MI)	0,020	0,029	0,023		162	397	659	738	905	845	686
Itarumã (IT)	0,010	0,021	0,014	0,021		293	568	658	826	748	575
Aragoiânia (AR)	0,007	0,018	0,013	0,024	0,014		276	268	536	457	289
Água Fria (AF)	0,011	0,022	0,015	0,025	0,015	0,016		99	262	186	99
Alto Paraíso (AP)	0,003	0,015	0,008	0,019	0,009	0,008	0,010		168	133	170
Campos Belos (CB)	0,009	0,021	0,014	0,022	0,013	0,014	0,015	0,007		128	298
Posse (PO)	0,010	0,020	0,013	0,023	0,013	0,013	0,016	0,008	0,014		187
Cabeceiras (CA)	0,007	0,019	0,011	0,022	0,012	0,011	0,013	0,004	0,010	0,011	

A Figura 4 traz a representação tridimensional da diversidade genética que está distribuída entre as populações. Observa-se que as populações Rio Verde (4), Mineiros (6) e Água Fria (10) são responsáveis pela maior parte da variação genética que está localizada entre as populações. Observa-se ainda que no grupo representado pelas demais populações, há uma modesta diferenciação das populações Aragoiânia (8), Itarumã (7) e Posse (13), com tendência a tornar-se significativa.

Embora não seja possível detectar os efeitos da endogamia através de cpDNA, uma vez que sua transmissão é uniparental, a razoável proporção da variação genética encontrada entre as populações de *A. crassiflora* assemelha-se aos resultados de Telles *et al.* (2003), que ao usar DNA nuclear, sugeriu que o sistema reprodutivo da espécie é preferencialmente alógamo. É importante considerar também que, a alta proporção da variabilidade genética encontrada dentro das populações deve ser interpretada como resultante de elevadas taxas de fluxo gênico que devem ter operado no passado. A forte fragmentação do bioma Cerrado na atualidade, certamente, representa uma barreira sobre a qual dificilmente eventos migratórios poderiam ocorrer nessa espécie, sobretudo entre populações separadas por centenas de quilômetros.

O atual padrão de distribuição da diversidade genética de *A. crassiflora* sugere que futuros pro-

Tabela 5. Distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações de araticunzeiro localizadas no Estado de Goiás, obtida pelo coeficiente de variação genética G_{ST} .

Fonte de variação	Diversidade genética	%
Entre populações	0,00106	7,3
Dentro das populações	0,01355	92,7
Diversidade genética total	0,01461	100,0

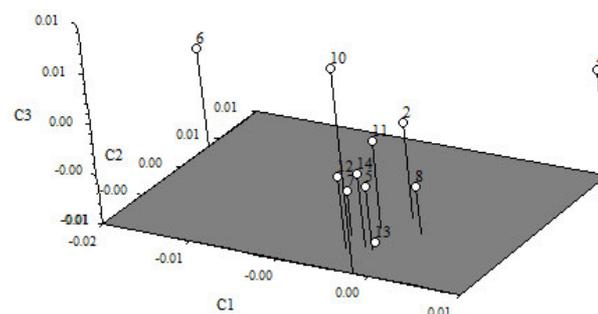


Figura 4. Representação da análise de coordenadas principais (PCo), em três eixos (C_1 , C_2 e C_3), baseada na proporção média de diferenças entre haplótipos de populações de araticunzeiro, no Estado de Goiás (2- Orizona; 4- Rio Verde; 5- Serranópolis; 6- Mineiros; 7- Itarumã; 8- Aragoiânia; 10- Água Fria; 11- Alto Paraíso; 12- Campos Belos; 13- Posse; e 14- Cabeceiras).

gramas de conservação *ex-situ* devam amostrar maior número possível de populações, a fim de se coletar a parte da variação genética presente entre elas. Aponta, ainda, para a necessidade de contenção da fragmentação, decorrente das práticas de extrativismo exagerado e de expansão da fronteira agrícola, no intuito de impedir que a divergência genética interpopulacional atinja níveis críticos para a espécie.

CONCLUSÕES

1. Mesmo isoladas geograficamente as populações de *Annona crassiflora* ainda apresentam elevada diversidade genética em termos de polimorfismo de DNA cloroplastidial.
2. Apesar da alta diversidade genética presente na espécie, as populações encontram-se num iminente processo de diferenciação como resultado provável da fragmentação pelo qual o Cerrado vem passando nos últimos sessenta anos. A taxa de divergência entre as populações já se encontra em patamares significativos, a despeito da elevada similaridade existente entre elas.

REFERÊNCIAS

- Almeida, S.P., C.E.B. Proença, S.M. Sano & J.F. Ribeiro. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Embrapa - CPAC, Planaltina. 464 p.
- Bandeira, L.F. 2002. Caracterização genética de populações naturais de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências

- Biológicas. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás. 78 p.
- Braga Filho, J.R. 2003. Comportamento Produtivo do Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) nos Cerrados do Estado de Goiás. Dissertação de Mestrado. Escola de Agronomia. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás. 72 p.
- Chiang, Y., Y.C. Chiang, Y.J. Chen, C.H. Chou, S. Havanond, T.N. Hong & S. Huang. 2001. Phylogeography of *Kandelia candel* in east Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. *Molecular Ecology*, 10: 2697-2710.
- Ferreira, M.E. & D. Grattapaglia. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa - Cenargen, Brasília. 220 p.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hamrick, J.L. & M.J.W. Godt. 1996. Allozyme diversity in plant species. p. 43-63. In A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler & B.S. Weir (Ed.). *Plant Population Genetics, Breeding, And Genetic Resources*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 440 p.
- Kumar, S., K. Tamura & M. Nei. 2004. Mega3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163.
- Lu, S.Y., K.H. Hong, S.L. Liu, Y.P. Cheng, W.L. Wu & T.Y. Chiang. 2002. Genetic variation and population differentiation of *Michelia formosana* (Magnoliaceae) based on cpDNA variation and RAPD fingerprints: relevance to post-Pleistocene recolonization. *Journal of Plant Research*, 115: 203-216.
- Naves, R.V., M.R. Rocha, J.D. Borges & D.T. Filho. 1994. Armazenamento e estratificação de sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). p.11. In Reunião Especial da SBPC, 1. UFU/SBPC. Uberlândia, MG. 85 p.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3321-3323.
- Ribeiro, J.F., M.A. Brito, E.J.S. Junior & C.E.L. Fonseca. 2000. Araticum (Série Frutas Nativas, 12). FUNEP. Jaboticabal. 52 p.
- Rohlf, F. 2000. Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.10. New York.
- Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467.
- Santos, L. P., M.A. Sun, N.J. Boaventura, J.M. Cassady & A. B. Oliveira. 1996. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona Crassiflora* seeds. *Phytochemistry*, 42: 705-707.
- Santos, A.S., E.H.A. Andrade, M.G.B. Zoghbi & J.G.S. Maia. 1998. Volatile constituents of fruits of *Annona glabra* L. from Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, 13: 148-150.
- Saitou, N., M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406 - 425.
- Schneider, S., D. Roesli & L. Excoffier. 2000. Arlequin v. 2.0: Documentation and Program. Disponível em: <http://anthro.unige.ch/arlequin>.
- Su, Y.J., T. Wang, Z. Bo, J. Yu, C. Guo-Pei, O. Pu-Yue, S. Yu-Fei. 2005. Genetic differentiation of relictual populations of *Alsophila spinulosa* in southern China inferred from cpDNA *trnL-F* noncoding sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 323-333.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17: 1105 - 1109.
- Telles, M.P.C., F.D. Valva, F.L. Bandeira, A.S.C. Coelho. 2003. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica*, 26: 123-129.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins. 1997. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 395-420.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138
- Young, A., T. Boyle, T. Brown. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11: 413-418.