



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
MELHORAMENTO DE PLANTAS

**DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA  
E FLUXO DE PÓLEN EM SUBPOPULAÇÕES DE  
*Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)**

**EDIVALDO BARBOSA DE ALMEIDA JÚNIOR**

Orientador

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thannya Nascimento Soares**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1**            **1. Identificação do material bibliográfico:**         **Dissertação**             **Tese**

**1**            **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

**2**

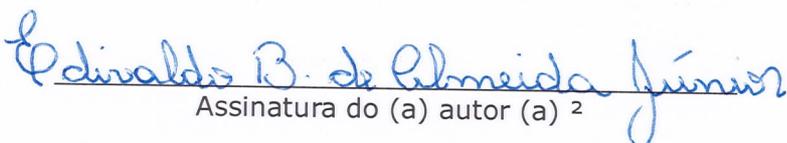
Nome completo do autor: Edivaldo Barbosa de Almeida Júnior

Título do trabalho: Distribuição da variabilidade genética e fluxo de pólen em subpopulações de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM             NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do (a) autor (a) <sup>2</sup>

Data: 08 / 09 / 2016

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**EDIVALDO BARBOSA DE ALMEIDA JÚNIOR**

**DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA  
E FLUXO DE PÓLEN EM SUBPOPULAÇÕES DE  
*Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientadora:

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thannya Nascimento Soares**

Goiânia, GO – Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Barbosa de Almeida Júnior, Edivaldo  
Distribuição da variabilidade genética e fluxo de pólen em  
subpopulações de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) [manuscrito]  
/ Edivaldo Barbosa de Almeida Júnior. - 2015.  
9, 153 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Thannya Nascimento Soares.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de  
Agronomia (EA) , Programa de Pós-Graduação em Genética &  
Melhoramentos de Plantas , Goiânia, 2015.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. biologia reprodutiva. 2. diversidade e estrutura genética. 3.  
genética na escala da paisagem. 4. modelos de nicho ecológico. I.  
Nascimento Soares, Thannya , orient. II. Título.

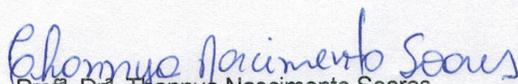


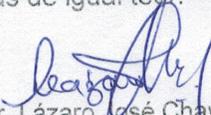
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
MELHORAMENTO DE PLANTAS

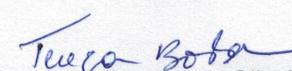


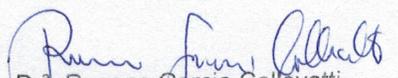
**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE EDIVALDO BARBOSA DE ALMEIDA JÚNIOR.** Aos vinte e um dias do mês de Dezembro do ano de dois mil e quinze (21.12.2015), às 08h00min, no Auditório do Centro de Excelência em Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar, da Escola de Agronomia, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Thannya Nascimento Soares – Presidente/Orientadora; Prof. Dr. Lázaro José Chaves; Dr<sup>ª</sup>. Rosane Garcia Collevatti; Dr<sup>ª</sup>. Tereza Cristina de Oliveira Borba; Dr. João Carlos Nabout. Sob a presidência da orientadora, e em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa da tese intitulada: **“Padrões de distribuição da variabilidade genética dentro e entre subpopulações de *Annona crassiflora* Mart. (*Annonaceae*)”**, de autoria de **Edivaldo Barbosa de Almeida Júnior**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, no nível de Doutorado, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Thannya Nascimento Soares, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da Tese que, em 40 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca argüiu o doutorando, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação da defesa. O título da dissertação foi alterado para “DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA E FLUXO DE POLEN EM SUBPOPULAÇÕES DE *Annona crassiflora* Mart. (*Annonaceae*)”

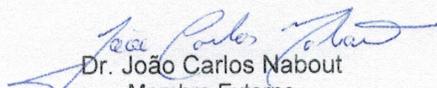
De acordo com a Resolução nº 1053/2011, do CEPEC - Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura, que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, e desde que procedidas às correções recomendadas, a tese será considerada aprovada pela Banca Examinadora, estando integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de DOUTOR EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, pela Universidade Federal de Goiás. O doutorando deverá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar a versão definitiva da tese à Secretaria do PGMP, no prazo máximo de trinta dias após a data da Defesa. A conclusão do Curso e a emissão do Diploma dar-se-ão após o cumprimento do Artigo 52 da Resolução CEPEC nº 1053/2011. A Banca Examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científico(s), oriundo(s) dessa tese, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 13:30. A presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Tese e, para constar eu, Jéssica Almeida, secretária PGMP, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Thannya Nascimento Soares  
Presidente/Orientadora

  
Prof. Dr. Lázaro José Chaves  
Membro Interno

  
Dr<sup>ª</sup>. Tereza Cristina de Oliveira Borba  
Membro Externo

  
Dr<sup>ª</sup>. Rosane Garcia Collevatti  
Membro Interno

  
Dr. João Carlos Nabout  
Membro Externo

*“Na sua definição mais fundamental, a ciência é um modo produtivo de investigação, não uma lista de conclusões sedutoras. As conclusões são as consequências, não a essência”.*

**Stephen Jay Gould**

A todos os meus professores; do jardim de infância à pós-graduação, pois “um professor sempre afeta a eternidade. Ele nunca saberá onde sua influência termina” (Henry B. Adams).

*Ofereço*

A todas as pessoas brilhantes de sorriso largo, abraço apertado e coração sincero, com as quais eu sei que posso compartilhar sonhos malucos, vitórias bravamente cultivadas e eventuais derrotas (in)evitáveis da vida.

*Dedico*

## Agradecimentos

A sessão de agradecimentos da tese tem um título que é totalmente apropriado para o sentimento que predomina, enquanto escrevo essas linhas: gratidão. Um curso de pós-graduação *stricto sensu*, na maioria dos casos, exige um esforço quase visceral para ser finalizado e fazê-lo sozinho, sem auxílio é impraticável. Isso reflete bem o funcionamento da própria Ciência, como um todo, que é um ótimo exemplo de atividade humana fortemente interpessoal, colaborativa, em que cada participante é responsável por uma pecinha do grande quebra-cabeças. Mas como tudo na vida é uma questão de escala e perspectiva, essa pequena parte da grande história demanda muito trabalho árduo, para ser construída, especialmente quando essa elaboração se dá ao mesmo tempo em que se está em formação. E por isso eu tenho muito a agradecer.

Acredito na força do exemplo, enquanto ferramenta de ensino e por isso quero agradecer a todos os professores e pesquisadores, que tanto me influenciaram nesses anos de pós-graduação, por todos os bons exemplos. Quero agradecer imensamente a Professora Mariana Pires de Campos Telles, pelo exemplo de proatividade e eficiência. Eu sempre tive muita dificuldade para gerenciar várias atividades ao mesmo tempo, mas observando a Professora Mariana, que é capaz de fazer TUDO ao mesmo tempo, vejo que é possível se organizar, planejar e executar as atividades. Certamente esse é um ótimo exemplo. Quero agradecer também pela orientação, no primeiro ano de doutorado, na ausência da Profa. Thannya, por motivo de licença maternidade.

Quero agradecer a Professora Rosane Garcia Collevatti, pelo exemplo de produtividade e competência. Os primeiros contatos com a Profa. Rosane foi na disciplina de Genética de Populações, ainda no primeiro ano do mestrado e sou grato por isso, pois pude perceber, pela primeira vez, o tamanho da lacuna existente no meu conhecimento e tive um pequeno vislumbre do esforço que seria necessário, nos anos seguintes, para prosseguir na pós-graduação. Também é graças à Profa. Rosane que publiquei meus primeiros três artigos, que resultaram do estágio de docência, supervisionado por ela.

Agradeço ao Professor Lázaro José Chaves, uma figura sempre presente e tão importante ao longo da pós-graduação. Foi meu coorientador no mestrado, avaliador do projeto de doutorado, banca de qualificação de doutorado, agora na banca de defesa, além

das disciplinas de genética quantitativa e manejo e conservação de recursos genéticos vegetais. Sou grato por todos os ensinamentos, mas sobretudo pelo exemplo de competência profissional e dedicação pelas nossas espécies frutíferas nativas do Cerrado. O Prof. Lázaro formou várias gerações de estudantes (e ainda forma) e me sinto honrado por ter tido essa oportunidade.

Quero agradecer profundamente a minha orientadora e melhor exemplo nesses últimos 6 anos, a Professora Thannya Nascimento Soares. Agradeço pela sensibilidade gigantesca para perceber minhas dificuldades e limitações profissionais e pessoais e a assertividade para saber como lidar com elas adequadamente. Por fazer com que eu me sentisse apoiado, quando muitas vezes o apoio não vinha de onde tradicionalmente se esperava. Agradeço por acreditar que eu conseguiria, quando muitas vezes eu mesmo duvidava profundamente que seria possível transpor certos obstáculos. Sou grato pelo ombro amigo, nos momentos de desespero e pelas palavras carregadas de sabedoria. Sou grato pelo tempo dedicado na minha formação, mas sobretudo pela preocupação com o ser humano que existe por trás do estudante de pós-graduação. Sou grato pela generosidade e por todas as oportunidades que me foram concedidas. Por me ensinar a trabalhar em equipe. Sou grato pelas broncas e por todas as vezes que fui retirado da minha zona de conforto e convidado a crescer um pouco ao longo dessa jornada inesperada pela pós-graduação.

Quero agradecer a super equipe de coleta: Prof. Lázaro, Profª. Mariana, Prof. Ronaldo, Profª. Thannya, Fernanda Fraga e Luciana Vitorino. Obrigado pela dedicação e esforço ao desbravar o Cerrado e recolher cada folha, cada fruto que usei nesse trabalho. Quero agradecer o Prof. Paulo e o Cambuí da UNESP de Ilha Solteira e a Profª. Diana, da Universidade Federal de Uberlândia pelo grande auxílio na coleta das folhas da subpopulação de Selvíria-MS. Agradeço ainda a Profª. Nair, da Universidade Federal de Mato Grosso, quem coletou e enviou tão organizadamente as folhas das plantas da subpopulação de Barra do Garças-MT.

Agradeço a todos os que auxiliaram em algum momento da longa e complexa coleta de dados. Inicialmente à Sara Gondim e todas as pessoas que ajudaram a despolar, catalogar e extrair o DNA das mais de 2500 sementes. Agradeço a Ludymila Guedes, quem me ensinou a genotipar usando o GeneMapper. Agradeço a Deisiany Neres, estudante IC quem ajudou muito com as reações de PCR, para obtenção dos genótipos usados no

capítulo de sistema de cruzamento e dispersão de pólen. Agradeço a Leciane Kárita, as estudantes de doutorado Kássia Marques e Rejane Araújo e de mestrado Rhewter Nunes por serem os meus braços sobressalentes, quando lesionei o ombro por esforço repetitivo e precisei desesperadamente de ajuda no laboratório.

Agradeço a Ramilla Braga, por ajudar a colocar os meus genótipos pra rodar no programa *Structure* no Servidor da Escola de Agronomia. Nesse sentido, também agradeço o Prof. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, por permitir o uso do Servidor. Quero agradecer também o Prof. José Alexandre F. Diniz-Filho, por ceder os “scripts” usados para mensurar a porcentagem de remanescentes de vegetação natural do Cerrado, ao redor das subpopulações, usado no capítulo 3. Agradeço ainda todos os estudantes, pesquisadores e professores do Laboratório de Genética & Biodiversidade – ICB/UFG, pelo excelente trabalho em equipe. Tenho muito orgulho de fazer parte desse grupo. Aprendi muito nesses anos de LGBio e espero manter essa relação sempre.

Gostaria de agradecer aos amigos Eduardo Borges e Leciane Kárita, pelos momentos divertidos e a convivência, que aliviaram as tensões inerentes à pós-graduação. Agradeço a minha família, pelo apoio e por compreenderem as minhas ausências. Um agradecimento muito especial ao Rhewter, por todo o suporte, dedicação e companheirismo nesses últimos anos. A vida é em si um desafio enorme, que exige muita coragem e determinação e ter ao lado pessoas que irradiam bondade e sentimentos dos mais nobres é uma dádiva. Agradeço pela compreensão e incentivo de todos os dias.

Quero agradecer a todas as agências que fomentaram esse trabalho. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que financiaram esse trabalho por meio do GENPAC - Genética Geográfica e Planejamento Regional para Conservação de Recursos Naturais no Cerrado (projetos no. 564717/2010-0, 563727/2010-1, 563624/2010-8 e Universal/CNPq 473277/2012-3). Agradeço imensamente à Universidade Federal de Goiás pela concessão da minha bolsa de estudos, tão importante para minha formação. Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, aos coordenadores: Professoras Mariana Telles e Patrícia Guimarães e à secretária Jéssica Almeida, pela presteza de sempre.

## SUMÁRIO

<b>Lista de figuras</b> .....	10
<b>Lista de tabelas</b> .....	13
<b>RESUMO GERAL</b> .....	15
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	17
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	20
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
2.1 SISTEMA REPRODUTIVO E FLUXO GÊNICO VIA PÓLEN EM POPULAÇÕES DE PLANTAS .....	23
2.2 ESTRUTURA GENÉTICA E PADRÃO ESPACIAL DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS .....	27
2.3 O CLIMA E A PAISAGEM NA DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA NAS POPULAÇÕES NATUAIS .....	34
2.4 MARCADORES MICROSSATÉLITES E A CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES .....	37
2.5 A FAMÍLIA ANNONACEAE E A ESPÉCIE ALVO <i>Annona crassiflora</i> Mart. ....	40
<b>3 SISTEMA DE CRUZAMENTO E FLUXO GÊNICO CONTEMPORÂNEO VIA PÓLEN EM <i>Annona crassiflora</i> Mart.</b>	
RESUMO .....	50
ABSTRACT .....	51
3.1 INTRODUÇÃO .....	52
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	55

<b>3.2.1</b>	<b>Coleta do material vegetal</b>	55
<b>3.2.2</b>	<b>Obtenção dos dados moleculares</b>	55
<b>3.2.3</b>	<b>Avaliação dos locos microssatélites</b>	57
<b>3.2.4</b>	<b>Caracterização genética da população</b>	58
<b>3.2.5</b>	<b>Avaliação do sistema reprodutivo</b>	59
<b>3.2.6</b>	<b>Análise de paternidade e distância de dispersão de pólen</b>	60
<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	62
<b>3.3.1</b>	<b>Polimorfismo dos locos e diversidade genética da população</b>	62
<b>3.3.2</b>	<b>Sistema reprodutivo</b>	65
<b>3.3.3</b>	<b>Fluxo gênico contemporâneo via pólen</b>	72
<b>3.4</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	78
<b>4</b>	<b>ESTRUTURA GENÉTICA EM ESCALA GEOGRÁFICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Annona crassiflora</i> Mart. NO CERRADO BRASILEIRO</b>	
	<b>RESUMO</b>	79
	<b>ABSTRACT</b>	80
<b>4.1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	81
<b>4.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	83
<b>4.2.1</b>	<b>Coleta do material vegetal</b>	83
<b>4.2.2</b>	<b>Obtenção dos dados</b>	84
<b>4.2.3</b>	<b>Análise de dados</b>	86
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	91
<b>4.4</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	108

<b>5</b>	<b>EFEITO DO CLIMA E DA PAISAGEM NA DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE SUBPOPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Annona crassiflora</i> Mart. (Annonaceae) NO CERRADO BRASILEIRO.</b>	
	RESUMO .....	109
	ABSTRACT .....	110
5.1	INTRODUÇÃO .....	111
5.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	113
<b>5.2.1</b>	<b>Parâmetros genéticos populacionais.....</b>	<b>113</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Modelagem de nicho ecológico .....</b>	<b>115</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Caracterização da paisagem nas subpopulações .....</b>	<b>117</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Análise de dados .....</b>	<b>118</b>
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	120
5.4	CONCLUSÕES .....	128
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>130</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>144</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b>	A espécie <i>Annona crassiflora</i> Mart. (araticum). a – a planta de porte arbóreo; b – as folhas crasso-membranosas; c – a flores axilares com pétalas carnosas; d – o fruto do tipo baga de formato subgloboso. (fonte: Google Imagens®).....	43
<b>Figura 2.</b>	Mapa do Brasil evidenciando a distribuição geográfica da espécie <i>A. crassiflora</i> Mart., as linhas em verde demarcam o bioma Cerrado (fonte: Ratter et al., 2000) .....	45
<b>Figura 3.</b>	Antese da flor de <i>Annona crassiflora</i> (A, B, C e D) e aspecto da flor após a queda dos verticilos florais, com algumas anteras pendentes e ainda presas ao receptáculo floral (E). D.1 = primeiro dia, D.2 = segundo dia. (fonte: Cavalcante et al., 2009).....	46
<b>Figura 4.</b>	Imagem de satélite da população natural de Vila Propício - GO no centro do retângulo tracejado, mostrando os fragmentos próximos nos círculos tracejados. (fonte: Google Maps, 2015).....	72
<b>Figura 5.</b>	Distância máxima de polinização detectada por meio da análise de paternidade em plantas da espécie <i>A. crassiflora</i> pertencentes à população natural de Vila Propício, município de Goiás, Brasil.....	74
<b>Figura 6.</b>	Histograma dos eventos de dispersão de pólen da espécie <i>A. crassiflora</i> na população natural de Vila Propício, Goiás, Brasil.....	75
<b>Figura 7.</b>	Área de coleta das 25 subpopulações naturais de araticunzeiro – <i>A. crassiflora</i> Mart. no Cerrado brasileiro.....	84
<b>Figura 8.</b>	Distribuição das frequências alélicas nos seis pares de iniciadores SSR provenientes da genotipagem de 25 subpopulações naturais de <i>A. crassiflora</i> Mart. no Cerrado brasileiro.....	92
<b>Figura 9.</b>	Matriz de distância genética de $\theta$ entre os 25 pares de subpopulações de <i>A. crassiflora</i> no Cerrado brasileiro.....	98
<b>Figura 10.</b>	Agrupamento Bayesiano resultante do programa Structure, mostrando os dois grupos formados a partir da análise genética de 25 subpopulações de <i>Annona crassiflora</i> no Cerrado brasileiro.....	99
<b>Figura 11.</b>	Análise de Coordenadas Principais (PCoA) a partir da matriz de distância genética ( $\theta$ par a par), mostrando as três primeiras coordenadas principais resultante da avaliação genética de 25 subpopulações naturais de <i>Annona crassiflora</i> no Cerrado brasileiro.....	100

<b>Figura 12.</b> Algoritmo de Monmonier aplicado nas arestas da Rede de Gabriel evidenciando a primeira coordenada principal do $\theta$ par a par, com o objetivo de mostrar a descontinuidade genética nas subpopulações de <i>Annona crassiflora</i> no Cerrado brasileiro.....	101
<b>Figura 13.</b> Correlograma de Mantel e diagrama de dispersão entre a matriz de distância genética e geográfica das 25 subpopulações de <i>A. crassiflora</i> no Cerrado brasileiro.....	102
<b>Figura 14.</b> Correlograma de Moran univariado mostrando a autocorrelação espacial nas frequências alélicas. Na esquerda os valores de I de Moran para cada alelo, em vermelho o correlograma do alelo mais frequente e na direita o correlograma médio por loco com o desvio padrão resultante da análise genética de 25 subpopulações naturais de <i>Annona crassiflora</i> no Cerrado brasileiro.....	104
<b>Figura 15.</b> Regressão linear simples entre; A – diversidade genética ( $H_e$ ); B – riqueza alélica ( $Ar$ ) e a longitude de 25 subpopulações naturais de <i>A. crassiflora</i> no Cerrado.....	106
<b>Figura 16.</b> Área de coleta das 25 subpopulações naturais de araticunzeiro – <i>A. crassiflora</i> Mart. no Cerrado brasileiro.....	113
<b>Figura 17.</b> Mapas de adequabilidade ambiental da espécie <i>A. crassiflora</i> , obtidos por meio de 14 modelos de nicho ecológico e 5 modelos climáticos acoplados oceano-atmosfera projetados, reespectivamente, para o último máximo glacial ( $LGM_S$ ), o presente, no período pré-industrial ( $PI_S$ ) e o resultante $\Delta S$ .....	116
<b>Figura 18</b> Camada rasterizada dos remanescentes de vegetação natural do Cerrado na resolução espacial de 1 km, proveniente do Mapeamento das áreas de vegetação remanescente do Cerrado, para os anos de 2008 e 2009 do LAPiG/UFG.....	117
<b>Figura 19.</b> Estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a diversidade genética ( $H_e$ ), riqueza alélica ( $Ar$ ) e coeficiente de fixação intrapopulacional ( $f$ ) das subpopulações naturais de <i>A. crassiflora</i> no Cerrado brasileiro.....	120
<b>Figura 20.</b> Regressão linear simples entre as estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a diversidade genética ( $H_e$ ), riqueza alélica ( $Ar$ ) e coeficiente de endogamia ( $f$ ) com a adequabilidade ambiental do último máximo glacial ( $LGM_S$ ), do período pré-industrial ( $PI_S$ ) e o resultante entre eles ( $\Delta S$ ) da espécie <i>A. crassiflora</i> , no Cerrado brasileiro.....	121
<b>Figura 21.</b> Correlograma de Moran mostrando a autocorrelação espacial do resíduo da análise de regressão linear entre as estimativas de diversidade genética ( $H_e$ ) e riqueza alélica ( $Ar$ ) com a adequabilidade no último máximo glacial ( $LGM_S$ ) e a adequabilidade resultante ( $\Delta S$ ) da espécie <i>Anona crassiflora</i> no Cerrado brasileiro.....	122

**Figura 22.** Diagrama de Venn mostrando os valores obtidos com a análise de partição da variância entre as estimativas dos parâmetros genéticos ( $H_e$  e  $A_r$ ) e a adequabilidade (LGMS,  $\Delta S$ ), após descontar o efeito do espaço geográfico, por meio do PCNM..... 124

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b>	Conjunto de iniciadores microssatélites em esquema de genotipagem multiplex, conforme foram empregados para avaliação do sistema de cruzamento e fluxo gênico via pólen em uma população natural de <i>A. crassiflora</i> , proveniente do estado de Goiás, Brasil.....	57
<b>Tabela 2.</b>	Número de alelos por loco ( $A$ ), heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), probabilidade de identidade ( $PI$ ) e probabilidade de exclusão de paternidade ( $P$ ) dos locos SSR das plantas de <i>A. crassiflora</i> provenientes da população natural de Vila Propício, Goiás, Brasil.....	62
<b>Tabela 3.</b>	Diferenciação das frequências alélicas do “pool” de pólen, em relação às frequências alélicas do conjunto de óvulos, por meio dos valores de $F_{ST}$ por loco, com os respectivos graus de liberdade (GL), $\chi^2$ de cada teste e os valores de $p$ associados a hipótese de homogeneidade das frequências alélicas entre os gametas masculinos e femininos de <i>A. crassiflora</i> provenientes da população natural de Vila Propício, Goiás, Brasil.....	65
<b>Tabela 4.</b>	Estimativas por família da taxa de cruzamento multiloco ( $\hat{t}_m$ ), taxa de cruzamento uniloco $\hat{t}_s$ , taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ( $\hat{t}_m - \hat{t}_s$ ) das plantas de <i>A. crassiflora</i> provenientes da população natural de Vila Propício, Goiás, Brasil.....	66
<b>Tabela 5.</b>	Estimativas por família da correlação multiloco de paternidade ( $\hat{r}_{p(m)}$ ), correlação de autofecundação $\hat{r}_s$ , proporção de irmãos completos ( $\hat{P}_{(IC)}$ ), proporção de meios irmãos ( $\hat{P}_{(MI)}$ ), e proporção de irmãos de autofecundação ( $\hat{P}_{(IA)}$ ) das sementes de <i>A. crassiflora</i> provenientes da população natural de Vila Propício, Goiás, Brasil.....	70
<b>Tabela 6.</b>	Conjunto de iniciadores microssatélites em esquema de genotipagem multiplex, conforme foram empregados para avaliação das 25 subpopulações naturais de araticunzeiro – <i>A. crassiflora</i> Mart. no Cerrado brasileiro.....	85
<b>Tabela 7.</b>	Número de alelos por loco ( $A$ ), diversidade genética ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), coeficiente de endogamia ( $f$ ) estimados com base em seis locos SSR de <i>A. crassiflora</i> .....	91
<b>Tabela 8.</b>	Frequência de alelos nulos estimada pelo método Brookfield em seis locos SSR e 25 subpopulações naturais de <i>A. crassiflora</i> , provenientes do Cerrado brasileiro.....	93

<b>Tabela 9.</b> Estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a riqueza alélica ( $A_r$ ), a diversidade genética ( $H_e$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e o índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), obtidos da genotipagem de seis pares de locos SSR em 25 subpopulações naturais de <i>A. crassiflora</i> provenientes do Cerrado brasileiro.....	95
<b>Tabela 10.</b> Estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a riqueza alélica ( $A_r$ ), a diversidade genética ( $H_e$ ) e o índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), obtidos da genotipagem de seis pares de locos microssatélites em 25 subpopulações naturais de <i>A. crassiflora</i> provenientes do Cerrado brasileiro.....	114
<b>Tabela 11.</b> Graus de liberdade geograficamente efetivos e valores de p associados às análises de regressão linear entre as estimativas dos parâmetros genéticos e a adequabilidade para espécie <i>A. crassiflora</i> , após aplicada a correção de Dutilleul.....	123
<b>Tabela 12.</b> Coeficiente de regressão linear e valor de p associado a hipótese de ausência de relação entre as estimativas dos parâmetros genéticos com a porcentagem de cobertura vegetal, obtida em quatro tamanhos diferentes de área ao redor das populações naturais de <i>A. crassiflora</i> , no Cerrado brasileiro.....	126

## RESUMO GERAL

ALMEIDA JÚNIOR, E.B. **Distribuição da variabilidade genética e fluxo de pólen em subpopulações de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae).** 2015. 153 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015<sup>1</sup>

A espécie *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) é uma planta frutífera nativa do Cerrado, amplamente distribuída ao longo do Bioma. O objetivo do trabalho foi avaliar a distribuição espacial da variabilidade genética em subpopulações naturais da espécie, em um contexto geográfico e relacionar os níveis de diversidade observados com variáveis climáticas e da paisagem, além da distância de dispersão de pólen em escala local, em uma subpopulação natural. No presente estudo foram empregados seis pares de iniciadores microsatélites. Para avaliar a distribuição da variabilidade genética foram amostradas 25 subpopulações naturais, em média 30,6 plantas por subpopulação. Foram estimados os níveis de diversidade genética ( $H_e$ ), riqueza alélica ( $Ar$ ), índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), estrutura genética, por meio do coeficiente de coancestria ( $\theta$ ) e coeficiente de endogamia da população total ( $F$ ). O padrão espacial da variabilidade genética foi avaliado por meio do Teste de Mantel, I de Moran e regressão linear dos parâmetros genéticos com as duas dimensões espaciais (latitude e longitude). As estimativas de  $H_e$ ,  $Ar$  e  $f$  foram relacionadas com métricas de adequabilidade climática e com a porcentagem de remanescentes de vegetação do Cerrado. A dispersão de pólen foi avaliada por meio de análise de atribuição de paternidade usando 572 plantas, que incluem 460 semente, 20 plantas matrizes e 92 candidatos a doadores de pólen, em uma subpopulação natural da espécie. As taxas de fecundação cruzada também foram avaliadas, nas famílias maternas usando o modelo misto de reprodução. As taxas de cruzamento indicam sistema reprodutivo com prevalência de alogamia. A atribuição de paternidade indicou que o fluxo gênico ocorre, prioritariamente, em curtas distâncias, em até 360 metros, na subpopulação

---

<sup>1</sup>Orientadora: Dr<sup>a</sup> Thannya Nascimento Soares. ICB-UFG.

avaliada. As 25 subpopulações apresentam níveis elevados de diversidade e forte estruturação genética. Há endogamia devido à subdivisão, mas não em relação ao sistema de cruzamento. Os demes formaram dois grupos consistentes, com descontinuidade genética entre as subpopulações do noroeste e sudeste da distribuição. A diversidade genética e a riqueza alélica mostraram forte relação com a longitude, sugerindo uma expansão da distribuição na direção sudeste. Foi observado que a distribuição espacial da diversidade genética e riqueza alélica estão relacionadas com a adequabilidade climática no último máximo glacial, por um efeito indireto do espaço geográfico, enquanto que nenhuma relação foi observada com a adequabilidade no presente. A porcentagem de remanescentes da vegetação natural, por sua vez não explicou a distribuição espacial da diversidade genética, riqueza alélica e coeficiente de endogamia.

*Palavras-chave:* biologia reprodutiva, diversidade e estrutura genética, genética na escala da paisagem, modelos de nicho ecológico.

## GENERAL ABSTRACT

ALMEIDA JÚNIOR, E.B. **Distribution of genetic variability and pollen flow in subpopulations of *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae).** 2015. 153 f. Thesis (Doctorate Genetics and Plant Breeding) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015<sup>2</sup>

The *Annona crassiflora* Mart. species (Annonaceae) is a fruit plant native from Cerrado, widely distributed throughout the biome. The goal here was evaluate the spatial distribution of genetic variability in natural subpopulations of the species, geographically, and relate the genetic diversity levels with climatic and landscape profile, furthermore the pollen dispersal within a subpopulation. We used here six pair of microsatellite primers. To evaluate the distribution of genetic variability we sampled 25 natural subpopulations, 30.6 plants per subpopulation, on average. We estimate the genetic diversity ( $H_e$ ), allelic richness ( $A_r$ ), fixation index ( $f$ ), genetic structure, using coancestry coefficient ( $\theta$ ) and inbreeding coefficient of overall population ( $F$ ). The spatial pattern the genetic variability was evaluated by Mantel test, Moran's I index and linear regression of genetic parameter with two spatial dimensions (latitude and longitude). We correlate  $H_e$ ,  $A_r$   $f$  with climate suitability and the percentage of Cerrado vegetation around subpopulations. Furthermore we evaluated the pollen dispersal by paternity analysis, using 572 plants, including 460 seeds, 20 mother plants and 92 pollen donors candidate, within a natural subpopulation. The outcrossing rates were also evaluated in maternal families using the mixed mating model. The outcrossing rates indicate mating system with prevalence of allogamy. The assignment of paternity indicated that gene flow mainly occurs in short distances, until 360 meters, in the subpopulation evaluated. The 25 subpopulations have moderate genetic diversity levels and strong genetic structure. We found inbreeding due to the subdivision, but not in mating within subpopulations. The demes belongs to two consistent groups with

---

<sup>2</sup>Advisor: Dr<sup>a</sup> Thannya Nascimento Soares. ICB-UFG.

genetic discontinuity between the northwest and southeast subpopulations distribution. The genetic diversity and allelic richness showed strong relationship with longitude, suggesting a range expansion in the southeastern direction. We noted that spatial distribution of genetic diversity and allelic richness are related to suitability at the last glacial maximum, by an indirect effect of geographical distances, whereas no relationship was observed regarding present suitability. The percentage of cover natural vegetation, in turn not explain the spatial distribution of genetic diversity, allelic richness and inbreeding coefficient.

*Keywords:* diversity and genetic structure, ecological niche models, landscape genetics, reproductive biology.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) é conhecida popularmente por marolo, araticum-cortiça, araticum-de-boia, araticum-dos-grandes ou araticum-do-campo. O nome *Annona*, referente ao gênero, é proveniente da palavra “annon”, que significa, no Haiti, colheita do ano. O epíteto específico *crassiflora* é uma referência às pétalas grossas encontradas na espécie. O nome popular, araticum, vem do tupi e significa árvore de fibra rija e dura, ou fruto do céu, saboroso, ou ainda fruto mole (Silva Júnior, 2005).

A planta apresenta porte arbóreo com altura de 4 m a 8 m, com tronco geralmente tortuoso de 20 cm a 30 cm de diâmetro, revestido por casca áspera e corticosa que resiste à ação do fogo. As folhas são crasso-membranosas, glaucas e ferrugíneo-hirsutas quando jovens. As flores são solitárias, axilares, com pétalas engrossadas e carnosas. O fruto é do tipo baga subglobosa, de superfície tomentosa e tuberculada ou papilosa, contendo polpa levemente adocicada e de cheiro agradável. Algumas vezes o fruto pode apresentar polpa avermelhada e mais doce (Souza & Lorenzi, 2008). Os frutos podem ser consumidos *in natura*, ou processados de várias formas, com destaque para os doces, as geleias, os licores, os refrescos, os sorvetes e os sucos (Soares et al., 2009).

As populações naturais de *A. crassiflora* Mart. ocorrem nas fitofisiomias do bioma Cerrado que incluem o cerrado em sentido restrito, cerradão e campo limpo. A distribuição geográfica é ampla, sendo encontradas nos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Pará, Bahia, Piauí, Tocantins, Maranhão e, em remanescentes no Paraná e em São Paulo. A espécie não ocorre nos cerrados de Rondônia, Amazonas, Amapá, Roraima e Ceará (Ratter et al., 2000).

As informações referentes à biologia reprodutiva da espécie *Annona crassiflora* são provenientes de estudos de observação do comportamento do polinizador, ou por

polinização manual. Não são conhecidos trabalhos que utilizam marcadores moleculares para avaliar o sistema reprodutivo na espécie, a partir da abordagem direta, avaliando progênes oriundas de um evento de fecundação. Segundo as informações levantadas até o presente momento, o araticunzeiro é considerado autocompatível. Os frutos gerados por autofecundação são viáveis. No entanto, os frutos do araticunzeiro são formados, prevalentemente, por meio da fecundação cruzada. Esse fato faz com que a espécie seja dependente de agentes polinizadores. A planta apresenta cantarofilia, sendo polinizado por besouros da espécie *Cyclocephala spp* (Cavalcante et al., 2009).

A dispersão dos frutos de *A. crassiflora* Mart. é realizada prioritariamente pela anta (*Tapirus terrestris*). Outros animais podem, ocasionalmente, consumir os frutos do araticunzeiro, tais como o veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), lobinho (*Cerdocyon thous*) e tatu (*Dasyus sp.*) e algumas espécies de aves, mas elas não constituem dispersores efetivos. Além disso, as características dos locais de defecação do *T. terrestris* e a eliminação das sementes intactas podem favorecer a germinação da planta (Golin et al., 2011). As sementes de *A. crassiflora* também foram encontradas nas fezes do lobo guará *Chrysocyon b. b. b.* (Motta-Junior et al., 1996), o que indica a possibilidade desse animal constituir um dos dispersores do araticunzeiro.

Estudos realizados com a espécie *A. crassiflora* Mart. por Telles et al. (2003) em seis subpopulações naturais e cinco locos isoenzimáticos, os autores observaram índices elevados de diversidade genética, que variou entre 0,189 e 0,460, com média igual a 0,357. Foi observado ainda que as subpopulações naturais estão estruturadas, com  $G_{ST} = 0,188$ . Blanco et al., (2007), por sua vez, avaliaram onze subpopulações da espécie por meio da sequência não codificante *trnL* do DNA cloroplastidial (cpDNA). Os autores detectaram níveis elevados de diversidade de haplótipos ( $Hd = 0,875$ ) e de diversidade nucleotídica ( $p = 0,0335$ ). Diferentemente do trabalho citado anteriormente, o nível de estruturação genética encontrado pode ser considerado baixo. Cerca de 7% da diversidade genética está no componente interpopulacional.

Iniciadores que amplificam, via PCR, regiões microssatélites, que são específicos para a espécie *A. crassiflora*, foram desenvolvidos por Pereira et al., 2008. Os autores empregaram a metodologia de biblioteca enriquecida de DNA. Foram obtidos 44

pares de iniciadores microssatélites, dos quais, 10 foram selecionados em função da consistência da amplificação e do nível de polimorfismo apresentado. Os iniciadores microssatélites desenvolvidos foram utilizados por Pereira (2007) para avaliar geneticamente 13 subpopulações naturais de *A. crassiflora* Mart. O autor observou um nível elevado de diversidade alélica (0,866). A estrutura genética indica que parte significativa dessa variação está distribuída entre as populações (9,1%).

Cota et al. (2011), por sua vez, avaliaram quatro subpopulações naturais de *A. crassiflora* usando marcadores RAPD, que não são espécie-específicos. Os autores verificaram que a diversidade genética média foi de 0,31, valores comumente encontrados com esse tipo de marcador. A estrutura genética foi elevada, com 22,62% da diversidade genética localizada entre as subpopulações.

Collevatti et al. (2014) compararam a diversidade e a estrutura genética espacial em duas subpopulações de *Annona crassiflora* Mart., uma em área de conservação e outra em área antropizada. Foram empregados dez locos microssatélites. Os níveis de diversidade genética encontrados foram elevados, nos dois ambientes, mas foi maior na população conservada. Os autores observaram que a fragmentação pode influenciar negativamente a dinâmica evolutiva da espécie. Na população antropizada o coeficiente de endogamia foi mais elevado e significativo, enquanto que na população conservada essa estimativa não foi diferente de zero. Os autores verificaram ainda que a subpopulação conservada apresentou estrutura genética espacial de baixa magnitude, enquanto que a subpopulação antropizada mostrou ajuste ao modelo de isolamento por distância.

Assim, o objetivo do trabalho é avaliar o nível de diversidade e estrutura genética, em escala geográfica, bem como a dispersão de pólen em subpopulações de *A. crassiflora* Mart. no Cerrado brasileiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SISTEMA REPRODUTIVO E FLUXO GÊNICO VIA PÓLEN EM POPULAÇÕES DE PLANTAS

O sistema reprodutivo das angiospermas pode ser classificado com relação ao modo de reprodução, que se refere às formas assexuadas e sexuadas. Os mecanismos assexuados, que são representados pela propagação vegetativa e a apomixia originam, desconsiderando a mutação, uma prole geneticamente semelhante a planta matriz. Nos mecanismos sexuais, em que ocorre recombinação do material genético, existem diferentes sistemas de cruzamento. Eles podem ser classificadas em autogamia, em que ocorre autofecundação; alogamia, em que ocorre fecundação cruzada; ou sistema misto, que acomoda tanto fecundação cruzada, quanto autofecundação (Fryxell, 1957).

O sistema reprodutivo e de cruzamento influenciam fortemente a estrutura genética das populações de plantas, visto que o tipo de mecanismo adotado determina as regras de encontro dos alelos, que formarão as próximas gerações (Wright, 1920, 1950). Em plantas autógamias a maioria dos locos se encontram em homozigose e quase toda a diversidade genética está entre os indivíduos, de modo que as populações são misturas de linhagens puras. Em plantas alógamas há diversidade tanto entre indivíduos, quanto dentro. O componente dentro de indivíduos é representado pela diferenciação entre alelos dentro do mesmo loco, visto que a heterozigosidade é comum quando há fecundação cruzada (Loveless & Hamrick, 1984; Falconer, 1987; Cruz et al., 2011).

A fecundação cruzada pode representar uma vantagem evolutiva, no que tange a produção de uma prole com composição genética heterogênea e, portanto, com maior flexibilidade para lidar com as mudanças ambientais, quando comparada com a prole de uma planta autógama (Karasawa et al., 2009). A alogamia, no entanto, pode ser desvantajosa em ambientes que sofreram perturbações severas e que estão em estágio de recolonização. Por isso, muitas plantas invasoras são autógamias, pela independência da

existência de indivíduos de sexos opostos, ou mesmo a presença de polinizadores (Harlan, 1975). A autopolinização, por sua vez, é vantajosa com relação à eliminação da carga genética, ao expor os alelos deletérios recessivos e sujeitá-los a ação da seleção natural. Estima-se que 20% das angiospermas desenvolveram uma estratégia de cruzamento baseada em autogamia (Barrett, 2002).

As estratégias de cruzamento das plantas foram evidenciadas, inicialmente, por observação do comportamento de forrageamento do polinizador. São observadas também a morfologia e anatomia das flores. Por fim é realizada ainda a avaliação das progênies, para inferir o parentesco, por meio de descritores morfológicos e estimar as taxas de fecundação cruzada em populações experimentais (Ellstrand, 1992). As metodologias mais recentes de avaliação do sistema reprodutivo incluem a utilização de marcadores genéticos, que apresentam segregação mendeliana e são adequados para evidenciar a estrutura familiar. Nesse sentido, vários trabalhos têm sido publicados, empregando essa metodologia (Collevatti et al., 2001; Diniz Filho & Telles, 2001; Zucchi et al., 2003).

A utilização dos marcadores genéticos para estimar taxas de fecundação cruzada se deu a partir do desenvolvimento de um modelo para produzir essas estimativas. Com esse objetivo, Ritland & Jain (1981) desenvolveram um algoritmo para obter, simultaneamente, as estimativas da taxa de fecundação cruzada e das frequências no *pool* de pólen, a partir de vários locos. Esse modelo genético permitiu não apenas determinar qual a proporção de progênies é resultante de autofecundação e fecundação cruzada, mas também a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados.

Estimar as taxas de fecundação cruzada e conhecer as estratégias reprodutivas das plantas é importante para compreender os padrões observados na estruturação genética das populações naturais (Loveless & Hamrick, 1984). Essas informações, por sua vez, são importantes nas estratégias de manejo e conservação de espécies nativas (Ellstrand, 1992). As informações relacionadas ao sistema reprodutivo também são importantes para os programas de domesticação de espécies selvagens, visto que esse conhecimento é primordial nas escolhas dos métodos de melhoramento que serão empregados (Harlan, 1975; Borém & Miranda, 2009; Cruz et al., 2011).

O fluxo gênico, por sua vez, é o fator microevolutivo responsável pela coesão

genética das populações naturais. A própria definição de população tem incluída a probabilidade de cruzamento entre os indivíduos, que convivem em uma região que seja restrita o suficiente para permitir esse encontro. Nesse sentido, o fluxo gênico age na direção contrária à mutação, deriva genética e seleção natural divergente, com relação à estruturação genética. A movimentação de alelos é capaz de homogeneizar as frequências alélicas, o que reduz a diferenciação genética entre as populações naturais (Wright, 1950; Hamrick et al., 1993).

A definição básica de fluxo gênico corresponde aos movimentos interpopulacionais e intrapopulacionais de gametas, indivíduos ou grupos de indivíduos (Slatkin, 1987). No entanto, as espécies vegetais são sésseis, dessa forma o fluxo gênico pode ocorrer a partir da movimentação dos gametas masculinos, por meio de agentes polinizadores, conhecido por fluxo gênico via pólen. Nesse estágio é o alelo quem é disperso, em genoma haploide do grão de pólen. O fluxo gênico pode ocorrer também após a fertilização, pela dispersão de sementes. Nesse caso é o genótipo, ou o próprio indivíduo quem é conduzido e a dependência se dá por agentes que fazem o transporte das sementes, ou agentes dispersores. O fluxo gênico mediado por pólen é independente da dispersão de sementes. Normalmente a movimentação de genes se dá mais intensamente pelo pólen, que pela semente. Nesse sentido, a estrutura genética espacial em plantas costuma ser reforçada pela baixa dispersão das sementes, quando comparado ao fluxo gênico realizado pelo pólen (Schnabel, 1998; Miyazaki & Isagi, 2000).

Vários autores propuseram modelos teóricos de fluxo gênico, para estudar a estrutura da população, considerando um cenário hipotético. O modelo mais simples é o de fluxo gênico simétrico, em que a taxa de migração entre as subpopulações seja igual e constante ao longo das gerações. Wright (1931) propôs o modelo de ilhas, no qual a população encontra-se subdividida em unidades menores, ou subpopulações e o fluxo gênico ocorre entre as subunidades de forma aleatória e com contribuição equivalente de cada subpopulação. Wright, (1940) propôs o modelo continente-ilha. Nesse cenário há um movimento unidirecional de uma subpopulação grande, representada pelo continente, para uma menor e isolada, representada pela ilha. Wright (1942) propôs ainda o modelo de isolamento por distância. Ele prevê que as populações mais próximas espacialmente são

mais semelhantes geneticamente, em função de uma maior taxa de migração entre elas. A taxa de migração decai com a distância geográfica, o que aumenta a diferenciação genética entre as populações, conforme a distância aumenta. Kimura & Weiss (1964) propuseram um modelo conhecido por “*stepping stone*”. Nesse modelo o fluxo gênico ocorre apenas entre subpopulações vizinhas.

O fluxo gênico é um componente importante na manutenção da viabilidade das populações naturais. Populações isoladas apresentam redução da diversidade genética em função da subdivisão e da atuação da deriva genética, o que pode levar a fixação de alelos e consequente perda de outros. Subpopulações isoladas também apresentam aumento da endogamia. Esses fatores podem conduzir essas subpopulações à extinção. Por isso é importante conhecer as distâncias do fluxo gênico, para conectar unidades populacionais isoladas e manter os níveis de diversidade genética (Ellstrand, 1992).

As taxas de fluxo gênico podem ser estimadas a partir de uma perspectiva historicamente acumulada, ou do fluxo gênico contemporâneo. Em um contexto histórico as estimativas podem ser obtidas em função do  $F_{ST}$ . Essa abordagem inclui tanto o fluxo gênico mediado por pólen, quanto por semente. Essa estimativa aparente de fluxo gênico pressupõe o modelo de ilhas e equilíbrio migração-deriva (Slatkin, 1987).

O fluxo gênico pode ser mensurado também a partir de uma perspectiva contemporânea. Nesse contexto é possível separar o fluxo gênico devido à semente, da dispersão de pólen. A distância de dispersão de pólen tem sido estimada a partir de análise de atribuição de paternidade. Essa metodologia consiste em utilizar marcadores genéticos para evidenciar o genótipo materno, das progênes e dos possíveis doadores de pólen. Assim, ao obter as distâncias geográficas entre os doadores de pólen e a planta matriz, a distância de dispersão é evidenciada. As estimativas de fluxo gênico contemporâneo são obtidas a partir de métodos de análise e atribuição de paternidade por máxima verossimilhança. Essa metodologia define o indivíduo mais verossímil de ser o doador de pólen, com base nas frequências alélicas da população (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007).

Os estudos de dispersão de pólen em populações de clima tropical são relativamente escassos. Em um levantamento realizado por Ashley (2010) foi observado

que a maior parte dos estudos com dispersão de pólen foi conduzido em países de clima temperado. De 43 artigos publicados entre 1996 e 2009, 60,4% foram realizados com espécies de clima temperado e 25% com espécies de clima tropical. Mesmo com a maior biodiversidade nos trópicos, os estudos ainda são incipientes.

Dentre os estudos realizados em espécies de clima tropical, Bittencourt & Sebbenn (2007) avaliaram a distância de dispersão de pólen em *Araucaria angustifolia*. Os autores empregaram o método de atribuição de paternidade a partir de oito locos microsatélites. Foram observadas distâncias médias de dispersão de pólen superiores a 2 km, entre fragmentos florestais e 83 metros, dentro dos fragmentos. Essas distâncias são relativamente grandes e, através dos estudos já realizados, é possível afirmar que as distâncias de dispersão de pólen não costumam ser muito longas. No levantamento realizado por Ashley (2010) foi evidenciado que a maior parte das espécies (55%) apresentaram distâncias de dispersão de até 200 metros. Essas distâncias variam muito em função do ambiente, da biologia da espécie e do comportamento do polinizador. Mais estudos com plantas nativas são necessários, especialmente com as endêmicas do Cerrado.

## 2.2 ESTRUTURA GENÉTICA E PADRÃO ESPACIAL DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATURAIS

As populações naturais, normalmente, estão subdivididas em um conjunto de populações menores ou subpopulações. A consequência dessa subdivisão hierárquica é que os cruzamentos costumam não ser ao acaso na população total, pois ocorrem com maior frequência entre indivíduos dentro das subpopulações e com menor frequência entre indivíduos de subpopulações diferentes. Isso gera uma estrutura na população total, que é determinada pelo modo como as frequências alélicas estão organizadas. Essa estrutura dos cruzamentos gera uma diferenciação entre as subpopulações (Hartl & Clark, 2010).

A estrutura genética corresponde à forma como a variabilidade genética se distribui dentro das subpopulações e entre elas. Essa distribuição é governada tanto por variáveis ecológicas, que afetam o padrão de colonização e mortalidade dos indivíduos,

quanto por forças evolutivas sistemáticas e dispersivas. A forma como os genótipos se distribuem é influenciada pela resposta das populações locais às pressões de seleção, promovidas pelo ambiente, resultando no aumento da frequência de alelos favoráveis ao ambiente, em detrimento da eliminação ou redução de outros (Hamrick, 1989). A diferenciação das frequências alélicas entre as subpopulações também ocorre por deriva genética, especialmente nas populações pequenas. A amostragem aleatória de alelos ao longo das gerações, que ocorre de forma independente em cada subpopulação, acentua a diferenciação entre elas. O fluxo gênico, por sua vez, tem efeito oposto à deriva genética e a seleção natural divergente. Ele reduz essa diferenciação ao homogeneizar as frequências alélicas (Hartl & Clark, 2010). A estrutura genética também é afetada pelo sistema de cruzamento, que determina o padrão de encontro dos gametas e influencia fortemente as frequências genotípicas nas gerações subsequentes (Hamrick, 1989).

Por ser o resultado de processos evolutivos históricos, os estudos que evidenciam a estrutura genética das populações naturais podem revelar os fenômenos genéticos envolvidos na mudança da composição genética dessas populações. Essas informações são importantes nos esforços correntes de amostragem de indivíduos, com a finalidade de preservar a máxima variabilidade genética possível e subsidiar programas de conservação para diversas espécies (Loveless & Hamrick, 1984; Frankham et al., 2008). Os estudos sobre a estrutura genética das populações permitem, ainda, determinar o modo de reprodução e estrutura familiar (Cruz et al., 2011) e estimar taxas de fluxo gênico histórico (Slatkin, 1987). Essas informações também são importantes para auxiliar nos programas de domesticação de espécies selvagens, ao apontar áreas promissoras para a coleta de germoplasma (Cruz et al., 2011).

O método para avaliar a estrutura genética das populações foi desenvolvido por Wright (1950, 1965), com base em índices de correlação. O autor criou, a partir do coeficiente de endogamia  $F$ , definido como a correlação entre as frequências dos alelos, que se unem na formação do zigoto, três índices para medir a correlação entre frequências alélicas em diferentes níveis hierárquicos populacionais:  $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ . Os subscritos indicam o nível onde os índices medem a correlação; “IT” indica indivíduos em relação à população total, “IS” indivíduos em relação à subpopulação e “ST” as subpopulações em

relação à população total. A medida de estrutura genética desenvolvida por Wright (1950) foi desenvolvida para locos bialélicos.

Posteriormente, Nei (1973) expandiu suas conclusões para locos multialélicos. Este autor mediu a diferenciação entre as populações com base na redução da heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg. O autor repartiu a heterozigosidade esperada da população total em componentes entre e dentro das populações. A relação entre os níveis de heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg entre as subpopulações, pela heterozigosidade esperada total é o índice  $G_{ST}$ . Esse índice é análogo ao  $F_{ST}$  e quantifica a diferenciação das subpopulações.

O método mais comum, para avaliar a estruturação da variabilidade genética usado hoje é pela análise de variância das frequências alélicas, desenvolvido por Cockerham e difundido por Weir & Cockerham (1984). A análise de variância, tradicionalmente usada para caracteres quantitativos foi empregada em um modelo aleatório hierárquico, que consiste na frequência de uma variável  $Y_{ijkl}$ , que representa o alelo  $l$ , no indivíduo  $k$ , da família  $j$  da população  $i$  que assume valor 1, se um determinado alelo estiver presente e 0 quando ele for ausente. Assim, a decomposição da variância total em componentes de variância associados às fontes de variação das subdivisões hierárquicas dos demes, ou subpopulações, permite gerar efeitos para grupos, indivíduos dentro de grupos e genes dentro de indivíduos. Os componentes de variância, que são obtidos pelos quadrados médios do quadro da análise de variância são usados para obtenção de três índices:  $F$ ,  $f$  e  $\theta$ , que são análogos ao  $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$  respectivamente.

Com o advento dos marcadores moleculares, outros métodos foram desenvolvidos, de acordo com as particularidades dos dados usados para avaliar a estrutura genética populacional. Excoffier et al. (1992) introduziu a Análise de Variância Molecular, inicialmente para dados haplotípicos. Nesse método são usadas as distâncias entre todos os pares de haplótipos para a estimação dos quadrados médios, em um modelo hierárquico da análise de variância, desenvolvendo o índice  $\Phi_{ST}$ , análogo ao  $F_{ST}$ . Posteriormente, Slatkin (1995) derivou o índice  $R_{ST}$ , especificamente para marcadores moleculares microssatélites, envolvidos em um modelo mutacional chamado *stepwise*. A métrica leva em consideração o tamanho do alelo, mais que a identidade por estado, reduzindo o viés nas estimativas de

diferenciação genética entre as populações ocasionalmente geradas pelo uso do  $\theta$  e do  $F_{ST}$ , quando usado esse tipo de dado.

Os métodos descritos até então avaliam a distribuição da variabilidade genética sem levar em consideração explicitamente o espaço geográfico. No entanto, a distância física entre as subpopulações e entre os indivíduos dentro das subpopulações podem afetar a maneira como as frequências alélicas se diferenciam ao longo do tempo, pois os processos evolutivos podem ter dependência espacial (Epperson, 2003). Subpopulações mais próximas, espacialmente, podem ter taxas de fluxo gênico maiores, que subpopulações mais distantes. Além disso, subpopulações geograficamente isoladas, podem sofrer mais o impacto de mutações deletérias, por meio da endogamia. Subpopulações mais próximas também podem estar submetidas a ambientes mais semelhantes. Assim, a seleção natural convergente pode aumentar as frequências dos mesmos alelos, levando a uma redução na diferenciação entre as subpopulações. Muitas teorias e modelos ecológicos assumem que os elementos de um ecossistema que estão próximos um do outro no espaço, ou no tempo são mais susceptíveis de serem influenciados pelo mesmo processo gerador (Legendre & Fortin, 1989).

Os estudos de estrutura genética em escala espacial são capazes de ajudar a revelar a dinâmica microevolutiva das populações naturais (Smouse & Peakall, 1999). A teoria básica de genética de populações prediz que as subpopulações naturais de plantas exibirão uma forte estruturação da variabilidade genética, quando o fluxo gênico for restrito. Ainda que essas populações apresentem distribuição contínua, as limitações na dispersão dos alelos, impostas pelo fluxo gênico restrito, geram uma estrutura genética espacial, de modo que essas subpopulações passam a se comportar segundo o previsto por um modelo de isolamento genético pela distância. O modelo prevê que o aumento na distância geográfica entre as subpopulações é acompanhado pelo aumento da distância genética das unidades amostrais, em função da deriva genética e/ou seleção natural (Wright, 1942).

A estrutura espacial da variabilidade genética, em um modelo de isolamento por distância pode ser testada a partir da análise de autocorrelação espacial. O isolamento por distância resulta em autocorrelação positiva (Sokal & Wartenberg, 1983). Uma estrutura

espacial, por sua vez, pode ser descrita a partir de uma função de estrutura, que permite quantificar o grau de dependência espacial existente e particioná-lo em classes de distâncias. Para estudos em genética de populações, a função de estrutura mais comumente empregada é o correlograma. Esse, por sua vez, corresponde a um gráfico em que os valores de autocorrelação são plotados na ordenada, contra classes de distância entre estações de amostragem (localidades) na abscissa (Legendre, 1993). Quando são empregados dados quantitativos, como por exemplo, frequência alélica, ou dados morfométricos, o coeficiente  $I$  de Moran é mais frequentemente empregado para descrever a autocorrelação espacial (Diniz Filho & Telles, 2001).

Outro método comumente usado por geneticistas de populações para avaliar a relação entre divergência genética das populações e a distância geográfica é o teste de Mantel. O procedimento consiste em correlacionar duas matrizes, a de distância genética, obtida por diferentes métricas ( $\theta$ ,  $F_{ST}$ , distância de Nei, dentre outras) e a matriz de distância geográfica entre os demes, ou subpopulações, por meio do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), por exemplo. Assim como o  $I$  de Moran, o teste de Mantel pode ser realizado em diferentes classes de distância, gerando um Correlograma de Mantel (Diniz-Filho et al., 2013). Os resultados obtidos por ambos os métodos tendem a convergir, especialmente para amostras grandes (Epperson, 2003).

Alguns estudos genéticos foram realizados com indivíduos pertencentes à espécie *A. crassiflora* Mart. Telles et al. (2003) avaliaram seis populações naturais provenientes do Estado de Goiás. Foram utilizados cinco locos isoenzimáticos para estimar os parâmetros que caracterizam a variabilidade genética existente e o grau de estruturação das populações. Os autores encontraram elevados níveis de polimorfismo nos locos analisados; 80% deles e de diversidade genética, que variou entre 0,189 e 0,460, com média igual a 0,357. Foi observado ainda que as populações naturais estão estruturadas, com  $G_{ST} = 0,188$ . Esse resultado indica que dentro das populações os cruzamentos são ao acaso (panmixia), mas os indivíduos têm maior probabilidade de cruzar com outro indivíduo da mesma população, que de outra população. Os autores observaram ainda, por meio do teste de Mantel, que existe uma correlação positiva entre as distâncias geográficas e genéticas ( $r = 0,4206$ ;  $p = 0,070$ ).

A distribuição da variabilidade genética em populações de *A. crassiflora* Mart. também foi caracterizada por Blanco et al. (2007). Os autores utilizaram onze populações do Estado de Goiás. A diversidade genética foi avaliada por meio da sequência não codificante *trnL* do DNA de cloroplastos (cpDNA). As sequências foram caracterizadas a partir do número de haplótipos, diversidade de haplótipos e diversidade de nucleotídeos por sítio, dentro e entre populações. A estrutura genética foi dimensionada por meio do índice  $G_{ST}$  de Nei (1973), que mede a proporção da variação genética total que está entre as populações. Os autores observaram que dos 519 pares de bases avaliados no cpDNA, 147 sítios foram polimórficos (28,3%) e 372 sítios conservados (71,7%). Os autores detectaram níveis elevados de diversidade de haplótipos ( $H_d = 0,875$ ) e de diversidade nucleotídica ( $p = 0,0335$ ). Esses resultados sugerem a existência de um elevado nível de diversidade genética nas populações amostradas. O nível de estruturação genética encontrado nesse trabalho pode ser considerado baixo. Cerca de 7% da diversidade genética está no componente interpopulacional. Os autores sugerem que as populações estão em processo de diferenciação, possivelmente como resultado da fragmentação pelo qual o Cerrado vem sofrendo. Esse processo de fragmentação iniciou recentemente, nos últimos sessenta anos. Assim, aparentemente não houve ainda tempo suficiente para que as populações exibam diferenças genéticas significativas.

Cota et al., 2011, por sua vez, avaliaram quatro subpopulações naturais de *A. crassiflora* usando marcadores RAPD, que não são espécie-específicos. Os autores verificaram que a diversidade genética média foi de 0,31, valores comumente encontrados com esse tipo de marcador. A estrutura genética foi elevada, com 22,62% da diversidade genética localizada entre as subpopulações.

O estudo genético das populações naturais de araticunzeiro avançou com o desenvolvimento dos iniciadores de regiões microssatélites por Pereira et al. (2008), para serem empregados como marcadores moleculares. Os autores empregaram a metodologia de biblioteca enriquecida de DNA. Foram obtidos 44 pares de iniciadores microssatélites, dos quais, 10 foram selecionados em função da consistência da amplificação e do nível de polimorfismo apresentado. Os iniciadores desenvolvidos evidenciaram, em média, 19 alelos por loco e diversidade genética média de 0,906. O conjunto de iniciadores é altamente

informativo e constitui uma ferramenta poderosa para a caracterização genética de populações de *A. crassiflora* Mart.

Os iniciadores microssatélites desenvolvidos foram utilizados por Pereira (2007) para avaliar geneticamente 13 populações naturais de *A. crassiflora* Mart. coletadas no estado de Goiás. O autor observou elevado nível de diversidade alélica por população, com média de 17 alelos por loco. Os valores para as heterozigosidades médias esperadas (0,866) e observadas (0,728) foram elevados, indicando alto nível de diversidade genética nas populações. A estrutura genética observada indica que parte significativa dessa variação está distribuída entre as populações (9,1%). A análise de divergência genética demonstrou a formação de quatro grupos distintos de populações, evidenciando forte estruturação da variabilidade genética das populações no espaço. Segundo o autor, os resultados sugerem que a ocupação da região do Cerrado do estado de Goiás por parte da espécie se deu por deslocamento no sentido sudoeste-nordeste, tendo ocorrido a formação de dois gradientes de variação genética, dispostos em paralelo, mantidos em isolamento por uma barreira geográfica, denominada Vão do Paranã. A análise de estruturação intrapopulacional foi não significativa, denotando ausência de efeitos espaciais dentro das populações, provavelmente decorrente do fluxo de pólen e da dispersão de sementes a longas distâncias (Pereira, 2007).

Collevatti et al. (2014) compararam a diversidade e a estrutura genética espacial em duas populações de *Annona crassiflora* Mart., uma em área de conservação e outra em área antropizada. Foram empregados dez locos microssatélites. Os níveis de diversidade genética encontrados foram altos para os dois ambientes, mas foi maior na população conservada. Os autores observaram que a fragmentação pode influenciar negativamente a dinâmica evolutiva da espécie. Na população antropizada foi detectada um coeficiente de endogamia com valor significativo enquanto que na população conservada essa estimativa não foi significativa. Os autores verificaram forte estruturação das populações. A população conservada apresentou estrutura genética espacial de baixa magnitude. A população antropizada, por outro lado, mostrou ajuste ao modelo de isolamento por distância. O trabalho mostra o impacto da antropização sobre a dinâmica evolutiva da espécie *A. crassiflora* Mart.

## 2.3 O CLIMA E A PAISAGEM NA DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA NAS POPULAÇÕES NATUAIS

É bem conhecido o fato de que as características físicas e climáticas do ambiente podem afetar profundamente o padrão de distribuição das espécies no globo (Soberón & Peterson, 2005). O conjunto das características abióticas, como temperatura, umidade e precipitação, por exemplo, somado com as condições bióticas, como a presença de alimentos e predadores definem o nicho ecológico da espécie. Diversos conceitos de nicho surgiram na história da tradição de pesquisa da Ecologia. A concepção do nicho Grinnelliano indica que cada espécie tem um conjunto de exigências ambientais necessárias à sua sobrevivência, em um determinado local, sem levar em consideração as interações com outras espécies. O nicho Eltoniano, por outro lado é uma definição mais funcional, que leva em consideração a interação da espécie com outras espécies e sua função em teias alimentares. O nicho Hutchinsoniano, por sua vez, é definido como um envelope multidimensional de condições em que uma espécie pode tolerar, fisiologicamente e existir (nicho fundamental) e os locais onde ela não é excluída por outros competidores e efetivamente ocupa (nicho realizado) (Pocheville, 2015).

A distribuição geográfica das espécies tem sido tradicionalmente preditas com base nos modelos de nicho ecológico. Estes, por sua vez, empregam registros de ocorrência de uma determinada espécie, associados com dados ambientais e algoritmos matemáticos para modelar e mapear a distribuição potencial, indicando áreas adequadas para ocorrência dessa espécie (Jiménez-Valverde et al., 2008). Existem vários algoritmos que podem ser usados, para gerar mapas de distribuição potencial. Esses resultados podem ser projetados para outros períodos de tempo, para o passado, ou futuro, com o objetivo de compreender o impacto das mudanças climáticas na distribuição espacial da espécie, além de evidenciar áreas de estabilidade climática, que podem ser importantes refúgios históricos da biodiversidade. Mapas de estabilidade podem ser usados para evidenciar padrões de diversidade e auxiliar em planejamentos voltados para a conservação. (Werneck et al., 2012; Diniz-Filho et al., 2015).

Terribile et al. (2012) modelaram a distribuição potencial de 18 espécies nativas do Cerrado, incluindo *A. crassiflora*, no presente, representado pelo período pré-industrial e projetaram os modelos no passado, no último máximo glacial (~ 21 m.a) e no futuro (2080-2100). Os autores desenvolveram um método para identificar áreas climaticamente estáveis, no Cerrado, reduzindo as incertezas relacionadas aos diversos modelos climáticos. Os autores identificaram uma região climaticamente estável, para as 18 espécies em todos os tempos estudados (passado, presente e futuro) no centro-oeste e sudeste do bioma, indicando áreas de refúgio histórico da biodiversidade.

Recentemente, os mapas de adequabilidade ambiental estão sendo empregados como preditores das estimativas dos parâmetros genéticos. Os estudos procuram relacionar padrões de distribuição da variabilidade genética com locais climaticamente adequados, no passado, ou no presente, para a espécie em estudo (Knowles et al., 2007; Soares et al., 2014; Diniz-Filho et al., 2015). O uso de técnicas de modelagem de nicho e inferências sobre processos demográficos históricos pode auxiliar no delineamento de cenários com efeitos múltiplos, a partir de diferentes fatores que afetam os parâmetros genéticos, ao longo da distribuição espacial de uma dada espécie (Soares et al., 2014).

Collevatti et al. (2011) modelaram a distribuição potencial da espécie *Caryocar brasiliensis*, conhecida popularmente por pequizeiro, uma árvore nativa do Cerrado. Os autores utilizaram 135 registros de ocorrência da espécie, seis variáveis climáticas, três modelos climáticos acoplados oceano-atmosfera e o modelo de nicho ecológico MAXENT (máxima entropia). O modelo foi projetado para o futuro (50 anos). Os parâmetros genéticos foram estimados com base em dez locos microssatélites, avaliados em 466 plantas, provenientes de 15 subpopulações naturais da espécie. Os autores constataram que áreas climaticamente adequadas para *C. brasiliensis* estão restritas ao sudeste do Cerrado. Esta região é a mais degradada do bioma. Os autores alertam para o risco das subpopulações localizadas na porção central da distribuição geográfica, que perdeu adequabilidade, o que pode levar a perda de diversidade genética.

Soares et al. (2014) utilizaram a adequabilidade resultante de 14 modelos de nicho ecológico e cinco modelos climáticos como preditores para o número de alelos por loco e coeficiente de endogamia (variável resposta) em 23 subpopulações naturais de

*Dipteryx alata*, uma árvore nativa do Cerrado conhecida popularmente por baru. Os dados genotípicos foram obtidos por oito locos microsatélites. Os autores constaram que há relação significativa entre a adequabilidade e as estimativas dos parâmetros genéticos. Os locais mais adequados para *D. alata*, segundo a distribuição potencial, apresentam maior variabilidade genética e menor endogamia.

O padrão de distribuição da variabilidade genética nas populações naturais também pode ser amplamente afetado por variáveis ambientais, relacionadas com as características atuais da paisagem. A linha de pesquisa que procura unir teorias e ferramental da genética de populações e ecologia de paisagens tem sido chamada de genética na escala da paisagem (*landscape genetics*). A disciplina procura relacionar as características da paisagem com processos microevolutivos, como o fluxo gênico, deriva genética e seleção natural. Adicionalmente ajuda a identificar quebras de fluxo gênico entre subpopulações, sem uma causa óbvia, ou ainda a elucidar eventos de contato secundário entre subpopulações previamente isoladas (Manel et al., 2003).

Os estudos de genética na escala da paisagem podem revelar barreiras ao fluxo gênico causadas por elementos não naturais na composição atual do ambiente, como por exemplo a agricultura, ou outros tipos de uso do solo. Ou ainda elementos naturais, como um campo aberto pode afetar o fluxo gênico de uma espécie florestal. Essas questões são de grande interesse na biologia da conservação. A abordagem tradicional para verificar barreiras ao fluxo gênico, em função das características da paisagem consiste em correlacionar a distância genética, por exemplo o  $F_{ST}$  par a par com uma matriz de distância, ou resistência ambiental, por meio do teste de Mantel. Essa matriz é variável e pode conter o comprimento, área ou percentagem de cobertura de elementos da paisagem, como valas, rios e vegetação natural nos corredores de uma determinada largura entre pares de subpopulações. É importante usar a distância geográfica também, em uma análise de correlação parcial (Mantel parcial) entre a matriz de resistência, distância genética e geográfica, para separar os efeitos da composição da paisagem e do espaço geográfico na diferenciação genética das subpopulações (Holderegger et al., 2010).

Diniz-Filho et al. (2009) estudaram o efeito da fragmentação do Cerrado na diversidade genética de *Caryocar brasiliense*, o pequi. Os autores utilizaram a

porcentagem de vegetação ao redor das subpopulações naturais, como meio de acessar o impacto antrópico na paisagem local. De acordo com os autores, os níveis de endogamia encontrados no estudo podem ser explicados por processos de isolamento e fragmentação do habitat, relacionados à intensa ocupação humana recente na fronteira sul do bioma.

## 2.4 MARCADORES MICROSSATÉLITES E A CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES

Os microsatélites consistem em regiões compostas por pequenas sequências, de um a quatro nucleotídeos, repetidos em *tandem*. Alguns experimentos mostraram que o genoma dos eucariotos apresenta grandes quantidades dessas regiões altamente repetitivas (Litt & Luty, 1989). Esses sítios polimórficos podem ser amplificados via reação em cadeia da polimerase e constituir uma classe de marcadores moleculares altamente informativa (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As regiões microsatélites são muito variáveis, em função das altas taxas de mutação, cerca de  $7 \times 10^{-3}$  por loco por geração (Brinkmann et al., 1998). O processo gerador da maior parte das mutações nessas sequências é a derrapagem (slippage) da DNA polimerase. Isso ocorre durante o processo de dissociação e reassociação da DNA polimerase em uma fita de DNA crescente. Nesse momento pode ser gerada uma volta (*loop*) na fita crescente. Quando isso ocorre, a enzima reassocia em uma posição na fita molde em que ela já havia adicionado o motivo de repetição e adiciona um ou mais motivos novamente, dependendo do tamanho da volta e da quantidade de motivos de repetição que ficou escondida na fita que está em síntese. Assim, a fita recém-sintetizada ganha um motivo a mais que a fita molde. Quando a volta acontece na fita molde, a fita que está em síntese perde um ou mais motivos de repetição. Esse modelo de mutação é conhecido por *Stepwise Mutation Model* (SMM) (Ellegren, 2004).

A consequência do SMM é que dois alelos que diferem por uma repetição estão mais estreitamente relacionados (têm um antepassado comum mais recente) do que os alelos que diferem em muitas repetições, pois a adição ou perda de um motivo de repetição é mais provável que o de muitos motivos, simultaneamente. Essa característica afeta as

análises de estruturação genética, que emprega o *infinite alleles model* (IAM). Segundo esse modelo, toda mutação gera um alelo novo, que não existia anteriormente. Sob o SMM isso pode não ser verdade, pois um alelo pode ganhar ou perder motivos de repetição e originar outro alelo igual a um que já existia na população anteriormente. Isso cria alelos idênticos por estado, que não podem ser diferenciados dos que são idênticos por descendência, o que afeta também as análises de parentesco (Slatkin, 1995).

Os microssatélites são muito variáveis, mas as sequências de DNA que flanqueiam essas regiões são, geralmente, conservadas dentro de uma mesma espécie. Isso permite o desenvolvimento de iniciadores para amplificação específica desses locos. As amplificações normalmente evidenciam extensivo polimorfismo, que é representado pela ocorrência de diferentes números de motivos de repetição na estrutura do microssatélite, entre indivíduos diferentes (Morgante & Olivieri, 1993).

A vantagem da utilização dos marcadores microssatélites, no que se refere ao conteúdo informativo, está associada à sua expressão codominante e multialelismo. Além disso, os microssatélites estão amplamente distribuídos no genoma. Além da capacidade de gerar altos níveis de polimorfismo, os esses marcadores apresentam alta reprodutibilidade, são relativamente simples de manusear e requerem pequenas quantidades de DNA. A principal desvantagem é o custo do desenvolvimento dos iniciadores, que são espécie-específicos. Uma alternativa para driblar o alto custo de desenvolvimento dos iniciadores é realizar a transferibilidade entre espécies evolutivamente relacionadas, dentro do mesmo gênero e até mesmo dentro da mesma família (Peakall et al., 1998; Zucchi et al., 2002; Kuleung et al., 2004).

Os parâmetros mais comuns usados para descrever a diversidade genética com dados provenientes de marcadores moleculares são: a proporção de locos polimórficos ( $P$ ) que representa a relação entre o número de locos polimórficos pelo total de locos amostrados, a riqueza alélica ( $Ar$ ) que é número de alelos amostrados, em função dos tamanhos das amostras, heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou diversidade genética de Nei e a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) (Nei, 1973; Robinson, 2006; Frankham et al., 2008).

A riqueza alélica, por sua vez é definida como o polimorfismo, ou número

médio de alelos por loco. Essa medida, no entanto é muito influenciada pelos diferentes tamanhos das amostras retiradas das populações. Populações que passaram por *bottlenecks* e estão representadas por tamanhos pequenos apresentarão estimativas viesadas da riqueza alélica. A relação entre a riqueza alélica e o tamanho da amostra é assintótica. Conforme o tamanho da amostra cresce, o viés presente nessas estimativas tende a zero. O nível de polimorfismo dos locos utilizados também afeta a estimativa da riqueza alélica. Nesse caso, o viés é menor, para os mesmos tamanhos amostrais, quando os locos utilizados são mais polimórficos. Com o objetivo de tornar as estimativas de riqueza alélica comparáveis entre as populações, é importante a redução no tamanho de todas as amostras para o tamanho da menor amostra. Assim, todas as populações sofrerão a mesma magnitude de viés nas estimativas de riqueza alélica e os valores poderão ser comparáveis entre as populações (Leberg, 2002).

A heterozigidade observada é uma medida que consiste na soma da proporção dos locos heterozigotos pelo total de locos amostrados (Frankham et al., 2008). A frequência de locos em heterozigose caracteriza a diversidade genética, pois cada heterozigoto apresenta diferentes alelos e todos eles juntos representam a variação total existente. A diversidade genética pode ser obtida a partir da soma de quadrados das frequências alélicas. Essa métrica é independente das frequências genotípicas e é igualmente adequada para populações alógamas e autógamias (Weir, 1990). Ela foi definida por Nei (1973) como sendo:  $H = 1 - \sum (p_i)^2$  em que  $p_i$  é a frequência do alelo  $i$  na população.

Algumas espécies nativas do Cerrado foram avaliadas geneticamente com marcadores microssatélites. Moura et al. (2009) avaliaram duas populações de *Solanum lycocarpum*, conhecida popularmente por lobeira. Os autores empregaram três pares de iniciadores microssatélites. Foram observados entre 5,29 a 7,12 alelos por loco e diversidade genética de 0,368. Níveis elevados de diversidade também foram encontrados em populações de *Caryocar brasiliensis* Camb. (pequizeiro) por Collevatti et al. (2001), a partir de dez pares de iniciadores microssatélites. Os autores evidenciaram de 20 a 27 alelos por loco e diversidade genética que variou entre 0,129 a 0,924. Outros estudos conduzidos em plantas nativas (Diniz Filho & Telles, 2001; Zucchi et al., 2003; Soares et al., 2008)

evidenciam que as populações de plantas nativas do Cerrado exibem diversidade genética elevada.

## 2.5 A FAMÍLIA ANNONACEAE E A ESPÉCIE ALVO *Annona crassiflora* Mart.

A família Annonaceae apresenta aproximadamente 130 gêneros e 2200 espécies. Desses, cerca de 30 gêneros e 250 espécies ocorrem em praticamente todas as formações naturais do Brasil. No país, destacam-se a *Xylopia aromatica*, conhecida popularmente por pimenta-de-macaco e a *Annona crassiflora* Mart., chamada de araticum ou marolo, ambas nativas do Brasil. As espécies *A. squamosa* e *A. muricata* (fruta-do-conde e graviola) são muito conhecidas no país por causa do seu cultivo, especialmente na região nordeste. Essas espécies, no entanto, são originárias da América Central (Souza & Lorenzi, 2008).

Os representantes da família Annonaceae ocorrem quase que inteiramente em regiões tropicais, exceto pelos gêneros *Asimina* e *Deeringothamnus*, que são norteamericanos e o gênero *Xylopia*, que pode ser considerado pantropical. Algumas hipóteses têm sido levantadas para explicar a distribuição das espécies dessa família. Essas informações são interessantes, pois exercem um papel importante na compreensão da origem, evolução e dispersão das angiospermas como um todo. O centro de origem dessas angiospermas foi considerado, por muito tempo, a região entre Assam (Ásia) e Fiji (Oceania), devido à diversidade de famílias de angiospermas primitivas que ocorrem nesses locais. No entanto, com a teoria de tectônica de placas, foi observado que a região considerada o “berço” das famílias primitivas de angiospermas, eram na verdade, na época do surgimento dessas famílias no cretáceo inferior, duas regiões distintas. Nesse sentido, a diversidade nesse local passou a ser explicada pela justaposição de duas áreas que apresentavam a flora composta por muitas famílias primitivas de angiospermas e o local de origem pode ter sido em uma região intermediária (Doyle & Le Thomas, 1997).

As espécies pertencentes a essa família estão representadas por árvores, arbustos e lianas. É característica da família a presença de casca fibrosa, madeira com raios largos, formado por células esféricas esparsas. A madeira apresenta terpenóides aromáticos e frequentemente com esclereides com alcaloides do tipo benzil isoquinolínico e, às vezes, com a presença de taninos. As folhas são alternas, dísticas, simples, inteiras, frequentemente curto-pecioladas, com venação peninérvea, lâminas com glândulas pelúcidas e sem estípulas. A inflorescência é determinada, às vezes reduzida a uma única flor terminal ou axilar. As flores geralmente são bissexuais e radiais, com frequência elas abrem e aumentam gradualmente de tamanho antes da antese. Apresentam receptáculo curto, de plano a hemisférico. As sépalas são livres ou levemente conatas, valvadas ou imbricadas. Os estames são numerosos, peltados e congestos em uma estrutura discoide, livres, com uma nervura. Os filetes são curtos e grossos, pouco diferenciados das anteras. A morfologia dos grãos de pólen é variada, algumas vezes são monossulcados, outras inaperturados, às vezes em tétrades ou poliades. Os carpelos variam de um a três, em geral são livres e em arranjos espiralados. O ovário é súpero com placentação lateral. Os óvulos são apresentados em um ou vários por carpelo. Nas pétalas internas são encontrados, algumas vezes, os nectários. O fruto é agregado de bagas, às vezes secundariamente conatos durante o desenvolvimento. As sementes são frequentemente ariladas, com embrião diminuto e endosperma ruminado (Judd et al., 2009).

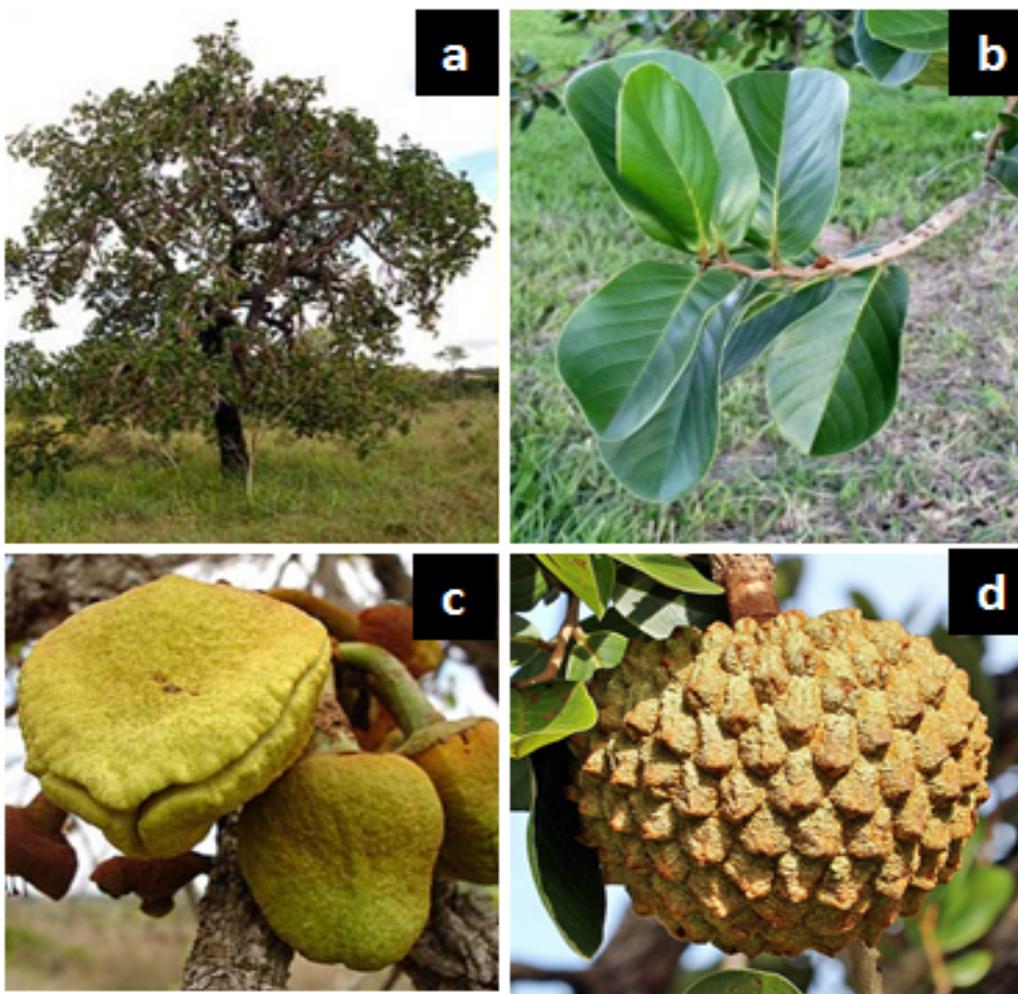
As espécies da família Annonaceae apresentam cantarofilia, ou seja, elas são polinizadas por coleópteros. Nessa família, as flores produzem um odor frutado, algumas vezes picante. Durante a antese as pétalas fecham sobre o centro da flor e formam uma câmara de polinização. As câmaras emitem odores que atraem os besouros. Nesse espaço os insetos ficam protegidos da luz do sol e de predadores, além de encontrarem alimento. Na câmara, as anteras liberam os grãos de pólen, que são viscosos e aderem ao corpo do inseto. Em seguida, as pétalas caem e os coleópteros procuram outras flores, realizando a polinização (Gottsberger, 1999).

Várias espécies da família Annonaceae apresentam importância frutífera em diversos países como Chile, México, Venezuela, Austrália e Brasil. No Brasil, estas culturas são encontradas desde o norte do País, até o Estado de São Paulo. Hoje nos estados da

Bahia, Pernambuco, Alagoas, Minas Gerais e São Paulo encontram-se plantios irrigados com bom nível tecnológico. No entanto, foi no semiárido brasileiro que o cultivo destas fruteiras se espalhou. Na região Nordeste, a Bahia é o principal produtor, seguido dos estados de Pernambuco e Alagoas (Braga Sobrinho, 2010).

A espécie *Annona crassiflora* Mart (Annonaceae) é conhecida popularmente por marolo, araticum-cortiça, araticum-de-boia, araticum-dos-grandes ou araticum-do-campo . O nome *Annona*, referente ao gênero é proveniente da palavra “annon”, que significa, no Haiti, colheita do ano. O epíteto específico *crassiflora* é uma referência às pétalas grossas encontradas na espécie. O nome popular, araticum vem do tupi e significa árvore de fibra rija e dura, ou fruto do céu, saboroso, ou ainda fruto mole (Silva Júnior, 2005).

A planta (Figura 1) apresenta porte arbóreo com altura de 4 m a 8 m, com tronco geralmente tortuoso de 20 cm a 30 cm de diâmetro, revestido por casca áspera e corticosa que resiste à ação do fogo. As folhas são crasso-membranosas, glaucas e ferrugíneo-hirsutas quando jovens. As flores são solitárias, axilares, com pétalas engrossadas e carnosas, O fruto é do tipo baga subglobosa, de superfície tomentosa e tuberculada ou papilosa, contendo polpa levemente adocicada e de cheiro agradável. Algumas vezes o fruto pode apresentar polpa avermelhada e mais doce (Souza & Lorenzi, 2008).



**Figura 1.** A espécie *Annona crassiflora* Mart. (araticum). a – a planta de porte arbóreo; b – as folhas crasso-membranosas; c – a flores axilares com pétalas carnosas; d – o fruto do tipo baga de formato subgloboso.

(fonte: Google Imagens®)

Com relação à morfoanatomia foliar, a espécie *A. crassiflora* Mart. apresenta folhas hipoestomáticas com estômatos paracíticos. Na face abaxial existem tricomas simples. Essas estruturas reduzem a evapotranspiração e atuam na defesa contra herbívoros. A nervura principal da folha, em secção transversal, apresenta feixe vascular único, circundado por uma bainha de fibras. Esta espécie é rica em tecido esclerenquimático, esclereídeos e células pétreas, distribuídas no tecido parenquimático. Em vista transversal a

epiderme é unisseriada, com células de maiores dimensões na face adaxial. O mesofilo é dorsiventral, composto por uma camada de parênquima paliçádico e, aproximadamente, quatro camadas de parênquima esponjoso, que é constituído por muitos espaços intercelulares em distribuição irregular (Corrêa et al., 2007).

Os frutos do araticum são sincárpicos com até 15 cm de diâmetro e 2 kg de peso. Apresentam conformação oval a arredondado, externamente é marrom-claro, comoso. Internamente a coloração é creme amarelada, com polpa firme e muitas sementes elípticas, marrons e escuras. No Cerrado do Estado de Goiás, os frutos do araticum apresentam, em média, peso de 960 g, 10,6 cm de diâmetro longitudinal (largura), 13,0 cm de diâmetro transversal (comprimento) e 876,4 cm<sup>3</sup> de volume. São de conformação achatada e com mais de 100 sementes por fruto. Os frutos, no entanto, apresentam peso, tamanho e volume muito desuniformes (Naves et al., 1995; Almeida et al., 1998).

O araticunzeiro é considerado uma espécie breve-decídua, pois perde as suas folhas de forma gradual ao longo da estação seca. A renovação completa da folhagem ocorre no início da estação chuvosa. No mês de setembro há um pico na queda das folhas e a renovação se dá duas semanas depois. Essa estratégia permite que as folhas novas possam aproveitar o período de chuvas e de disponibilidade de umidade para exibir um potencial fotossintético maior que se elas tivessem folhas mais velhas (Melo, 2009).

A floração do araticum foi observada nos Cerrados de Minas Gerais no final de setembro e início de outubro. A frutificação iniciou no final do mês de outubro, com pico de produção no final de fevereiro e início de março. O desenvolvimento total do fruto compreende 140 dias a partir da antese, quando ele alcança o seu tamanho máximo, cerca de 2 kg (Silva, 2009).

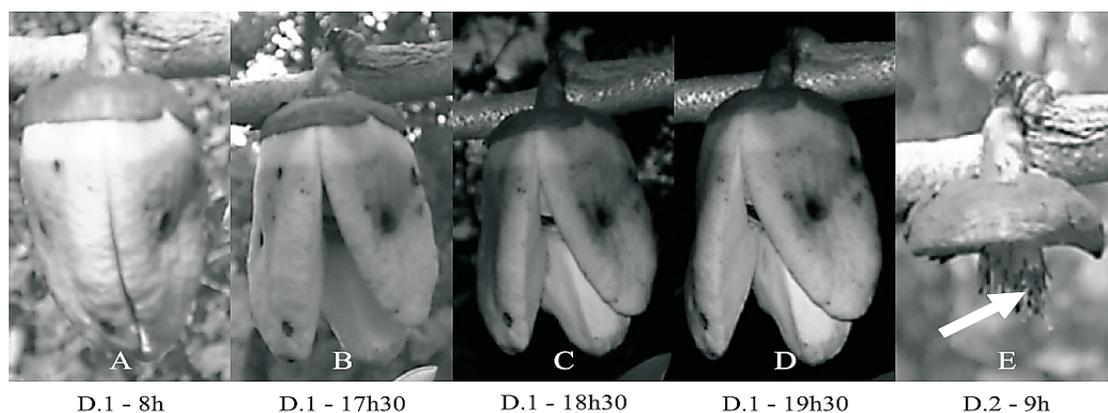
As populações naturais de *A. crassiflora* Mart. ocorrem nas fitofisiomias do bioma Cerrado que incluem o cerradão, cerrado denso, cerrado típico, cerrado ralo. A distribuição geográfica é ampla, sendo encontrado nos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Pará, Bahia, Piauí, Tocantins, Maranhão e, em remanescentes, no Paraná e em São Paulo (Figura 2). A espécie não ocorre nos cerrados de Rondônia, Amazonas, Amapá, Roraima e Ceará (Ratter et al., 2000).



**Figura 2.** Mapa do Brasil evidenciando a distribuição geográfica da espécie *A. crassiflora* Mart., as linhas em verde demarcam o bioma Cerrado.  
(fonte: Ratter et al., 2000)

A espécie *Annona crassiflora* Mart. não apresenta sistema de autoincompatibilidade. Os frutos gerados por autofecundação são, portanto, viáveis. No entanto, os frutos do araticunzeiro são formados, predominantemente, por meio da fecundação cruzada (alogamia predominante). Esse fato faz com que a espécie seja dependente de agentes polinizadores. O araticum apresenta cantarofilia, sendo polinizado por espécies de besouros do gênero *Cyclocephala* (Gottsberger, 1989a, 1989b; Cavalcante et al., 2009).

As flores do araticum são hermafroditas e apresentam protoginia. A antese é gradual e inicia nas primeiras horas do dia e pode se estender até o início da madrugada do dia seguinte (Figura 3). A receptividade aos polinizadores ocorre desde o início da antese. A formação do fruto é mais provável quando as flores são polinizadas nessa fase inicial. A fase masculina, que sucede a feminina é caracterizada pelo afrouxamento da massa de estames e a exposição do pólen. A porcentagem de viabilidade do pólen de araticum, pelo teste do carmin acético é de 93,83%, o que pode ser considerada alta (Cavalcante et al., 2009).



**Figura 3.** Antese da flor de *Annona crassiflora* (A, B, C e D) e aspecto da flor após a queda dos verticilos florais, com algumas anteras pendentes e ainda presas ao receptáculo floral (E). D.1 = primeiro dia, D.2 = segundo dia.  
(fonte: Cavalcante et al., 2009).

Cavalcante et al. (2009) observaram também a existência de plantas de araticunzeiro cujas flores, embora perfeitas, não expõem o pólen das anteras quando estão em fase masculina, o que caracteriza uma planta funcionalmente feminina. Os autores também observaram plantas cujas flores, embora perfeitas e em número abundante, não formavam frutos, mesmo através da polinização manual cruzada, o que sugere que as plantas sejam funcionalmente masculinas. Esse fenômeno chama a atenção, pois é um indício de que essa espécie tenha dioiccia. Porém há plantas hermafroditas, que apresentam flores produtoras de pólen e frutos.

As flores do araticunzeiro apresentam termogênese. Normalmente, a flor inicia o processo de aquecimento ao anoitecer. Sua temperatura interna pode ser até 10°C acima da temperatura ambiente. O estigma apresenta uma camada de exsudato transparente. Com o aumento da temperatura a flor exala um forte odor, que atrai os besouros. Os coleópteros entram nas flores e perfuram as pétalas internas e depois saem, ou iniciam uma cópula. Em seguida, os estames deiscentes caem no interior da câmara floral e, posteriormente as pétalas separam-se do receptáculo floral, caindo no chão. Alguns coleópteros permanecem no interior do anel das pétalas durante o dia, no chão, saindo somente no início da noite. Os insetos saem cobertos de pólen e realizam a polinização quando entram no interior de outra flor recém-aberta (Gottsberger, 1989b; Almeida et al., 1998).

A taxa de frutificação observada na espécie foi baixa e girou em torno de 4%. O que pode explicar esses dados, apesar da alta viabilidade do pólen, é a taxa de polinização natural, que pode variar muito em função das condições ambientais, como por exemplo, a ação dos ventos. Esse fator pode influir negativamente na frutificação. A baixa taxa de frutificação também pode ser explicada pela diocia, ou seja, a presença de planta com flores funcionalmente femininas e plantas funcionalmente masculinas (Cavalcante et al., 2009).

No Cerrado, a dispersão dos frutos de *A. crassiflora* Mart. é realizada prioritariamente pela anta (*Tapirus terrestris*). Outros animais podem, ocasionalmente, consumir os frutos do araticunzeiro, tais como o veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), lobinho (*Cerdocyon thous*) e tatu (*Dasypus* sp.) e algumas espécies de aves, mas elas não constituem dispersores efetivos. Além disso, as características dos locais de defecação do *T. terrestris* e a eliminação das sementes intactas do araticunzeiro podem favorecer a germinação da planta (Golin et al., 2011). As sementes de *A. crassiflora* também foram encontradas nas fezes do lobo guará *Chrysocyon b. b. b.* (Motta-Junior et al., 1996), o que indica a possibilidade desse animal constituir um dos dispersores do araticunzeiro.

As sementes do araticunzeiro apresentam problemas de germinação, em função do tegumento duro e dormência prolongada. A dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart ocorre em decorrência da imaturidade do embrião, o qual tem a necessidade de finalizar seu desenvolvimento durante a embebição, para que o processo germinativo se inicie. Dessa forma, a germinação ocorre com as primeiras chuvas, em

outubro e atinge o pico em novembro, quando a precipitação é substancial. A umidade é um fator preponderante na quebra da dormência na espécie e no estabelecimento das mudas (Silva et al., 2007).

A utilização mais proeminente da espécie *A. crassiflora* Mart., e que a inclui dentro das espécies que podem ser consideradas como recurso genético do Cerrado, é o aproveitamento alimentar dos frutos (Almeida et al., 1998). Os frutos do araticum podem ser consumidos *in natura*, ou processados de várias formas. Existem várias receitas de doces e bebidas que levam o sabor de sua polpa adocicada, acrescida, muitas vezes, pelos sabores de outros frutos. Esse aproveitamento é difundido entre os habitantes de comunidades locais do Cerrado brasileiro. Podem ser encontrados vários pratos típicos da região que são confeccionados com esse fruto, com destaque para os doces, as geléias, os licores, os refrescos, os sorvetes e os sucos (Soares et al., 2009).

O araticum é um fruto de alto valor nutricional, uma vez que ele contém níveis elevados de lipídeos, fibras, magnésio e fósforo. Contém ainda o ácido málico, um composto muito empregado para produção de acidulantes e estabilizantes na indústria alimentícia. O fruto também apresenta uma boa quantidade de substâncias antioxidantes (Damiani et al., 2011). Um fruto típico do araticum, com 2 kg tem rendimento de 50% de polpa. Cada 100 g de polpa, por sua vez, contém aproximadamente 52 calorias, 0,4 g de proteínas, 52 mg de cálcio (Ca), 24 mg de fósforo (P), 2,3 mg de ferro (Fe), 21 mg de vitamina C, 50 mg de vitamina A, 0,04 mg de vitamina B1 e 0,07 mg de vitamina B2 (Almeida et al., 1998).

Outra utilização potencial do araticunzeiro é como planta medicinal. A espécie tem sido usada pelas comunidades locais do Cerrado brasileiro para o tratamento de uma série de doenças, tais como: diarreia, reumatismo e sífilis (Almeida et al., 1987). A planta apresenta também acetogeninas, que apresentam propriedades citotóxicas. Esses compostos foram estudados na década de 1980 e mostraram atividade antitumoral contra a leucemia linfocítica em camundongos, a partir de testes *in vivo*. As acetogeninas mostraram, mais tarde, que são efetivas também contra uma série de linhagens de células tumorais. No araticum foi isolada das sementes uma acetogenina chamada crassiflorina. Essa molécula

tem despertado interesse como uma fonte de potenciais agentes antineoplásicos naturais (Santos & Boaventura, 1994).

Ferreira et al. (2008) testaram os possíveis efeitos mutagênicos, antimutagênicos e citotóxicos do extrato etanólico de folhas de araticum, pelo teste em camundongos. Os autores evidenciaram que o extrato não apresenta efeito mutagênico em ratos. Quanto ao efeito citotóxico ele foi observado em doses elevadas do extrato. A atividade antimutagênica foi claramente evidenciada, nesse estudo. Os autores concluíram que possivelmente a atividade antimutagênica exibida possa contribuir para um efeito anticancerígeno, enquanto que a citotoxicidade para uma atividade antitumoral.

A casca e a semente dos frutos de araticunzeiro apresentam também compostos fenólicos que possuem excelentes efeitos antioxidantes, tais como o ácido ascórbico, cafeico, quínico, ferúlico, tartárico, dentre outros. É importante ressaltar que esses elementos do fruto são considerados restos de consumo humano, pois normalmente são descartados, sendo aproveitada apenas a polpa. Isso leva a perda desse potencial, visto que a polpa tem efeito antioxidante mais fraco. Esses compostos antioxidantes podem ser removidos por processos de extração relativamente simples e rápidos. Esse fato deve encorajar a obtenção de extratos fenólicos para estudos farmacológicos, com o objetivo de evidenciar o potencial de utilização dessas moléculas em medicamentos, ou o desenvolvimento de suplementos dietéticos e alimentos funcionais (Roesler et al., 2007).

Os extratos hidroalcoólicos de sementes, folhas e caules de *A. crassiflora* Mart. também mostram efeitos alelopáticos proeminentes. Inoue et al. (2010) observaram que esses extratos reduzem a germinação e o desenvolvimento de radícula de espécies de plantas daninhas, mas não afetam o desenvolvimento de mudas da soja. Os autores sugerem que esses compostos poderiam ser utilizados como biodefensivos agrícolas, desde que mais estudos sejam realizados para identificar as substâncias responsáveis pela alelopatia.

### 3 SISTEMA DE CRUZAMENTO E FLUXO GÊNICO CONTEMPORÂNEO VIA PÓLEN EM *Annona crassiflora* Mart.

#### RESUMO

A espécie *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), popularmente conhecida por araticunzeiro é uma árvore nativa do bioma Cerrado. Essa espécie é muito interessante para estudos de sistema de cruzamento e dispersão de pólen, pois há uma relação estreita entre polinizadores, dispersores de frutos e a planta. A espécie apresenta cantarofilia, sendo polinizado por apenas dois besouros do gênero *Cyclocephala*, que são atraídos pelo odor da flor, que também apresenta termogênese. A dispersão dos frutos é realizada, quase que exclusivamente pela anta (*Tapirus terrestris*). Sendo assim, a espécie *A. crassiflora* foi selecionada para estudos de biologia reprodutiva, usando marcadores microsatélites. Foram amostradas sementes e folhas de 20 árvores matrizes, além de folhas de 92 árvores adultas em uma população natural localizada próximo ao município de Vila Propício, Goiás, Brasil. O DNA foi extraído e amplificado via PCR com seis pares de iniciadores microsatélites. Foram estimados os níveis de diversidade genética na população ( $H_e$ ) e endogamia ( $f$ ). O sistema reprodutivo foi avaliado com base nas estimativas da taxa de cruzamento ( $t_m$ ) geral e por família, além das correlações de paternidade ( $r_p$ ). A distância da dispersão de pólen foi avaliada por meio de teste de paternidade. Foram observados índices moderados de diversidade genética (0,628). O coeficiente de endogamia não diferiu de zero (-0,019). A taxa de cruzamento variou, entre as famílias de 0,839 a 0,993, indicando sistema misto de reprodução. A correlação de paternidade indicou que 30% das sementes tem parentesco de irmãos-completos. A distância máxima de dispersão do pólen foi de 360,7 metros e média de 131,5 metros, sendo que 71% dos eventos de polinização ocorreram em até 160 metros, evidenciando que o fluxo gênico ocorre em curtas distâncias.

*Palavras-chave:* araticunzeiro, biologia reprodutiva, distância de polinização, microsatélites.

MATING SYSTEM AND CONTEMPORARY GENE FLOW BY POLLEN  
IN *Annona crassiflora* Mart.

ABSTRACT

The *Annona crassiflora* species, known as araticunzeiro is a native tree of the Cerrado biome. This species is very interesting for breeding system and pollen dispersal studies, because there is a closely relationship between pollinators, fruit dispersers and the plant. *A. crassiflora* is cantharophily, being pollinated just by two *Cyclocephala* gender beetles, which are attracted by flower's odor, as well as the thermogenesis. The fruit dispersion is carried out, almost exclusively, by the tapir (*Tapirus terrestris*). Thus, the species *A. crassiflora* was selected to mating system and pollen dispersal studies, using SSR markers. Seeds and leaves of trees 20 mother plants have been sampled, plus the leaves of 92 trees. The DNA was extracted and amplified with six pair of microsatellite primers by PCR. We estimate the levels of genetic diversity ( $H_e$ ), and inbreeding ( $f$ ) in the population. The mating system was evaluated based on estimates of general and per family outcrossing rate ( $t_m$ ), in addition to paternity correlation ( $r_p$ ). We evaluated the distance pollen dispersal using paternity analysis. We observed moderate levels of genetic diversity (0.628). The inbreeding coefficient did not differ from zero (-0.019). The outcrossing rate ranged between families from 0.839 to 0.993, indicating a mixed mating system. The correlation of paternity indicated that 30% of the seeds are full-sibs. The maximum distance of pollen dispersion was 360,7 m and averaged 131.5 m, with 71% of the pollination occurring until 160 m, indicating short distance of gene flow.

*Keywords:* araticunzeiro, microsatellites, reproductive biology, pollination distance.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), popularmente conhecida por araticunzeiro é uma árvore nativa do bioma Cerrado. A planta apresenta porte arbóreo com altura de 4 m a 8 m, com tronco geralmente tortuoso de 20 cm a 30 cm de diâmetro, revestido por casca áspera e corticosa que resiste à ação do fogo. As folhas são crasso-membranosas, glaucas e ferrugíneo-hirsutas quando jovens. As flores são solitárias, axilares, com pétalas engrossadas e carnosas. O fruto é do tipo baga subglobosa, de superfície tomentosa e tuberculada ou papilosa, contendo polpa levemente adocicada e de cheiro agradável. Algumas vezes o fruto pode apresentar polpa avermelhada e mais doce (Souza & Lorenzi, 2008).

Com relação ao sistema reprodutivo, Cavalcante et al. (2009) observaram as flores em antese do araticunzeiro e o comportamento do inseto polinizador. Os autores verificaram que, apesar da espécie não apresentar sistema de autoincompatibilidade, os frutos de *A. crassiflora* são formados, prevalentemente, por meio da fecundação cruzada (alogamia prevalente). Esse fato faz com que a espécie seja dependente de agentes polinizadores. O araticum apresenta cantarofilia, os principais polinizadores identificados são os besouros do gênero *Cyclocephala*, principalmente *C. atricapilla* Mannerheim e *C. octopunctata* Burmeister. A polinização por besouros é muito comum entre espécies da família Annonaceae, sendo considerada plesiomórfica nas angiospermas (Gottsberger, 1989a, 1999; Cavalcante et al., 2009).

As flores do araticunzeiro apresentam termogênese. Normalmente o processo de aquecimento é iniciado ao anoitecer. Sua temperatura interna pode ser até 10°C acima da temperatura ambiente. O estigma apresenta uma camada de exsudato transparente. Com o aumento da temperatura a flor exala um forte odor, que atrai os besouros. Em *A. crassiflora* a antese é gradual e inicia nas primeiras horas do dia e pode se estender até o início da madrugada do dia seguinte. A receptividade aos polinizadores ocorre desde o início da antese. A formação do fruto é mais provável quando as flores são polinizadas nessa fase inicial (Gottsberger, 1989a; Cavalcante et al., 2009).

Alguns trabalhos disponíveis na literatura avaliaram o sistema reprodutivo de

espécies da família Annonaceae (Gottsberger, 1999; Kiill & Costa, 2003), inclusive de *A. crassiflora* (Gottsberger, 1989a, 1989b; Cavalcante et al., 2009). No entanto eles empregam métodos indiretos, observando o comportamento dos insetos polinizadores. Apesar da família Annonaceae ser uma das mais antigas, dentre as angiospermas e apresentar várias espécies economicamente importantes, existem poucos trabalhos que utilizam a abordagem de empregar marcadores moleculares para quantificar a taxa de fecundação cruzada. Dentre os trabalhos realizados com espécies da mesma família, Lora et al. (2011) empregaram a análise de paternidade, por meio de marcadores microssatélites para avaliar o sistema reprodutivo em *A. cherimola*. Diferente do observado pelos trabalhos com métodos indiretos em *A. crassiflora*, os autores verificaram a presença de autofecundação, que variou entre 25% e 90%.

A taxa de frutificação observada na espécie é baixa, em torno de 4% (Cavalcante et al., 2009). Apesar da alta viabilidade do pólen, a polinização natural pode variar muito, em função das condições ambientais, como por exemplo a ação dos ventos. Esse fator pode influir negativamente na frutificação. A baixa taxa de frutificação também pode ser explicada pela existência de plantas de araticunzeiro cujas flores, embora perfeitas, não expõem o pólen das anteras quando está em fase masculina, o que caracteriza uma planta funcionalmente feminina. Além disso, existem plantas cujas flores, embora perfeitas e em número abundante, não formam frutos, mesmo por meio da polinização manual cruzada, o que sugere que as plantas sejam funcionalmente masculinas. Esse fenômeno chama a atenção, pois é um indício de que essa espécie tenha dioicéia funcional. Porém há plantas hermafroditas, que apresentam flores produtoras de pólen e frutos (Cavalcante et al., 2009).

A dispersão dos frutos das espécies neotropicais da família Annonaceae, provavelmente eram realizadas por herbívoros de grande porte, pertencentes a uma fauna já extinta, como por exemplo as grandes preguiças terrestres gigantes. Assim, esses frutos exibem adaptações obsoletas, sendo que muitos deles apresentam grande porte, o que dificulta a dispersão por animais presentes na fauna atual. Isso faz com que esses frutos fiquem acumulados na base das plantas matrizes, apodrecendo ou servindo de alimento para insetos (Janzen & Martin, 1982). Esse fato explica o motivo pelo qual a dispersão dos

frutos de *A. crassiflora* seja realizada quase que exclusivamente pela anta (*Tapirus terrestris*). Outros animais podem consumir ocasionalmente os frutos do araticunzeiro, tais como o veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), lobinho (*Cerdocyon thous*), tatu (*Dasypus* sp.) e algumas espécies de aves, mas elas não constituem dispersores efetivos. Além disso, as características dos locais de defecação do *T. terrestris* e a eliminação das sementes intactas do araticunzeiro podem favorecer a germinação da planta (Golin et al., 2011).

Além das características naturais do araticunzeiro, que podem limitar o alcance do fluxo gênico, a crescente fragmentação do Cerrado pode levar as populações naturais da espécie a apresentarem restrições na dispersão de pólen e semente. Collevatti et al. (2014) avaliaram geneticamente duas populações naturais de *A. crassiflora*, uma em área conservada, pertencente a Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE-DF) e outra em área com marcada fragmentação, próxima ao município goiano de Padre Bernardo. Os autores constataram que na área fragmentada a população apresenta ajuste ao modelo de isolamento por distância, com forte estrutura espacial. Na população conservada os genótipos estão mais uniformemente distribuídos, sem estrutura espacial significativa.

Na literatura consta alguns trabalhos que empregaram a metodologia usada aqui, que consiste na utilização de marcadores microsatélites e teste de paternidade, ou o método TwoGener, para avaliar o fluxo gênico em espécies neotropicais (Nason et al., 1998; Dick et al., 2003; Lacerda et al., 2008) e mesmo nativa do Cerrado (Collevatti et al., 2010). Até o presente momento, entretanto não existe registro na literatura de trabalhos de dispersão de pólen, empregando teste de paternidade, em nenhuma espécie da família Annonaceae. Mesmo os trabalhos com espécies polinizadas por besouros, usando marcadores moleculares são raros. Apenas dois deles foram levantados por Ward et al., (2005), em um levantamento dos trabalhos que avaliaram o sistema de cruzamento e fluxo gênico mediado por pólen, em árvores neotropicais, ambos apenas sobre sistema de cruzamento.

Assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar o sistema reprodutivo de plantas provenientes de uma população natural de *A. crassiflora*. e determinar a distância de dispersão de pólen com base em análise de paternidade.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Coleta do material vegetal

Para avaliar o sistema de cruzamento e as distâncias de dispersão de pólen em *A. crassiflora*, foi utilizada uma população natural localizada no município de Vila Propício - Goiás (Latitude: -15,203; Longitude: -48,732), distante 211 km de Goiânia. A área de coleta é um fragmento de Cerrado, com 4,2 ha. A fragmentação da vegetação nativa nesse município é muito recente e data do início da década de 1930. A antropização se deu em função da expansão da atividade agropecuária.

Nessa localidade foram coletados 74 frutos de 20 matrizes, em média 3,7 frutos por planta, além das folhas dessas plantas. Adicionalmente coletaram-se folhas de 92 árvores adultas, para serem avaliadas como as prováveis doadoras de pólen, totalizando 112 plantas. Todas as plantas foram georreferenciadas. O material vegetal foi transportado para o Laboratório de Genética & Biodiversidade, no Instituto de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Goiás. Os frutos foram despulpados e as sementes retiradas para extração do DNA total. Dos 74 frutos amostrados foram obtidas 2643 sementes, em média 35,7 sementes por fruto.

### 3.2.2 Obtenção dos dados moleculares

O DNA vegetal foi obtido das folhas com base no protocolo CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), estabelecido por Doyle & Doyle (1987), descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), comumente utilizado para diversas espécies nativas do Cerrado. O procedimento consiste na lise da membrana celular, a partir do detergente catiônico CTAB e precipitação do DNA em álcool. As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose a 1%, por meio da técnica de eletroforese em cuba horizontal e coradas com brometo de etídeo. A quantificação foi realizada a partir da comparação visual entre as

bandas das amostras com o padrão de peso molecular Fago Lambda da Invitrogen™. O DNA foi diluído com água ultra pura para a concentração de trabalho igual a 1,5ng/μl.

No caso da extração de DNA das sementes foi necessário uma etapa adicional, em função da presença de vários contaminantes, restos de metabólitos secundários, que não foram eliminados durante o processo de extração com o protocolo usual. Inicialmente o DNA das 2643 sementes foi extraído e quantificado em gel de agarose 1%. Destas, as amostras que apresentaram a maior quantidade de DNA foram selecionadas para uma segunda extração. Nessa etapa foram escolhidas 23 sementes por árvore mãe, totalizando 460 semente. Para remover os compostos secundários restantes foi utilizado o kit de extração *DNeasy 96 Plant Kit* da Qiagen®, para fazer a extração do produto resultante da utilização do protocolo CTAB.

O DNA foi amplificado via reação em cadeia da polimerase (PCR) com seis pares de iniciadores de regiões microssatélites, desenvolvidos por Pereira et al. (2008). Para cada amostra foi preparada uma reação com volume final de 10,5 μL composta por: 4,5 ng de DNA, 0,25 μM de cada iniciador (*forward e reverse*), 0,25 mM de cada um dos dNTPs, tampão (1 mM Tris-HCl, pH 8,3; 5 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25mg/mL BSA (*Bovine Serum Albumin*), 1 U Taq DNA polimerase da Phoneutria® e água ultra pura q.s.p. O programa de amplificação do termociclador Veriti® da Applied Biosystems® consistiu dos seguintes passos: 1) – desnaturação do DNA a 94°C por cinco minutos; 2°) – 94°C por 1 minuto; 3°) – anelamento do iniciador em temperatura específica por 1 minuto; 4°) – extensão da molécula de DNA pela enzima Taq DNA polimerase a 72°C por 1 minuto; 5°) – 30 ciclos seguindo do 2° ao 4° passo; 6°) – extensão de 7 minutos a 72°C, para finalizar os produtos amplificados.

Foram montados dois sistemas multiplex para a genotipagem no analisador automático de DNA 3500 da Applied Biosystems® (Tabela 1). O loco Acr20 foi analisado separadamente, por possuir mesma amplitude e/ou mesma coloração do Acr01 (multiplex 01) e Acr22 (multiplex 02).

**Tabela 1.** Conjunto de iniciadores microssatélites em esquema de genotipagem multiplex, conforme foram empregados para avaliação do sistema de cruzamento e fluxo gênico via pólen em uma população natural de *A. crassiflora*, proveniente do estado de Goiás, Brasil.

Multiplex	Loco	Fluorocromo
01	Acr01	6FAM
	Acr26	HEX
02	Acr10	6FAN
	Acr19	HEX
	Acr22	6FAN
	Acr20	6FAN

A reação para a eletroforese capilar foi montada para um volume final de 10 $\mu$ L, composta por: 1 $\mu$ L do produto da reação de amplificação, 0,25  $\mu$ L de marcador interno de peso molecular ROX *Size Standard* e 8,75  $\mu$ L de formamida Hi-Di® Applied Biosystems®. Essa solução foi submetida à desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de resfriamento imediato a 0°C por 1 minuto.

### 3.2.3 Avaliação dos locos microssatélites

Inicialmente os genótipos foram obtidos por meio da análise dos eletroferogramas no programa GeneMapper® V. 5 da Applied Biosystems®. Em seguida, os genótipos foram usados para avaliar tanto os erros de genotipagem, quanto a existência de alelos nulos e “dropout”, o que pode prejudicar as análises do sistema reprodutivo e de atribuição de paternidade. Para essa finalidade foi usado o programa Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2004). As análises foram conduzidas com 1000 permutações. Nessa etapa foram utilizados apenas os genótipos das árvores adultas. Essa decisão foi tomada, pois o Micro-Checker utiliza os desvios das proporções genotípicas (homozigosidade) esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para avaliar os erros de genotipagem, “dropout” e a

presença de alelos nulos. Sendo assim, as sementes foram excluídas da análise, pois a estrutura familiar pode gerar desvios, confundindo as análises. Um “dropout” ocorre quando em um genótipo os alelos são de tamanhos muito diferentes. Nesse caso, o alelo menor amplifica mais rápido e gera um sinal de fluorescência tão alto que o alelo maior pode não ser facilmente visualizado e, portanto, ignorado. Um alelo nulo, por sua vez, ocorre quando há uma mutação no sítio de anelamento do iniciador, não ocorrendo a amplificação, ainda que o loco microssatélite exista. Quando a mutação está presente em apenas um dos cromossomos, o indivíduo é identificado como homocigoto, ainda que seja heterocigoto (Shaw et al., 1999).

A capacidade de discriminar os indivíduos está intimamente associada ao nível de polimorfismo dos marcadores microssatélites. O nível de variabilidade foi avaliado a partir do número de alelos por loco. Foi estimado ainda a diversidade genética de Nei ( $H_e$ ) e o coeficiente de endogamia ( $f$ ), para verificar a ocorrência de desvios das proporções genotípicas do esperado na vigência do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esses parâmetros foram obtidos por meio do pacote “hierfstat” no programa R (Goudet, 2005). A habilidade dos locos microssatélites em discriminar os indivíduos foi medida com base nas probabilidades combinadas de identidade ( $PI$ ) (Paetkau *et al.*, 1995) e de exclusão de paternidade ( $P$ ) (Weir, 1996). Para gerar esses valores foram empregados os genótipos das plantas adultas, na etapa de análise de frequências alélicas, implementada no programa CERVUS (Kalinowski et al., 2007). Além disso, foi realizada a análise de equilíbrio de ligação entre todos os pares de locos, usando a correção de Bonferroni, por meio do Teste Exato de Fisher, com dez mil randomizações no programa GDA (Lewis & Zaykin, 2001).

### **3.2.4 Caracterização genética da população**

O nível e organização da variabilidade genética na população estudada foi avaliada por meio da heterocigosidade observada ( $H_o$ ) e diversidade genética de Nei (1972), que é representada pela heterocigosidade esperada ( $H_e$ ) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg. O nível de endogamia na população, que reflete a organização da variabilidade genética

intrapopulacional foi avaliada por meio do coeficiente  $f$ . As análises foram conduzidas segundo Weir & Cockerham (1984), por meio do pacote “hierfstat” no programa R (Goudet, 2005). Os parâmetros foram estimados usando os genótipos das plantas adultas.

### 3.2.5 Avaliação do sistema reprodutivo

O sistema reprodutivo foi avaliado a partir do método direto, em que as progênes oriundas de um evento de fecundação são utilizadas. Com esse objetivo foi empregado o modelo misto, proposto por Ritland & Jain (1981). Esse modelo assume que uma fração das progênes avaliadas foi formada por eventos de autofecundação ( $s$ ) e a fração restante por eventos de fecundação cruzada ( $t$ ). O modelo misto tem alguns pressupostos importantes. Os locos empregados na análise devem segregarem independentemente e, portanto, não estarem ligados (equilíbrio de ligação). Além disso, a fração das progênes resultantes da alogamia deve ter sido formada por cruzamentos aleatórios. As frequências alélicas no pool de pólen devem ser homogêneas em relação às suas frequências no pool de óvulos. Não devem existir diferenças de fecundidade entre as famílias, ou plantas/matrizes. Por fim, os locos empregados não devem estar sob pressão de seleção e mutação (Ritland & Jain, 1981; Ritland, 2002).

Inicialmente foram estimadas as frequências alélicas do “pool” de pólen e do conjunto de óvulos usando o programa MLTR – *Multiloco Mating System Program* (Ritland, 2002), com base nos genótipos das progênes e das plantas matrizes. A homogeneidade das frequências do “pool” de pólen em relação ao conjunto de óvulos foi testada a partir da estatística  $F_{ST}$ . A significância dos valores foi aferida pelo teste do  $\chi^2$ , de acordo com o método proposto por Workman & Niswander (1970). A diferenciação das frequências alélicas ajuda a compreender a estrutura de cruzamentos na população. Quando há panmixia as frequências alélicas do “pool” de pólen não diferem das frequências alélicas do conjunto de óvulos (Sebbenn, 2005).

Os parâmetros estimados, que descrevem o sistema reprodutivo foram: taxa de cruzamento multiloco ( $\hat{t}_m$ ) geral e por família e taxa de cruzamento uniloco ( $\hat{t}_s$ ). A

diferença entre  $\hat{t}_m$  e  $\hat{t}_s$  permitiu avaliar a ocorrência de cruzamentos entre plantas aparentadas na população ( $\hat{t}_m - \hat{t}_s$ ). Foi estimada também a correlação multiloco de paternidade ( $\hat{r}_{p(m)}$ ). Esse parâmetro é definido no modelo de cruzamentos correlacionados de Ritland (1989), que trata cada par de semente da prole como sendo uma unidade de observação. Assim, a correlação multiloco de paternidade denota a probabilidade de que dois irmãos, derivados de fecundação cruzada sejam irmãos completos. Foi estimada também a correlação de autofecundação ( $\hat{r}_s$ ) entre duas plantas, dentro de uma família. Esse parâmetro denota a probabilidade de ser encontrada uma semente gerada por autofecundação, em uma matriz em que outra semente autofecundada foi anteriormente encontrada. Para gerar os intervalos de confiança para cada uma das estimativas foi empregado o procedimento de *bootstrap* com 1000 randomizações. Os parâmetros foram estimados por meio do programa *MLTR – Multiloco Mating System Program* (Ritland, 2002).

A estrutura genética dentro das famílias maternas foi avaliada conforme Sebbenn (2002). Os valores de  $\hat{t}_m$  e  $\hat{r}_{p(m)}$  foram empregados para calcular a proporção de irmãos completos:  $\hat{P}_{(IC)} = \hat{t}_m \hat{r}_{p(m)}$ , meios irmãos:  $\hat{P}_{(MI)} = (1 - \hat{r}_{p(m)}) \hat{t}_m$  e irmãos de autofecundação  $\hat{P}_{(IA)} = 1 - \hat{t}_m$ .

### 3.2.6 Análise de paternidade e distância de dispersão de pólen

Para medir as distâncias do fluxo gênico mediado por pólen foi empregada a metodologia de atribuição de paternidade, a partir dos locos microssatélites. A paternidade foi inferida a partir de razão de verossimilhança:

$$LR = \frac{H_1}{H_2}$$

em que  $H_1$  corresponde a hipótese de que uma árvore seja a verdadeira doadora de pólen e  $H_2$  a hipótese de que o esse doador seja um indivíduo aleatório na população. Para cada provável doador de pólen na população foi calculada uma razão de verossimilhança ( $LR$ ) multiplicando os valores de  $LR$  para cada loco. Extraindo o logaritmo

natural ( $ln$ ) de  $LR$  de cada genitor, é o obtido o  $LOD$  score. Quando o valor de  $LOD$  é positivo, indica que a hipótese  $H_1$ , ou seja, de que o doador de pólen é o candidato avaliado, tem maior verossimilhança que a hipótese alternativa relativa ao outro indivíduo amostrado aleatoriamente. Quando dois ou mais candidatos apresentaram o valor de  $LOD$  positivo é utilizada a estatística  $\Delta$  (delta). Essa, por sua vez, corresponde à diferença do valor de  $LOD$  do doador de pólen mais verossímil e o do segundo doador de pólen mais verossímil (Kalinowski et al., 2007).

Em seguida, foi realizada uma simulação da análise de paternidade, em que foram gerados os valores críticos de  $\Delta$ . Foram empregados dois níveis de confiança; 95% (estrito) e 85% (relaxado). Essa etapa objetivou confrontar os valores de  $\Delta$  obtidos nas atribuições de paternidade com o valor crítico gerados por simulação, para testar sua significância. O genitor paterno candidato foi determinado como doador de pólen se a diferença entre o seu valor de  $LOD$  e o valor do segundo candidato for maior que o  $\Delta$  crítico. A proporção de doadores de pólen amostrada na população natural foi considerada de 0,97 e de locos genotipados de 0,94. Foi apontado como possível erro de genotipagem a proporção de 0,05 e os indivíduos com menos que três locos genotipados foram descartados da atribuição. As análises de atribuição de paternidade foram conduzidas no programa CERVUS (Kalinowski et al., 2007).

Os resultados da análise foram utilizados para verificar a paternidade múltipla nos frutos e construir um histograma com a distribuição da frequência dos eventos de polinização, de acordo com as classes de distância. A atribuição de paternidade a 85% de confiança, juntamente com os dados de  $GPS$  foram empregados para calcular a distância da polinização, em metros, assim como a média dos eventos de polinização e o desvio padrão.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Polimorfismo dos locos e diversidade genética da população

As análises no programa Micro-Checker, a partir dos dados das plantas da população natural, indicaram que os locos avaliados não apresentam excessos de genótipos homocigotos, quando comparados com os valores esperados sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, com 5% de significância. Além disso, não foi evidenciada a presença de alelos nulos e “dropout”. Os resultados indicam ausência de erros de genotipagem. Sob esse ponto de vista, os locos são adequados para avaliar o sistema reprodutivo e realizar as análises de paternidade, com o objetivo de medir a distância de polinização.

O número de alelos por loco ( $A$ ) variou de 4 a 12 (média 8,5). A diversidade genética, representada pela heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ) variou de 0,479 a 0,813 (média 0,628). A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,445 a 0,835 (média de 0,640). O índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ) variou de -0,157 a 0,070 (média -0,019) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número de alelos por loco ( $A$ ), heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), probabilidade de identidade ( $PI$ ) e probabilidade de exclusão de paternidade ( $P$ ) dos locos SSR das plantas de *A. crassiflora* provenientes da população natural de Vila Propício, Goiás, Brasil.

<b>Loco</b>	<b><math>A</math></b>	<b><math>H_e</math></b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>f</math></b>	<b><math>PI</math></b>	<b><math>P</math></b>
Acr01	12	0,770	0,835	-0,085	0,087	0,245
Acr10	5	0,479	0,445	0,070	0,307	0,559
Acr19	7	0,595	0,688	-0,157	0,214	0,465
Acr20	11	0,813	0,811	0,003	0,061	0,187
Acr22	12	0,611	0,595	0,027	0,174	0,365
Acr26	4	0,503	0,469	0,069	0,316	0,608
<b>Média</b>	<b>8,5</b>	<b>0,629</b>	<b>0,640</b>	<b>-0,019</b>	<b><math>PI(C) = 1,921 \times 10^{-5}</math></b>	<b><math>P(C) = 0,997</math></b>

O nível de polimorfismo ( $A$ ) e diversidade genética ( $H_e$ ) dos locos microssatélites pode ser considerada mediana. Os valores obtidos aqui são inferiores aos estimados por Pereira et al. (2008), ao avaliar 10 locos SSR em uma população natural de *A. crassiflora*, proveniente do estado de Goiás, quando são comparados, exclusivamente, os mesmos conjuntos de marcadores moleculares. Os autores verificaram quase o dobro do número médio de alelos por loco (16,33). A diversidade genética e a heterozigidade observada também foram mais elevadas (0,879 e 0,766). O que explica a diferenciação dos valores de  $H_e$  é a heterogeneidade das frequências alélicas. Quando elas são mais equilibradas, a diversidade genética é mais elevada (Hartl & Clark, 2010). Valores medianos de  $H_e$  indicam maior heterogeneidade dessas frequências, em comparação ao estudo citado. Por sua vez, as estimativas de  $H_o$  são afetadas pelo nível de polimorfismo dos locos ( $A$ ), que é inferior no presente trabalho, além do sistema reprodutivo e a presença de cruzamentos endogâmicos, que reduzem a quantidade de genótipos heterozigotos observados (Charlesworth & Wright, 2001).

A probabilidade combinada de identidade ( $PI$ ) foi de  $1,921 \times 10^{-5}$ , ou seja, a probabilidade de que duas plantas na população tenham genótipos idênticos é de aproximadamente 2 em 100 mil. Considerando que a população inteira, avaliada nesse estudo, é formado por 112 árvores adultas e 460 sementes e que todos os registros no Brasil de *A. crassiflora*, no banco de dados do *Species Link*, não passa de 550 pontos de ocorrência (Cria, 2015), a probabilidade de identidade ( $PI$ ) obtida aqui é muito razoável. Dificilmente duas plantas teriam o mesmo genótipo, por acaso, mesmo considerando todos os registros da espécie. A probabilidade combinada de exclusão de paternidade ( $P$ ) foi de 0,997 (99,7%), que representa a probabilidade de excluir um genitor que não seja o verdadeiro doador, com base no genótipo (Tabela 2). Os valores de  $P$ , considerados ideais, estão entre 97% e 99%. Nessa faixa de magnitude é possível resolver a paternidade de uma semente com confiança (Ashley, 2010).

Os estimativas de  $PI$  e  $P$ , obtidas no presente estudo, mostram que os locos microssatélites usados são adequados para avaliação do sistema reprodutivo e análise de paternidade. Apesar disso, a estimativa de  $PI$  foi maior que a obtida por Collevatti et al. (2014), igual a  $2,03 \times 10^{-15}$ . Da mesma forma, os autores obtiveram um valor superior para

$P$ , igual a 0,99999. O trabalho citado foi desenvolvido em duas populações de *A. crassiflora*, sendo uma delas a mesma usada no presente estudo, no entanto com uma bateria de locos maior, com 10 iniciadores. Embora, no presente estudo, tenha sido utilizada uma quantidade menor de locos microssatélites, as estimativas de  $PI$  e  $P$  sugerem que seis iniciadores são suficientes para atingir os objetivos desse trabalho, resultando em menor esforço de amostragem genética. Ritland & Jain (1981) já haviam mostrado, por meio de simulação, que quatro locos isoenzimáticos, com frequências alélicas intermediárias e 200 indivíduos avaliados, são suficientes para boas estimativas da taxa de fecundação cruzada multiloco. A adição de mais locos marcadores, no entanto, reduz rapidamente a variância das estimativas.

A análise de equilíbrio de ligação evidenciou que os locos Acr01 e Acr19 (valor de  $p < 0,001$  com 5% de significância) não satisfazem a hipótese de associação aleatória dos locos. Os demais pares encontram-se em equilíbrio de ligação ( $\alpha = 0,00333$ ; Correção de Bonferroni para testes múltiplos). O equilíbrio de ligação é um importante pressuposto na avaliação do sistema reprodutivo (Ritland & Jain, 1981; Ritland, 2002). Quando as frequências alélicas de dois locos estão associadas, por qualquer razão, as estimativas que levam em conta a média dos valores entre diferentes locos podem sofrer vies. Isso ocorre pois mais peso é dado para o padrão evidenciado pelo par em desequilíbrio de ligação, em comparação com os outros locos (Weir, 1996). Apesar da discussão levantada pela literatura, o desequilíbrio de ligação observado causou pouco efeito nas estimativas relacionadas ao sistema reprodutivo. Ainda que um dos dois iniciadores tenha sido removido, os valores estimados variaram muito pouco. Por isso, optou-se por realizar as análises com os seis iniciadores.

Com relação ao polimorfismo e organização da diversidade genética, a população natural de *A. crassiflora* avaliada apresenta níveis intermediários de  $H_e$ . A diferença entre os valores médios de  $H_e$  e  $H_o$  foi pequena, o que resultou em estimativa nula e não significativa do coeficiente de fixação intrapopulacional ( $f$ ). Este resultado indica que não há desvios das frequências genotípicas em relação às condições esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Sendo assim, não foi possível detectar o cruzamento entre indivíduo aparentados, nessa população. A ausência de endogamia em populações de *A.*

*crassiflora* foi reportada, pela primeira vez, por Telles et al. (2003), usando marcadores isoenzimáticos. Os autores verificaram ausência de desvios da panmixia em populações naturais da espécie, provenientes do estado de Goiás.

### 3.3.2 Sistema reprodutivo

A homogeneidade das frequências alélicas do “pool” de pólen, em relação às frequências alélicas do conjunto de óvulos foi refutada, com nível de significância de 5%. Foi observada, no entanto, pequena diferenciação nas frequências alélicas entre o conjunto de pólen e óvulo, com valores de  $F_{ST}$  que variaram entre 0,0025 (Acr19) a 0,0414 (Acr10) (Tabela 3). Esse resultado é interessante, visto que a população adulta de plantas não apresentou desvios do modelo de cruzamentos aleatórios, quando avaliada por meio do coeficiente de fixação intrapopulacional ( $f$ ). A pequena estruturação das frequências alélicas nas árvores adultas, identificada com os genótipos das sementes, indica a ocorrência atual de desvios da panmixia. Essa diferenciação pode ser gerada por meio da ocorrência de autofecundação, em uma taxa mais elevada que a esperada por Equilíbrio de Hardy-Weinberg, cruzamentos biparentais, endogamia, ou ainda variações espaciais na fenologia de florescimento das plantas (Gusson et al., 2006).

**Tabela 3.** Diferenciação das frequências alélicas do “pool” de pólen, em relação às frequências alélicas do conjunto de óvulos, por meio dos valores de  $F_{ST}$  por loco, com os respectivos graus de liberdade (GL),  $\chi^2$  de cada teste e os valores de p associados a hipótese de homogeneidade das frequências alélicas entre os gametas masculinos e femininos de *A. crassiflora* provenientes da população natural de Vila Propício, Goiás, Brasil.

Locos	$F_{ST}$	GL	$\chi^2$	Valor de p
Acr01	0,0044	14	47,27	$1,73 \times 10^{-05}$
Acr10	0,0414	8	293,38	$1,06 \times 10^{-58}$
Acr19	0,0025	9	20,64	$1,43 \times 10^{-2}$
Acr20	0,0226	9	182,90	$1,25 \times 10^{-34}$
Acr22	0,0064	14	77,97	$6,71 \times 10^{-11}$
Acr26	0,0079	7	47,43	$4,60 \times 10^{-08}$

A taxa de cruzamento multiloco ( $\hat{t}_m$ ) foi de 0,974 ( $\pm 0,011$ ) e a taxa de cruzamento uniloco ( $\hat{t}_s$ ) foi de 0,909 ( $\pm 0,022$ ). A estimativa de  $\hat{t}_m$  é compatível com sistema de reprodução com prevalência de alogamia (Fryxell, 1957). A estimativa dos parâmetros do sistema reprodutivo realizadas por família, evidenciaram que os valores de  $\hat{t}_m$  variaram entre 0,839 (fam12) a 0,993 (fam01, fam06, fam08, fam14, fam15, fam16). Os valores de  $\hat{t}_s$  variaram entre 0,783 (fam03) e 0,952 (fam01) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Estimativas por família da taxa de cruzamento multiloco ( $\hat{t}_m$ ), taxa de cruzamento uniloco  $\hat{t}_s$ , taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ( $\hat{t}_m - \hat{t}_s$ ) das plantas de *A. crassiflora* provenientes da população natural de Vila Propício, Goiás, Brasil.

Família	$\hat{t}_m$	$\hat{t}_s$	$\hat{t}_m - \hat{t}_s$
Fam01	<b>0,993</b> ( $\pm 0,002$ )	<b>0,952</b> ( $\pm 0,014$ )	0,041 ( $\pm 0,011$ )
Fam02	0,943 ( $\pm 0,004$ )	0,936 ( $\pm 0,014$ )	0,007 ( $\pm 0,011$ )
Fam03	0,883 ( $\pm 0,003$ )	<b>0,783</b> ( $\pm 0,059$ )	0,099 ( $\pm 0,058$ )
Fam04	0,953 ( $\pm 0,002$ )	0,862 ( $\pm 0,021$ )	0,091 ( $\pm 0,022$ )
Fam05	0,984 ( $\pm 0,007$ )	0,876 ( $\pm 0,021$ )	0,108 ( $\pm 0,027$ )
Fam06	<b>0,993</b> ( $\pm 0,002$ )	0,914 ( $\pm 0,011$ )	0,079 ( $\pm 0,010$ )
Fam07	0,967 ( $\pm 0,011$ )	0,929 ( $\pm 0,014$ )	0,038 ( $\pm 0,005$ )
Fam08	<b>0,993</b> ( $\pm 0,002$ )	0,909 ( $\pm 0,013$ )	0,084 ( $\pm 0,012$ )
Fam09	0,977 ( $\pm 0,008$ )	0,891 ( $\pm 0,012$ )	0,086 ( $\pm 0,014$ )
Fam10	0,956 ( $\pm 0,003$ )	0,882 ( $\pm 0,017$ )	0,074 ( $\pm 0,017$ )
Fam11	0,931 ( $\pm 0,004$ )	0,899 ( $\pm 0,013$ )	0,033 ( $\pm 0,010$ )
Fam12	<b>0,839</b> ( $\pm 0,004$ )	0,874 ( $\pm 0,019$ )	<b>-0,035</b> ( $\pm 0,016$ )
Fam13	0,963 ( $\pm 0,006$ )	0,877 ( $\pm 0,015$ )	0,087 ( $\pm 0,016$ )
Fam14	<b>0,993</b> ( $\pm 0,002$ )	0,923 ( $\pm 0,013$ )	0,070 ( $\pm 0,011$ )
Fam15	<b>0,993</b> ( $\pm 0,002$ )	0,887 ( $\pm 0,013$ )	0,106 ( $\pm 0,014$ )
Fam16	<b>0,993</b> ( $\pm 0,002$ )	0,926 ( $\pm 0,015$ )	0,066 ( $\pm 0,012$ )
Fam17	0,974 ( $\pm 0,009$ )	0,903 ( $\pm 0,008$ )	0,071 ( $\pm 0,009$ )
Fam18	0,989 ( $\pm 0,005$ )	0,877 ( $\pm 0,019$ )	<b>0,112</b> ( $\pm 0,022$ )
Fam19	0,980 ( $\pm 0,008$ )	0,925 ( $\pm 0,014$ )	0,055 ( $\pm 0,008$ )
Fam20	0,955 ( $\pm 0,008$ )	0,947 ( $\pm 0,015$ )	0,009 ( $\pm 0,011$ )
Média(Desvio Padrão)	0,974 ( $\pm 0,011$ )	0,909 ( $\pm 0,022$ )	0,065 ( $\pm 0,017$ )

- Em negrito estão destacados os valores maiores e menores de cada estimativa

As estimativas da taxa de cruzamento multiloco, obtidas nas famílias, evidenciam a ocorrência de até 16,1% de autofecundação. Esse resultado é muito interessante, visto que *A. crassiflora* é uma espécie protogínica, sendo essa característica bastante comum dentro da família Annonaceae (Gottsberger, 1988, 1989a). Apesar disso, há

variação na antese e no período de maturação das flores. A maturidade da fase feminina, geralmente é atingida na mesma noite em que a flor começa a abertura. No entanto, quando as flores começam a abrir suas pétalas no final da tarde, elas entram na fase feminina apenas na noite do dia seguinte. A fase masculina da flor tem início por volta das 22 h, que é caracterizada pelo afrouxamento da massa de estames e liberação do pólen. Ela pode durar até as 6 h. Após a fase masculina, os verticilos florais destacam-se da planta e caem no chão. O besouro *Cyclocephala* spp. passa o dia dentro da flor e sai no início da noite do segundo dia, por volta as 18 h. Esses besouros são atraídos pelo odor das flores que estão na fase feminina (Gottsberger, 1989b).

É natural supor que as flores caídas, com os besouros na câmara floral, fiquem próximas às árvores de origem. O horário de saída dos besouros, no final da tarde, coincide com a maturação da fase feminina das flores (Gottsberger, 1989b), que iniciaram a abertura apenas no final da tarde anterior. Isso pode levar ao cruzamento entre flores diferentes, dentro do mesmo indivíduo, o que é conhecido por geitonogamia. Esse mecanismo sincronizado pode explicar a autofecundação observada em *A. crassiflora*, pois do ponto de vista genético, a geitonogamia é indiferenciada da transferência de pólen para o estigma da mesma flor.

A espécie *A. crassiflora* tem sido considerada alógama. Até o presente momento não foi observado diretamente nenhum evento espontâneo de autofecundação, em populações naturais, mesmo com a constatação de autocompatibilidade. Cavalcante et al. (2009) salientam, inclusive, que *A. crassiflora* pode apresentar dioícia funcional. Em um trabalho de polinização manual, os autores observaram a existência de plantas com flores perfeitas, que não expõem o pólen das anteras, na fase masculina. Isso caracteriza plantas funcionalmente femininas. Além disso, os autores observaram flores que não formavam frutos, mesmo com polinização manual cruzada, caracterizando plantas funcionalmente masculinas, além das plantas hermafroditas.

Telles et al. (2003) estimaram a taxa aparente de autofecundação ( $s_a$ ) e fecundação cruzada ( $t_a$ ), que são métricas empregadas para avaliar o sistema reprodutivo indiretamente, com base no Equilíbrio de Wright, usando a estimativa do coeficiente de endogamia ( $f$ ). Os autores utilizaram quatro sistemas isoenzimáticos em seis populações

naturais. Apesar da estimativa de  $t_a$  média entre as populações ter sido próxima a 1,0, o que caracteriza uma espécie alógama, os valores por população foram diversos. As estimativas variaram entre 0,742 a 1,0, o que salienta a possibilidade de ocorrência espontânea de autofecundação, embora o método usado seja indireto. A constatação da ocorrência espontânea de autofecundação, por meio da observação direta de genótipos provenientes de famílias maternas, no presente estudo, mostra que o sistema reprodutivo da espécie *A. crassiflora* é mais diversificado que o relatado na literatura, até o presente momento.

É esperada uma variação na taxa de fecundação cruzada em espécies autocompatíveis. Essa variação pode ocorrer tanto entre populações diferentes, quanto entre árvores matrizes, dentro da mesma população, conforme o observado no presente estudo. A variação na taxa de cruzamento em pequena escala, entre indivíduos dentro da população, da população ao longo do tempo e entre os eventos de floração, dentro da população tem relação com a assimetria na densidade de floração, disponibilidade de flores masculinas, além da distribuição espacial das árvores (Murawski & Hamrick, 1991; Nason & Hamrick, 1997). Murawski et al. (1990) demonstraram, em *Cavanillesia platanifolia*, uma espécie de sistema misto de reprodução, uma relação positiva entre a taxa de fecundação cruzada e a disponibilidade de flores, com altas taxas de autofecundação em populações, ou anos com baixa taxa de floração. Em plantas isoladas do grupo principal da população também houve a ocorrência de índices mais elevados de autofecundação.

No presente estudo não foi observada autofecundação em plantas isoladas, ao contrário disso. A família 12 ( $t_m = 0,839$ ), por exemplo, não estava isolada espacialmente. Assim, a assimetria na floração é um dos fatores que pode explicar essa variação na taxa de fecundação cruzada, entre plantas matrizes. Em *Ceiba pentandra* (Malvaceae), por exemplo, a taxa de cruzamento variou entre completa autofecundação e completa alogamia. Essa variação é explicada tanto pela assincronia no tempo de floração, quanto pelo comportamento não aleatório do polinizador (Murawski & Hamrick, 1992).

A taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados foi baixa, sendo igual a 0,065 ( $\pm 0,017$ ). Na estimativa por famílias a diferenciação entre  $\hat{t}_m$  e  $\hat{t}_s$  variou entre -0,030 (fam12) e 0,112 (fam18). O contraste  $\hat{t}_m - \hat{t}_s$  é um indicativo de estrutura genética intrapopulacional. Os desvios do cruzamento aleatório não afetam os locos da mesma

forma, assim, os valores de  $\hat{t}_s$ , que são estimativas independentes da taxa de fecundação cruzada ( $t$ ) e  $\hat{t}_m$ , baseado na distribuição de probabilidade de  $t$ , com genótipos múltiplos, revelam a ocorrência de cruzamentos entre parentes (Ritland & Jain, 1981). O valor médio para a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados, obtido aqui, é consistente com a estimativa do coeficiente de endogamia ( $f$ ), que não diferiu de zero, indicando cruzamentos aleatórios.

A estimativa global da correlação multiloco de paternidade ( $\hat{r}_{p(m)}$ ) foi 0,302 ( $\pm 0,045$ ). A correlação de autofecundação ( $\hat{r}_s$ ) foi igual 0,104 ( $\pm 0,008$ ). A proporção de irmãos completos, meios irmãos e irmãos de autofecundação, considerando todas as famílias maternas foi de 29,4%, 68% e 2,6%, respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5.** Estimativas por família da correlação multiloco de paternidade ( $\hat{r}_{p(m)}$ ), correlação de autofecundação  $\hat{r}_s$ , proporção de irmãos completos ( $\hat{P}_{(IC)}$ ), proporção de meios irmãos ( $\hat{P}_{(MI)}$ ), e proporção de irmãos de autofecundação ( $\hat{P}_{(IA)}$ ) das sementes de *A. crassiflora* provenientes da população natural de Vila Propício, Goiás, Brasil.

Família	$\hat{r}_{p(m)}$	$\hat{r}_s$	$\hat{P}_{(IC)}$	$\hat{P}_{(MI)}$	$\hat{P}_{(IA)}$
Fam01	0,105 ( $\pm 0,011$ )	0,109 ( $\pm 0,000$ )	0,104	0,889	<b>0,007</b>
Fam02	0,156 ( $\pm 0,021$ )	0,105 ( $\pm 0,002$ )	0,147	0,796	0,057
Fam03	0,206 ( $\pm 0,022$ )	<b>0,082</b> ( $\pm 0,011$ )	0,182	0,701	0,117
Fam04	0,412 ( $\pm 0,076$ )	0,093 ( $\pm 0,008$ )	0,393	0,560	0,047
Fam05	0,071 ( $\pm 0,012$ )	0,110 ( $\pm 0,001$ )	0,093	0,891	0,016
Fam06	<b>0,060</b> ( $\pm 0,010$ )	0,109 ( $\pm 0,000$ )	<b>0,088</b>	<b>0,905</b>	<b>0,007</b>
Fam07	0,117 ( $\pm 0,007$ )	0,104 ( $\pm 0,001$ )	0,113	0,854	0,033
Fam08	0,217 ( $\pm 0,033$ )	0,109 ( $\pm 0,000$ )	0,215	0,778	<b>0,007</b>
Fam09	0,141 ( $\pm 0,034$ )	0,105 ( $\pm 0,001$ )	0,325	0,652	0,023
Fam10	0,126 ( $\pm 0,019$ )	0,096 ( $\pm 0,007$ )	0,120	0,836	0,044
Fam11	0,103 ( $\pm 0,011$ )	0,092 ( $\pm 0,007$ )	0,096	0,835	0,069
Fam12	0,200 ( $\pm 0,027$ )	0,093 ( $\pm 0,006$ )	0,168	0,671	<b>0,161</b>
Fam13	0,211 ( $\pm 0,027$ )	0,098 ( $\pm 0,005$ )	0,203	0,760	0,037
Fam14	0,129 ( $\pm 0,018$ )	0,109 ( $\pm 0,000$ )	0,128	0,865	<b>0,007</b>
Fam15	<b>0,627</b> ( $\pm 0,096$ )	0,109 ( $\pm 0,000$ )	<b>0,623</b>	<b>0,370</b>	<b>0,007</b>
Fam16	0,150 ( $\pm 0,025$ )	0,109 ( $\pm 0,000$ )	0,149	0,844	<b>0,007</b>
Fam17	0,133 ( $\pm 0,014$ )	0,101 ( $\pm 0,003$ )	0,130	0,844	0,026
Fam18	0,303 ( $\pm 0,039$ )	0,110 ( $\pm 0,000$ )	0,300	0,689	0,011
Fam19	0,381 ( $\pm 0,065$ )	<b>0,112</b> ( $\pm 0,002$ )	0,373	0,607	0,020
Fam20	0,173 ( $\pm 0,025$ )	0,105 ( $\pm 0,002$ )	0,165	0,790	0,045
Geral	0,302 ( $\pm 0,045$ )	0,104 ( $\pm 0,008$ )	0,294	0,680	0,026

- Em negrito estão destacados os valores maiores e menores de cada estimativa

A estrutura genética dentro das famílias maternas está relacionada com a taxa de cruzamento das árvores. Na família 12 foi observada a maior proporção de irmãos de autofecundação (16,1%), pois a árvore materna 12 foi a matriz com a menor taxa de fecundação cruzada (0,839). A proporção de irmãos completos e meios irmãos, por sua vez, é maior quanto mais elevada é a taxa de fecundação cruzada. Os resultados evidenciam

uma heterogeneidade na composição das progênies oriundas de cruzamento. Na família 15 62,3% das sementes são aparentadas no grau de irmãos completos, enquanto que na família 06, por outro lado, apenas 8,8% das sementes tem esse nível de parentesco. O mesmo pode ser observado em relação aos meios irmãos, em que a proporção variou entre 37%, na família 15 a 90,5% na família 06.

A heterogeneidade da composição das progênies resultantes de cruzamento é função, ainda, da variação da correlação de paternidade. A estimativa desse parâmetro variou entre 0,060 a 0,627. A causa de ocorrência da correlação de paternidade pode ser devido ao comportamento de forrageamento do polinizador. Quando a visitação ocorre com maior frequência entre árvores vizinhas, as sementes tendem a ter os mesmos genitores e serem aparentadas no grau de irmãos completos. Além disso, a correlação de paternidade pode ser resultado do pequeno número de árvores na vizinhança (Sun & Ritland, 1998). A assincronia na floração entre árvores também gera maiores estimativas de  $\hat{r}_{p(m)}$ . Em adição, a baixa densidade da população aumenta a correlação de paternidade, em função da pequena diversificação dos grãos de pólen, que podem ser oriundos de poucas árvores doadoras (Murawski & Hamrick, 1991).

A correlação de autofecundação ( $\hat{r}_s$ ), por sua vez, variou pouco, entre 0,082 e 0,112. Esse parâmetro, além de denotar a probabilidade de ocorrência de uma semente de autofecundação, em uma progênie em que foi encontrada uma outra semente autofecundada, também mede a variação na taxa de fecundação cruzada entre árvores maternas. Quando a estimativa de  $\hat{r}_s$  é igual a um, indica que parte das progênies é formada, exclusivamente, por fecundação cruzada e parte delas por autofecundação (Ritland, 1989b). No presente estudo não houve essa simetria. A fecundação cruzada foi predominante, com ocorrência de pequenas taxas de autofecundação, o que explica a pequena variação na correlação de autofecundação.

De uma maneira geral, as espécies arbóreas tropicais têm mostrado um sistema reprodutivo misto, com prevalência de fecundação cruzada, com taxa superior a 85%. Plantas perenes, com ciclos de vida mais longos tendem a acumular grandes quantidades de mutações somáticas e a autopolinização poderia expor essas mutações deletérias. Assim, a seleção natural poderia ter conduzido essas espécies a uma alta taxa de cruzamento, com

pequena ocorrência de autofecundação (Lande & Schemske, 1985), o que explica o valor encontrado para correlação de autofecundação

### 3.3.3 Fluxo gênico contemporâneo via pólen

Com as análises de paternidade foi possível identificar o genitor paterno de 108 sementes, em um total de 435 (25%) com nível de confiança de 95% (estrito) e de 185 sementes (43%) com nível de confiança de 80% (relaxado). Para os cálculos da distância de dispersão de pólen foi empregado o nível relaxado. A atribuição de paternidade observada foi baixa. O que pode explicar esse fato é a presença de outros fragmentos a distâncias menores que 1 km, da população empregada (Figura 4). Além disso, na ocasião da coleta, foi observado que várias árvores haviam sido derrubadas (Chaves, comunicação pessoal). A área que circunda essa população apresenta atividade agrícola e a derrubada dessas plantas deve estar associada a expansão das áreas de cultivo.



**Figura 4.** Imagem de satélite da população natural de Vila Propício - GO no centro do retângulo tracejado, mostrando os fragmentos próximos nos círculos tracejados. (fonte: Google Maps, 2015).

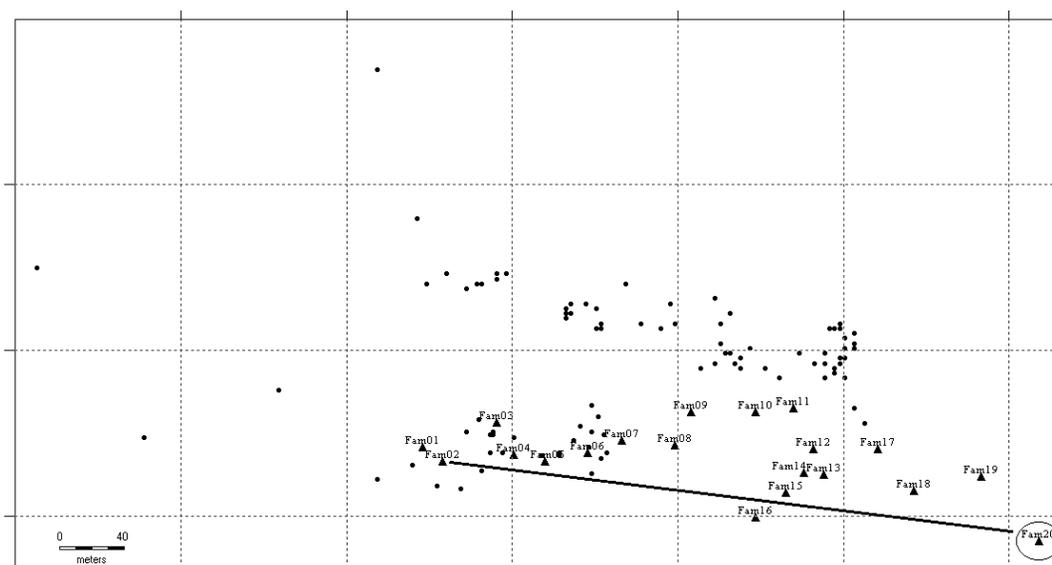
Foi observada em *A. crassiflora* a presença de paternidade múltipla. Em média, as sementes de um fruto apresentaram 2,7 doadores de pólen. Os maiores valores foram observados nas famílias 14 e 15, que apresentaram 6 doadores de pólen, em um único fruto. A paternidade múltipla pode ser gerada, basicamente, de duas maneiras. Primeiro quando múltiplas fontes de pólen são depositadas sequencialmente em uma flor, por vários polinizadores. Outra forma conhecida é quando um polinizador visita várias flores e, na mesma visita, deposita os grãos de pólen de múltiplas fontes, ao mesmo tempo, na flor (Dudash & Ritland, 1991). A importância dessas duas formas de produzir paternidade múltipla está relacionada a um equilíbrio entre a frequência de visita do polinizador e a capacidade dele em carregar pólen de múltiplas fontes (Campbell, 1998).

Em *A. crassiflora*, os insetos polinizadores podem passar muito tempo dentro da câmara floral, assim é esperado que a diversidade de pólen dos besouros seja muito baixa, ou mesmo proveniente da mesma fonte. Cavalcante et al. (2009) relataram, em média, a ocorrência de 2 insetos por flor. Esse valor é compatível com o número médio de doadores de pólen por fruto (2,7), o que indica que o besouro deve carregar pólen de uma, ou poucas fontes. Como as flores das espécies da família Annonaceae apresentam gineceu com muitos carpelos e muitos óvulos por carpelo, portanto muitas sementes por fruto (Simpson, 2006), associado ao comportamento do polinizador, é natural que os frutos sejam formados por pólen proveniente de poucos doadores.

A paternidade múltipla em plantas tem sido discutida à luz da seleção sexual após a polinização. Marshall & Ellstrand (1986) avaliaram a ocorrência de paternidade múltipla em rabanete (*Raphanus sativus*) e mediram se a seleção ocorre por meio da competição entre microgametófitos de diferentes fontes. Para avaliar essa hipótese os autores verificaram se há correlação entre a presença de diferentes doadores de pólen com diferenças de germinação do pólen e crescimento do tubo polínico. Outra hipótese é que a planta matriz investe mais energia em frutos que possuem sementes formadas por microgametófitos de diferentes fontes e menos energia nos frutos com sementes de poucos, ou um único doador de pólen. Para isso os autores avaliaram o efeito da paternidade múltipla nos caracteres dos frutos, como o número de sementes por fruto e peso das sementes. Os autores verificaram que os frutos formados por sementes provenientes de

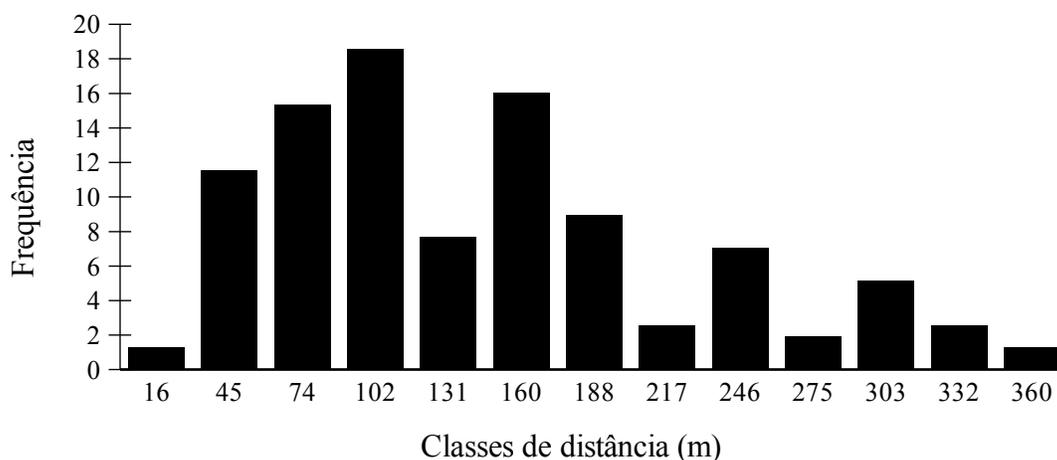
diferentes doadores de pólen apresentavam maior número de sementes e maior peso por semente. Nesse tipo de fruto a competição por recurso entre as sementes é mais intensa. Para o genótipo materno é mais eficiente investir em frutos com paternidade múltipla, pois isso gera uma prole mais variável e pode ocorrer seleção em favor do genótipo materno (Campbell, 1998). Em *A. crassiflora*, na coleta das sementes, foram observados vários frutos “mumificados”, com sementes abortadas. No entanto não é possível afirmar que esses frutos tenham sido formados por pólen de uma única fonte e a planta investiu mais energia na maturação de outros frutos, com sementes formadas por pólen de múltiplas fontes, pois as sementes e frutos do araticunzeiro são suscetíveis ao ataque de diversos patógenos (Braga Filho et al., 2014). Assim, estudos que procurem relacionar os caracteres dos frutos e sementes com a paternidade múltipla se fazem necessários.

O fluxo gênico contemporâneo, mediado por pólen, na população natural de Vila Propício, Estado de Goiás, Brasil atingiu uma distância máxima de 360,7 metros, entre as matrizes da família 20 e família 02 (Figura 5). A menor distância, por sua vez, foi de 16,3 metros, entre as matrizes das famílias vizinhas 14 e 15. A média de ocorrência dos eventos de polinização foi de 131,5 metros.



**Figura 5.** Distância máxima de polinização detectada por meio da análise de paternidade em plantas da espécie *A. crassiflora* pertencentes à população natural de Vila Propício, município de Goiás, Brasil.

O histograma com a distribuição dos eventos de polinização, nas classes de distância indicou que 71% dos casos de polinização ocorreram em até 160 metros (Figura 6). Foi observado ainda que 8% (12) desses eventos realizaram-se entre plantas vizinhas, distantes até 40 metros. A dispersão de pólen a distâncias mais longas ocorre em menor proporção, embora não raro, dada a distribuição observada. 20% dos casos de polinização ocorreram entre plantas que estavam distantes mais de 200 metros, dentre os quais, em 9 deles as plantas estavam a mais de 300 metros. A predominância dos eventos de polinização a curtas distâncias é explicado pelo comportamento do polinizador, o besouro *Cyclocephala* spp. Como explicado anteriormente, os besouros dessa espécie passam a noite nos verticilos florais do araticunzeiro (Gottsberger, 1989b). Assim, é esperado que o besouro, impregnado de pólen, entre em uma flor de uma árvore próxima, que esteja com a fase feminina em atividade, exalando o odor que atrai o inseto. Assim, os eventos de polinização em curtas distâncias são esperados.



**Figura 6.** Histograma dos eventos de dispersão de pólen da espécie *A. crassiflora* na população natural de Vila Propício, Goiás, Brasil.

O comportamento de forrageamento de espécies do gênero *Cyclocephala* foi estudado por Young (1986), durante a observação dos eventos de polinização das flores da espécie *Dieffenbachia longispatha* (Araceae), em uma estação ecológica, em Porto Rico. Por meio de captura, marcação e recaptura de 138 insetos, em vários dias sucessivos, os

autores constaram curtas distâncias de voo, com média igual a 83 metros. Metade dos besouros recapturados voou para as flores femininas mais próximas. Os autores registram, no entanto, distâncias de até 400 metros. Os valores são compatíveis com os resultados encontrados no presente estudo (min: 16,3 m; max: 360,7 m; média: 131,5 m). Um resultado muito interessante obtido Young (1986) foi a recaptura de dois besouros a 1,5 km de distância, que tinham sido observados na noite anterior. Isso mostra que alguns besouros podem percorrer distâncias muito longas. Embora o estudo citado tenha sido conduzido em um ambiente diferente do presente estudo e com outra espécie de planta ele ajuda a explicar, inclusive, a não atribuição da paternidade de algumas sementes, no presente estudo.

A distância do fluxo gênico mediado por pólen, evidenciada no presente estudo, também é consistente com os resultados obtidos por Matsuki et al. (2011). Os autores empregaram a técnica de análise de paternidade com locos SSR, a partir da avaliação genética de um único grão de pólen, aderido ao corpo dos besouros polinizadores da espécie *Magnolia obovata* (Magnoliaceae), proveniente de Ogawa, Japão. O histograma com a distribuição dos eventos de polinização evidenciou que sua maior ocorrência foi observada até 100 metros. A distância máxima observada foi de 1,1 km. Os resultados ressaltam que, apesar do fluxo gênico mediado por pólen, carregado por besouros ocorrer, prioritariamente, a curtas distâncias é possível observar transporte de pólen por distâncias superiores a mil metros, ainda que raramente.

Vale ressaltar que a distância de polinização é fortemente dependente da densidade de polinizadores e de plantas. Em qualquer população de plantas em que a densidade de árvores em estágio reprodutivo é baixa, os polinizadores podem percorrer longas distâncias (Young, 1988a). A densidade de polinizadores do gênero *Cyclocephala*, especificamente, pode variar muito de um ano para o outro. Young (1988b) observou uma variação no número de inflorescências não visitadas da espécie *Dieffenbachia longispatha* (Araceae). Enquanto que em 1982 31% e 1984 38% das inflorescências não tinham sido visitadas, em 1983 foi observada ausência de visitação em apenas 3% delas. Isso indica uma variação na densidade de polinizadores ao longo dos anos, o que causa uma variação na intensidade do fluxo gênico em diferentes anos.

O resultados observados no presente estudo, que evidenciam a ocorrência de fluxo gênico, prioritariamente, em curtas distância, fazem sentido à luz do trabalho desenvolvido por Collevatti et al. (2014). Os autores usaram a mesma população empregada no estudo e mostraram forte estrutura genética espacial, com parentesco entre pares de plantas significativo até 57 metros de distância. Quanto mais restrito é o fluxo gênico, menor é a vizinhança genética e os indivíduos são mais aparentados em distâncias mais curtas (Seoane et al., 2000). Os eventos de dispersão de pólen em distâncias mais longas são raros nessa população de *A. crassiflora*.

### 3.4 CONCLUSÕES

- A população natural de *A. crassiflora* apresenta níveis moderados de diversidade genética;
- Não há endogamia na população de árvores adultas de *A. crassiflora* avaliada;
- As plantas de *A. crassiflora* evidenciaram sistema de reprodução com predominância de alogamia;
- Há pequena diferenciação das frequências alélicas do *pool* de pólen com o conjunto de óvulos na população de *A. crassiflora*;
- Há paternidade múltipla nos frutos de *A. crassiflora*;
- A polinização em *A. crassiflora* ocorre em curtas distâncias, em até 360 metros.

#### 4 ESTRUTURA GENÉTICA EM ESCALA GEOGRÁFICA DE SUBPOPULAÇÕES NATURAIS DE *Annona crassiflora* Mart. NO CERRADO BRASILEIRO.

##### RESUMO

A estrutura genética corresponde ao padrão de organização da variabilidade genética nas populações, em função da atuação de processos evolutivos. Nesse sentido, os marcadores moleculares têm sido usados para avaliar geneticamente populações naturais, revelando padrões e processos evolutivos que ocorrem nelas. Sendo assim, a espécie *Annona crassiflora* Mart. foi escolhida para os estudos de diversidade e estrutura genética de populações, na sua área de ocorrência, no Cerrado brasileiro. Foram utilizadas 25 subpopulações naturais da espécie, totalizando 762 plantas. O DNA foi extraído pelo método CTAB e amplificado via PCR, por seis pares de iniciadores SSR. Inicialmente os locos foram avaliados, quanto a ocorrência de alelos nulos e “dropout”. Em seguida foram avaliados os níveis de polimorfismo nos locos e nas subpopulações naturais, além da diversidade genética ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), estrutura genética ( $\theta$ ) e coeficiente de endogamia da população total ( $F$ ). Foi realizada a análise de agrupamento bayesiano e análise de coordenadas principais (PCoA). O algoritmo de Monmonier foi usado para evidenciar restrições ao fluxo gênico. O Padrão espacial foi avaliado por meio de uma abordagem multivariada, pelo Teste de Mantel e univariada pelo coeficiente I de Moran. Foi realizada ainda, a análise de regressão linear entre as estimativas dos parâmetros genéticos e as duas dimensões espaciais (latitude e longitude). A análise dos locos evidenciou elevado polimorfismo, com um total de 160 alelos. As populações apresentam níveis moderados de ( $0,683$ ) e forte estruturação dessa diversidade ( $\theta = 0,181$ ). Há endogamia, devido a subdivisão ( $F = 0,224$ ), mas não em relação ao sistema de cruzamento na maioria das subpopulações ( $f = 0,047$ ). Os demes formaram dois grupos consistentes, com descontinuidade genética entre as subpopulações do noroeste e sudeste da distribuição da espécie. A diversidade genética ( $r^2 = 0,602$ ) e a

riqueza alélica ( $r^2 = 0,747$ ) mostraram forte relação com a longitude. Os resultados sugerem uma expansão de range na direção sudeste da área de distribuição da espécie.

*Palavras-chave:* araticunzeiro, diversidade genética, marcadores microsatélites

## GEOGRAPHICAL GENETIC STRUCTURE OF NATURAL SUBPOPULATIONS OF *Annona crassiflora* ON BRAZILIAN CERRADO

### ABSTRACT

The genetic structure is the pattern of genetic variability distribution in populations, according on acting of evolutionary processes. In this sense, the molecular markers have been used to evaluate genetically natural populations, expound patterns and evolutionary processes that occur. Therefore, *Annona crassiflora* species was chosen for diversity and population genetic structure studies, throughout its range on Brazilian Cerrado. We used here 25 natural subpopulations of the species, overall 762 individual. We extracted the DNA by CTAB method and amplified by PCR using six pairs of microsatellite primers. Firstly, the locos were evaluated for null alleles and dropout. Then we evaluated the polymorphism levels of the locos and natural subpopulation, further the genetic diversity ( $H_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), inbreeding coefficient within subpopulations ( $f$ ), genetic structure ( $\theta$ ) and inbreeding coefficient overall population ( $F$ ). We performed bayesian cluster and principal coordinates analysis (PcoA). We used the Monmonier algorithm to highlight restrictions to gene flow. The spatial pattern was evaluated by a multivariate approach, using the Mantel test and univariate by the I Moran coefficient. Futher, we performed the linear regression between estimates of genetic parameters and the two spatial dimensions (latitude and longitude). Our results showed high levels of locos polymorphism, with 160 alleles. The populations have moderate levels of genetic diversity (0.683) and strong genetic structure ( $\theta$ : 0,181). There is inbreeding due to subdivision ( $F$ : 0.224), but not in relation to the mating system ( $f$ : 0.047). Natural subpopulations of *A. crassiflora* belongs to two consistent groups. with genetic discontinuity between northwest

and southeast of species distribution. Genetic diversity ( $r^2$ : 0.602) and allelic richness ( $r^2$ : 0.747) showed strong relation with longitude. The results suggest a species range expansion towards the southeast of the plant's distribution area.

*Keywords:* araticunzeiro, genetic diversity, microsatellite markers

## 4.1 INTRODUÇÃO

A estrutura genética corresponde ao padrão de organização da variabilidade genética nas subpopulações. Essa organização se deve aos processos demográficos históricos, responsáveis por moldar as frequências alélicas e promover tanto a diferenciação, quanto a homogeneização da variabilidade genética entre as subpopulações. A ausência de estruturação, por sua vez, indica que não há diferenciação nas frequências alélicas entre os demes e população se comporta como uma unidade panmítica. Além disso, as variáveis ecológicas também afetam a estruturação genética, pois o ambiente determina os locais mais propícios para a ocorrência de determinados genótipos e a seleção natural pode favorecer, ou eliminar esses genótipos (Hamrick, 1989).

Os estudos que evidenciam o padrão de organização dos genótipos são importantes nos esforços correntes de amostragem de indivíduos, com a finalidade de preservar a máxima variabilidade genética possível e subsidiar programas de conservação para diversas espécies. Estudos sobre a estrutura genética das populações permitem ainda evidenciar o modo de reprodução e estrutura familiar e estimar taxas de fluxo gênico acumulados historicamente (Slatkin, 1987). Essas informações também são importantes para auxiliar os programas de domesticação de espécies selvagens, ao apontar áreas promissoras para a coleta de germoplasma, no sentido de amostrar variabilidade e permitir possíveis ganhos genéticos no melhoramento (Cruz et al., 2011).

Os processos microevolutivos, que ocorrem nas populações naturais, em geral se dão dentro de um contexto espacialmente explícito, relacionado com a área de distribuição, ou habitat desses demes. Isso gera uma relação entre os processos temporais e o espaço geográfico. Os padrões espaciais resultam do efeito acumulado da atuação desses processos

ao longo das gerações, sendo possível utilizá-los para compreender a presença e magnitude dessas forças microevolutivas. Uma questão central na análise de padrões espaciais é a conexão entre eles com os fatores espaço-temporais, capazes de gerá-los (Epperson, 2003).

Algumas espécies nativas do Cerrado já foram caracterizadas geneticamente (Collevatti et al., 1999; Diniz Filho & Telles, 2001; Zucchi et al., 2003; Soares et al., 2008; Moura et al., 2009; Collevatti et al., 2014; Barbosa et al., 2015). No entanto, como esse bioma tem sido alvo da agricultura mecanizada, nas últimas décadas, muitas espécies podem ser extintas, antes que sejam conhecidas pela ciência. Dentre as espécies nativas do Cerrado destaca-se a *Annona crassiflora* Mart., conhecida popularmente por marolo, ou araticunzeiro. A planta apresenta porte arbóreo, com tronco geralmente tortuoso, revestido por casca áspera, que resiste à ação do fogo (Souza & Lorenzi, 2008). As populações naturais de *A. crassiflora* ocorrem nas fitofisnomias do bioma Cerrado que incluem o cerradão, cerrado denso, cerrado típico e Cerrado. A distribuição geográfica é ampla, sendo encontrado nos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Pará, Bahia, Piauí, Tocantins, Maranhão e, em remanescentes, no Paraná e em São Paulo (Ratter et al., 2000).

Com relação à biologia reprodutiva, o araticunzeiro forma seus frutos prevalentemente por meio da fecundação cruzada (alógamia prevalente). Esse fato faz com que a espécie seja dependente de agentes polinizadores. O araticum apresenta cantarofilia, sendo polinizado por dois besouros do gênero *Cyclocephala*; *C. atricapilla* Mannerheim e *C. octopunctata* Burmeister. As flores do araticum são hermafroditas e apresentam protoginia (Gottsberger, 1989b; Cavalcante et al., 2009). No Cerrado, a dispersão dos frutos é realizada prioritariamente pela anta (*Tapirus terrestris*). Outros animais podem, ocasionalmente, consumir os frutos, mas elas não constituem dispersores efetivos. Além disso, as características dos locais de defecação do *T. terrestris* e a eliminação das sementes intactas podem favorecer a germinação da planta (Golin et al., 2011).

Alguns estudos genéticos já foram realizados com a espécie *A. crassiflora* Mart. Telles et al. (2003) avaliaram seis subpopulações naturais provenientes do Estado de Goiás com marcadores isoenzimáticos. Os autores encontraram elevados níveis de diversidade genética, mas essa diversidade encontra-se fortemente estruturada. O estudo genético das

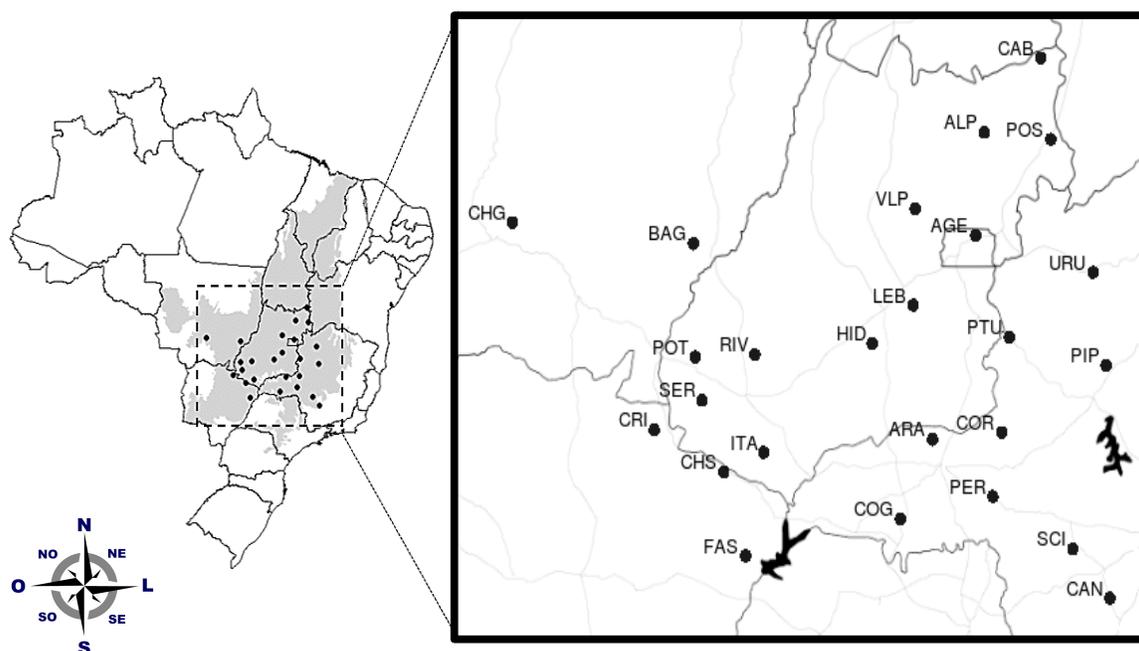
populações naturais de araticunzeiro avançou com o desenvolvimento dos iniciadores de regiões microssatélites por Pereira et al., (2008). Pereira (2007) avaliaram 13 subpopulações do Estado de Goiás e constaram levados índices de diversidade genética, sendo que uma parte significativa dessa diversidade está localizada entre as populações. Por fim, Collevatti et al. (2014) compararam a diversidade e a estrutura genética espacial em duas subpopulações de *Annona crassiflora*, uma em área de conservação e outra em área antropizada. Os autores verificaram que a subpopulação conservada apresentou estrutura genética espacial de baixa magnitude, enquanto que a população antropizada mostrou ajuste ao modelo de isolamento por distância. O trabalho mostra o impacto da antropização sobre a dinâmica evolutiva da espécie.

O objetivo do trabalho foi avaliar o nível de diversidade e estrutura genética espacial de populações naturais de *A. crassiflora* em escala geográfica no Cerrado brasileiro.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Coleta do material vegetal

Para verificar o padrão de estruturação genética foram amostradas vinte e cinco subpopulações de araticunzeiro – *A. crassiflora* Mart., distribuídas na área natural de ocorrência da espécie (Figura 7). Em cada uma das subpopulações foram coletadas folhas de aproximadamente trinta plantas adultas, totalizando 762 indivíduos. As amostras foram acondicionadas em sílica gel e transportadas para o Laboratório de Genética & Biodiversidade, no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás.



**Figura 7** Área de coleta das 25 subpopulações naturais de araticunzeiro – *A. crassiflora* Mart. no Cerrado brasileiro.

#### 4.2.2 Obtenção dos dados

O DNA vegetal foi obtido com base no protocolo CTAB, estabelecido por Doyle & Doyle (1987), descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998), comumente usado para diversas espécies nativas do Cerrado. O procedimento consiste na lise da membrana celular a partir do detergente catiônico CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) e precipitação do DNA em álcool. As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, por meio da técnica de eletroforese em cuba horizontal. As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose a 1%, por meio da técnica de eletroforese em cuba horizontal e coradas com brometo de etídeo. A quantificação foi realizada a partir da comparação visual entre as bandas das amostras com o padrão de peso molecular Fago Lambda da Invitrogen™. O DNA foi diluído com água ultra pura para a concentração de trabalho igual a 1,5ng/μl.

O DNA foi amplificado via reação em cadeia da polimerase (PCR) com seis pares de iniciadores de regiões microssatélites, desenvolvidos por Pereira et al. (2008). Para cada amostra foi preparada uma reação com volume final de 10,5  $\mu$ L composta por: 4,5 ng de DNA, 0,25  $\mu$ M de cada iniciador (*forward e reverse*), 0,25 mM de cada um dos dNTPs, tampão (1 mM Tris-HCl, pH 8,3; 5 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25mg/mL BSA (*Bovine Serum Albumin*), 1 U Taq DNA polimerase da Phoneutria® e água ultra pura q.s.p. O programa de amplificação do termociclador Veriti® da Applied Biosystems® consistiu dos seguintes passos: 1) – desnaturação do DNA a 94°C por cinco minutos; 2°) – 94°C por 1 minuto; 3°) – anelamento do iniciador em temperatura específica por 1 minuto; 4°) – extensão da molécula de DNA pela enzima Taq DNA polimerase a 72°C por 1 minuto; 5°) – 30 ciclos seguindo do 2° ao 4° passo; 6°) – extensão de 7 minutos a 72°C, para finalizar os produtos amplificados.

Foram montados dois sistemas multiplex para a genotipagem no analisador automático de DNA 3500 da Applied Biosystems® (Tabela 6). O loco Acr20 foi analisado separadamente, por possuir mesma amplitude e/ou mesma coloração do Acr01 (multiplex 01) e Acr22 (multiplex 02).

**Tabela 6** Conjunto de iniciadores microssatélites em esquema de genotipagem multiplex, conforme foram empregados para avaliação das 25 subpopulações naturais de araticunzeiro – *A. crassiflora* Mart. no Cerrado brasileiro.

Multiplex	Loco	Fluorocromo
01	Acr01	6FAM
	Acr26	HEX
02	Acr10	6FAM
	Acr19	HEX
	Acr22	6FAM
	Acr20	6FAM

A reação para a eletroforese capilar foi montada para um volume final de 10 $\mu$ L, composta por: 1 $\mu$ L do produto da reação de amplificação, 0,25  $\mu$ L de marcador de peso molecular interno ROX *Size Standard* e 8,75  $\mu$ L de formamida Hi-Di® Applied Biosystems®. Essa solução foi submetida à desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de resfriamento imediato a 0°C por 1 minuto.

Após a obtenção dos genótipos de todas as plantas foi realizada a etapa de checagem e confirmação dos alelos. Para isso foram selecionados três indivíduos portadores de cada alelo, preferencialmente provenientes de diferentes reações de PCRs e eletroforeses e injetados novamente no analisador de fragmentos, lado a lado, do menor alelo para maior. Essa etapa é importante, pois por artefato da própria técnica, quando se lida com locos microssatélites dinucleotídeos um mesmo alelo pode receber um tamanho incorreto, em até dois pares de bases.

### 4.2.3 Análise de dados

Os genótipos foram obtidos por meio da análise dos eletroferogramas no programa GeneMapper® V. 5 da Applied Biosystems®. Os locos microssatélites foram avaliados com o programa Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2004), com o objetivo de identificar possíveis erros de genotipagem, além de verificar a existência de alelos nulos e “dropout”. Esses erros e características dos locos microssatélites podem representar uma fonte importante de viés nas estimativas dos parâmetros genéticos populacionais. As análises foram conduzidas com 1000 permutações. Além disso, foi construído um histograma que mostra a distribuição das frequências alélicas ao longo de todas as subpopulações.

Os locos microssatélites foram avaliados quanto ao nível de polimorfismo, a partir do número de alelos por loco ( $A$ ). Foi estimada, ainda, a diversidade genética média ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e coeficiente de fixação médio intrapopulacional ( $f$ ). Os valores de  $A$ ,  $H_e$  e  $H_o$  foram obtidos por meio do pacote *hierfstat – Estimation and tests of hierarchical F-statistics* (Goudet, 2005), no programa *R*.

A quantificação da magnitude da variabilidade genética presente nas

populações foi realizada a partir da estimativa da riqueza alélica ( $A_r$ ). Esse parâmetro foi usado em substituição ao número de alelos por população. Optou-se por  $A_r$ , pois o número de alelos por subpopulação é fortemente influenciado pelo tamanho da amostra. Como o número de amostras nas subpopulações empregadas no estudo são desbalanceados é interessante usar a rarefação, que calcula o polimorfismo com base na subpopulação com o menor  $n$  amostral, conforme El Mousadik & Petit (1996). A diversidade genética nas subpopulações foi caracterizada a partir das estimativas da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, a partir do estimador da diversidade genética não viesado de Nei (1972). Esse parâmetro é dependente do número de alelos nas subpopulações e suas frequências relativas, independente do sistema reprodutivo. Foi estimado também a heterozigosidade observada nas subpopulações ( $H_o$ ).

A análise de estrutura genética, a partir dos genótipos microssatélites foi executada por meio da análise de variância de frequências alélicas. Esse procedimento consiste na obtenção da estimativa de  $\theta$  a partir dos componentes de variância, que é análogo ao  $F_{ST}$ . Foi estimado também o parâmetro  $F$ , que mede o excesso, ou deficit de homozigotos na população total, desconsiderando a subdivisão, segundo o esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Por fim, foi estimado o índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), que mede o excesso, ou deficit de homozigotos dentro das subpopulações, de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. A significância das estimativas de  $f$  foi obtida usando 3 mil permutações. Os valores de  $p$  foram confrontados com o nível de significância de 5%. A análise de variância foi realizada conforme (Weir & Cockerham 1984).

A estrutura genética das populações também foi avaliada por meio das estatísticas  $R$  ( $R_{IT}$ ,  $R_{IS}$ ,  $R_{ST}$ ), que são análogas aos parâmetros estimados anteriormente. A diferença fundamental é que as estatísticas  $R$  levam em consideração os tamanhos dos alelos, mais que a identidade (por descendência, ou estado). Essas métricas são mais adequadas aos dados provenientes de marcadores moleculares microssatélites, pois foram desenvolvidas para locos que estão sob o modelo de mutação *stepwise* (Slatkin, 1995). Os valores das estatísticas  $R_{ST}$  foram confrontados com os valores de  $\theta$ ;  $R_{IT}$  com  $F$  e  $R_{IS}$  com  $f$ . Sob o modelo de infinitos alelos, as estimativas não diferirão estatisticamente. A

comparação, então, fornece um indício sobre o impacto do modelo mutacional na diferenciação genética das populações (Balloux & Goudet, 2002). A análise foi conduzida com dez mil randomizações no programa SPAGeDi (Hardy & Vekemans, 2002).

Para testar a hipótese de redução recente no tamanho efetivo das subpopulações, em consequência de *bottleneck* foi empregado o Teste de Wilcoxon. Subpopulações que tenham sofrido uma redução recente do tamanho efetivo apresentam um excesso de heterozigotos observados, em relação ao esperado sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg e sob o modelo de mutação-deriva. Assim, o programa BOTTLENECK (Cornuet & Luikart, 1996) foi empregado para calcular, em cada subpopulação a distribuição da heterozigosidade esperada pelo equilíbrio mutação-deriva, de acordo com o número de alelos ( $k$ ), dado o tamanho da amostra ( $n$ ) e comparar com a distribuição da heterozigosidade observada. Esta distribuição é obtida por meio da simulação do processo de coalescência de  $n$  genes, aqui empregando o modelo de mutação *stepwise*.

Em seguida foi realizada a análise de divergência genética. Para essa finalidade foi empregada a estimativa de  $\theta$  entre pares de subpopulações, gerando uma matriz de distância genética. Essa análise foi conduzida na extensão para  $R$  do programa *Arlequin* versão 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Os valores estimados foram usados para calcular o número de migrantes por geração ( $Nm$ ), por meio de um método indireto, em que  $Nm = 1/4(1/\theta - 1)(n - 1/n)$  (Crow & Aoki, 1984).

A matriz de distância resultante foi usada para a construção de uma representação gráfica, por meio da técnica de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). O objetivo é gerar um arranjo ordenado em um gráfico, de modo que a distância entre os sítios visualizados em um espaço bi, ou tridimensional possa representar a distância genética contida na matriz de  $\theta$  par a par, que está em um espaço multidimensional. A seleção da quantidade de eixos significativos, para a representação gráfica foi realizada com base em dois critérios. Primeiro, levando em consideração a distribuição de “broken-stick”, em que os autovalores dos eixos das coordenadas principais foram confrontados com os seus valores respectivos de “broken-stick”. Os eixos significativos são os que apresentam maior porcentagem explicativa da variação total, que a explicação aleatória correspondente, fornecida pelo valor de “broken-stick”. Em segundo lugar, levou-se em

consideração o número de dimensões factíveis de serem visualizadas facilmente. O objetivo da PCoA é reduzir a dimensionalidade dos dados, assim, em um gráfico, a visualização de mais que três dimensões é muito difícil. A análise de PCoA foi conduzida com o pacote *ape - Analyses of Phylogenetics and Evolution* (Paradis et al., 2004), no programa *R*.

Foi realizada, ainda, a análise de agrupamento bayesiano. Nesse procedimento os grupos de indivíduos são formados com base nos genótipos, sem considerar o sítio de coleta como sendo uma subpopulação natural real. Foi empregado o modelo de ancestralidade comum (*admixture*), com alelos correlacionados e  $K$  que variou de um a 25. Para cada valor de  $K$  foram realizadas 30 iterações, 16 mil de *burnin* e 1 milhão de passos do procedimento de Monte Carlo pelas Cadeias de Markov (MCMC). Para estimar o melhor valor de  $K$ , que se ajusta aos dados foi utilizado o método descrito por Evanno et al., (2005). Para realização das análises foi usado o programa *Structure* e *Structure Harvester* (Earl & VonHoldt, 2012).

As subpopulações foram visualizadas como pontos conectados com a Rede, ou Grafo de Gabriel, sobre o mapa do Brasil, com a área delimitada do Cerrado. A Rede de Gabriel é um diagrama usado para expressar a conectividade entre os pontos, ou subpopulações, de acordo com um algoritmo geométrico. Dois pontos são considerados conectados se a circunferência traçada sobre eles não incluir um terceiro ponto. O método foi introduzido por Gabriel & Sokal (1969) como sendo uma simplificação da Triangulação de Delaunay. Ao conjunto foi atribuída a primeira coordenada principal da PCoA, com o objetivo de evidenciar a direção da maior parte da variação genética, em um contexto geográfico. A matriz de distância genética de  $\theta$  par a par também foi empregada para a análise de descontinuidade genética, com o algoritmo de Monmonier. O método identifica nas arestas do Grafo de Gabriel os pontos de maior divergência genética, sinalizando áreas de quebra, ou restrição do fluxo gênico. No presente trabalho, o valor limiar usado como ponto de maior divergência genética foi de 0,08. As análises foram conduzidas no pacote *adegenet* (Jombart, 2008), no programa *R*.

O padrão espacial da variabilidade genética foi avaliado por meio do teste de mantel, que corresponde a correlação entre as matrizes de distância genética ( $\theta$  par a par) e a matriz de distância geográfica. Foi empregado ainda, o correlograma de Mantel, que

realiza o mesmo procedimento, estratificando a distância geográfica em várias classes de distância e testando a significância da correlação em cada uma das 10 classes de distância. Ambos os procedimentos foram realizados com dez mil randomizações com o pacote *vegan - Community Ecology Package: Ordination, Diversity and Dissimilarities* (Oksanen et al., 2015), no programa *R*.

Foi usado, ainda, o coeficiente *I* de Moran, para avaliar o padrão espacial da variabilidade genética. Enquanto o teste de Mantel corresponde a um procedimento multivariado, o *I* de Moran foi usado de modo univariado, mensurando a magnitude da autocorrelação das frequências alélicas ao longo das subpopulações, em que cada alelo representa uma variável, gerando um correlograma diferente para cada um deles. Foram utilizadas oito classes de distância, de modo a distribuir uniformemente o número de subpopulações em cada classe. Cada análise foi conduzida com mil permutações no programa *SAM – Spatial Analysis in Macroecology* (Rangel et al., 2006). Os resultados foram sumarizados e descritos com base na média e desvio-padrão dos valores de *I* de Moran, por loco. Essa abordagem foi adotada para representar uma possível heterogeneidade na autocorrelação espacial, captada por diferentes locos e comparar com os resultados obtidos no teste de Mantel.

Para avaliar o padrão espacial também foi utilizada a análise de regressão linear simples entre os parâmetros genéticos, que incluem: a diversidade genética ( $H_e$ ), a riqueza alélica ( $Ar$ ) e o coeficiente de fixação intrapopulacional ( $f$ ) e as duas dimensões espaciais, separadamente; latitude e longitude. As estimativas dos parâmetros genéticos foram plotadas na rede de Gabriel, para melhor visualização da variação geográfica. As análises foram realizadas com o pacote estatístico básico do programa *R* (R Core Team, 2014).

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O nível de polimorfismo dos locos microssatélites observado no presente estudo foi elevado. O número de alelos por loco variou de 14 (Acr10) a 47 (Acr01), com média de 26,67 e total de 160 alelos. Todos os alelos foram confirmados com a escada alélica. A diversidade genética ( $H_e$ ) variou de 0,519 (Acr10) a 0,809 (Acr01), com média igual a 0,683. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou entre 0,738 (Acr19) a 0,489 (Acr10). Os desvios dos valores de  $H_o$  em relação ao esperado sob equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ) foram pequenos (exceto para o loco Acr01), o que resultou em estimativas de  $f$  de baixa magnitude, que variou entre -0,009 (Acr26) e 0,123 (Acr01). (Tabela 7).

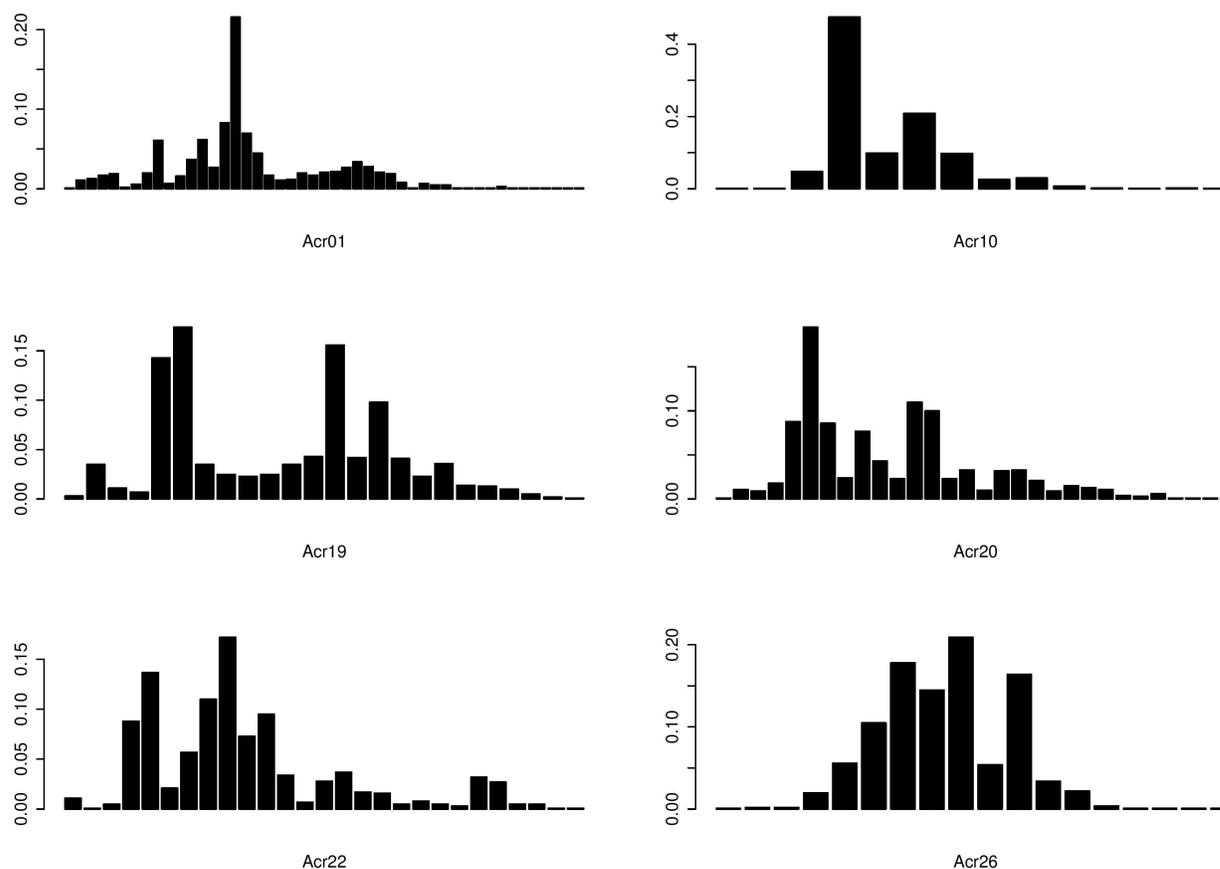
**Tabela 7.** Número de alelos por loco ( $A$ ), diversidade genética ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), coeficiente de endogamia ( $f$ ) estimados com base em seis locos SSR de *A. crassiflora*.

Loco	$A$	$H_e$	$H_o$	$f$
Acr01	47	0,809	0,709	0,123
Acr10	<b>14</b>	0,519	0,489	0,059
Acr19	24	0,755	0,738	0,024
Acr20	30	0,774	0,720	0,070
Acr22	27	0,750	0,726	0,032
Acr26	18	0,709	0,715	-0,009
<b>Média</b>	<b>26,67</b>	<b>0,719</b>	<b>0,683</b>	<b>0,050</b>

O nível de polimorfismo elevado é comum em regiões microssatélites, dado a elevada taxa de mutação. Em outros estudos previamente conduzidos com a espécie também foram observados níveis elevados de variabilidade genética. Pereira et al. (2008) obtiveram, em média, 19,3 alelos por loco em uma única população natural de *A. crassiflora*, a partir de 10 pares de iniciadores SSR. Em outro estudo conduzido com duas populações naturais, Collevatti et al. (2014) observaram uma média de 21 alelos por loco, valores próximos aos observados no presente trabalho.

O histograma com as frequências alélicas médias por loco mostrou distribuições irregulares, desde bimodal (Acr10) a multimodal (Acr20) (Figura 8). Esse formato irregular é característico de locos SSR, que frequentemente exibem distribuições

bimodais e trimodais. Além disso, mostram diferenciação no formato das distribuições entre diferentes locos (Valdes et al., 1993). Nesse caso, há predominância na frequência de um alelo em detrimento dos outros. Os formatos observados são consistentes com os modelos de mutação Two Phase e *stepwise*.



**Figura 8.** Distribuição das frequências alélicas nos seis pares de iniciadores SSR provenientes da genotipagem de 25 subpopulações naturais de *A. crassiflora* Mart. no Cerrado brasileiro

Foi identificada a presença de alelos nulos em todos os locos microssatélites usados, os valores variaram entre 0,101 (Acr26) a 0,204 (Acr10). Por outro lado, não foi identificada evidência de “dropout” nos genótipos. Vale ressaltar, no entanto, que metade

dos locos utilizados (Acr19, Acr22 e Acr26) apresentou evidência de alelos nulos em apenas uma subpopulação e o Acr10 em apenas duas. O loco que apresentou a maior frequência de alelos nulos foi o Acr01, que mostrou evidência em dez subpopulações, das quais, em seis delas a frequência é baixa, sendo menor que 0,1 (Tabela 8).

**Tabela 8.** Frequência de alelos nulos estimada pelo método Brookfield em seis locos SSR e 25 subpopulações naturais de *A. crassiflora*, provenientes do Cerrado brasileiro.

Loco	População	Frequência de alelos nulos
Acr01	ITA	0,088
	RIV	0,107
	SER	0,072
	CHG	0,054
	BAG	0,045
	LEB	0,254
	PER	0,072
	CAN	0,183
	POS	0,180
	PTU	0,076
Acr10	CHS	0,161
	ITA	0,246
Acr19	CHG	0,111
Acr20	CHG	0,102
	PIP	0,141
	SCI	0,082
	BAG	0,047
	CAN	0,153
Acr22	ARA	0,160
Acr26	POT	0,101

Os alelos nulos surgem quando o sítio de anelamento do iniciador sofre mutação. Assim, a frequência observada desse alelo é menor que o esperado sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois o iniciador não consegue parear com a região que flanqueia o motivo SSR, o que impede a amplificação via PCR. Embora essas sequências flanqueadoras sejam conservadas dentro da espécie e, muitas vezes, entre espécies diferentes dentro do mesmo gênero, ou ainda gêneros diferentes de uma família, estudos de sequenciamento evidenciam que as mutações nessas regiões ocorrem em taxas que não podem ser negligenciadas. O processo de mutação nas regiões microsatélites é mais

diversificado que o envolvido na simples variação do número de motivos de repetição, ela pode afetar, embora em menor frequência, os flancos (Grimaldi & Crouau-Roy, 1997).

Os alelos nulos são mais comuns em subpopulações de tamanho efetivo grande e altas taxas de mutação nas regiões que flanqueiam a região microssatélite. Eles também podem ser encontrados em frequências elevadas, quando os indivíduos usados no desenvolvimento dos iniciadores apresentavam mutações nos flancos do loco microssatélite. Assim, nas outras subpopulações, com flancos do tipo selvagem, os alelos não seriam amplificados. A presença de alelos nulos pode impactar nas estimativas de estrutura e distância genética, superestimando os valores de  $F_{ST}$  e análogos. Embora existam algoritmos para estimar a frequência de alelos nulos, estudos de simulação mostram que os vieses nas estimativas são maiores após aplicada a correção, quando o fluxo gênico é restrito (Chapuis & Estoup, 2007).

Os alelos nulos podem estar relacionados, ainda, com a presença de elementos transponíveis, no genoma da espécie. Esses elementos do genoma podem afetar as regiões de anelamento do iniciador, impedindo a amplificação via PCR do alelo daquele loco (Megléczy et al., 2007). Vários trabalhos mostram a associação desses elementos com as regiões microssatélites, em diferentes espécies de plantas (SanMiguel et al., 1996; Ramsay et al., 1999; Akagi et al., 2001). A presença de alelos nulos tem sido reportada como problemática, por conta do viés nas estimativas de diferenciação genética (Chapuis & Estoup, 2007), no entanto eles fazem parte da composição das subpopulações, remontando à sua história evolutiva. Eles podem fornecer indícios sobre a ocorrência de elementos transponíveis nessas regiões, por exemplo. Assim, essas subpopulações podem ser apontadas como promissoras para estudos mais aprofundados de genômica de populações.

Com relação a variabilidade e diversidade genética nas subpopulações, as estimativas da riqueza alélica variaram de 4,759 (URU) a 9,577 (CRI), com média igual a 6,892. A diversidade genética, representada pela heterozigosidade esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg variou de 0,519 (URU) a 0,830 (CHG), com média igual a 0,719. A estimativa de  $H_e$  é função das frequências alélicas e do polimorfismo nas subpopulações. Quando as frequências apresentam valores mais equilibrados, a diversidade genética é mais elevada (Hartl & Clark, 2010). A heterozigosidade observada ( $H_o$ ), por sua vez, variou

entre 0,495 (CAN) e 0,820 (RIV) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a riqueza alélica ( $A_r$ ), a diversidade genética ( $H_e$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e o índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), obtidos da genotipagem de seis pares de locos SSR em 25 subpopulações naturais de *A. crassiflora* provenientes do Cerrado brasileiro.

Subpopulações	$n$	$A_r$	$H_e$	$H_o$	$f$
CHS	32	8,383	0,834	0,799	0,048
ITA	32	7,483	0,779	0,682	0,123*
RIV	32	8,909	0,819	<b>0,820</b>	-0,013
SER	32	8,680	0,831	0,796	0,039
CHG	20	9,111	<b>0,830</b>	0,743	0,094*
CRI	32	<b>9,577</b>	0,823	0,782	0,057*
HID	15	5,990	0,750	0,763	-0,013
PIP	32	5,751	0,667	0,627	0,058
POT	33	8,118	0,821	0,732	0,110*
SCI	35	5,136	0,708	0,711	-0,003
BAG	35	8,532	0,744	0,695	0,068*
COR	22	5,075	0,636	0,621	0,003
LEB	31	6,945	0,704	0,611	0,099*
ARA	32	6,908	0,756	0,711	0,081
COG	32	7,878	0,751	0,766	-0,008
PER	32	7,590	0,771	0,734	0,060
CAN	32	5,545	0,603	<b>0,495</b>	<b>0,158*</b>
VLP	32	5,377	0,634	0,611	0,040
AGE	32	6,217	0,734	0,733	-0,005
POS	32	5,588	0,673	0,596	0,106*
PTU	32	6,538	0,664	0,634	0,041
ALP	32	5,958	0,669	0,672	-0,009
CAB	32	5,240	0,577	0,535	0,056
FAS	30	7,010	0,693	0,678	0,011
URU	32	<b>4,759</b>	<b>0,519</b>	0,524	<b>-0,018</b>
<b>Média</b>	<b>30.6</b>	<b>6,892</b>	<b>0,719</b>	0,683	<b>0,047</b>

\*significativo a 5% de significância

- Em negrito os valores maiores e menores de cada estimativa

Os resultados estão em conformidade com outros trabalhos realizados com a espécie, mesmo com diferentes tipos de marcadores moleculares. Blanco et al, (2007) evidenciaram elevada diversidade de haplótipos (0,875), usando análise de fragmentos do DNA cloroplastidial, provenientes de dez subpopulações naturais de *A. crassiflora*. Telles et al. (2003) também obtiveram um valor médio de  $H_e$  elevado (0,357), com base em locos isoenzimáticos e seis subpopulações naturais. O índice de fixação

intrapopulacional variou de -0,018 (URU) a 0,158 (CAN), com média igual a 0,047. Oito subpopulações, das 25 amostradas, evidenciaram valores de  $f$  significativos, a 5% de significância. A estimativa de  $f$  indica desvios da heterozigosidade observada em relação à diversidade genética. Os valores positivos e significativos evidenciados mostram que há excesso de homozigotos nessas subpopulações, o que ocorre em função do cruzamento entre indivíduos aparentados, ou endocruzamento. Na maior parte das subpopulações amostradas (17), no entanto, não foram detectados desvios significativos das frequências genotípicas, das condições esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que resulta em estimativas nulas de  $f$ . Resultados semelhantes tinham sido encontrados por Telles et al. (2003), que não evidenciaram valores significativos nos coeficientes de endogamia em seis subpopulações de *A. crassiflora*.

Com relação ao teste de hipótese para ausência de *bottleneck* nas subpopulações naturais de *A. crassiflora*, os valores de  $p$ , obtidos pela aplicação do teste de Wilcoxon variaram de 0,344 a 1,000. Isso indica que sob o modelo *stepwise* de mutação e considerando ainda o equilíbrio mutação-deriva, não foi possível observar evidências de redução recente no tamanho efetivo das subpopulações, com base no excesso de heterozigotos. Resultados semelhantes foram observados por Collevatti et al. (2014), que da mesma forma, não identificaram a ocorrência de *bottleneck* em duas subpopulações naturais de *A. crassiflora*, tanto medindo o excesso de heterozigotos, quanto com base na análise de coalescência.

A estimativa do valor global de  $\theta$  foi de 0,181. O índice mede o grau de estruturação genética das subpopulações naturais, com base na variância das frequências alélicas. A restrição do fluxo gênico entre os demes leva a uma progressiva diferenciação das subpopulações pela atuação da deriva genética, o que aumenta a estruturação. O valor obtido no presente estudo indica que 18,1% da diversidade genética encontra-se no componente interpopulacional. A estimativa de  $\theta$ , obtida aqui é muito semelhante ao grau de estruturação genética observada por Telles et al. (2003) com isoenzimas, que obtiveram um valor global de  $G_{ST}$  igual a 0,187, empregando seis populações de *A. crassiflora*. Esse nível de diferenciação genética é considera forte (entre 0,150 a 0,250), de acordo com Wright (1978). Um resultado oposto foi obtido por Blanco et al. (2007) com a análise de

fragmentos de DNA cloroplastidial, que tem herança uniparental. Nesse trabalho, a diferenciação genética entre as subpopulações foi baixa, igual a 0,073.

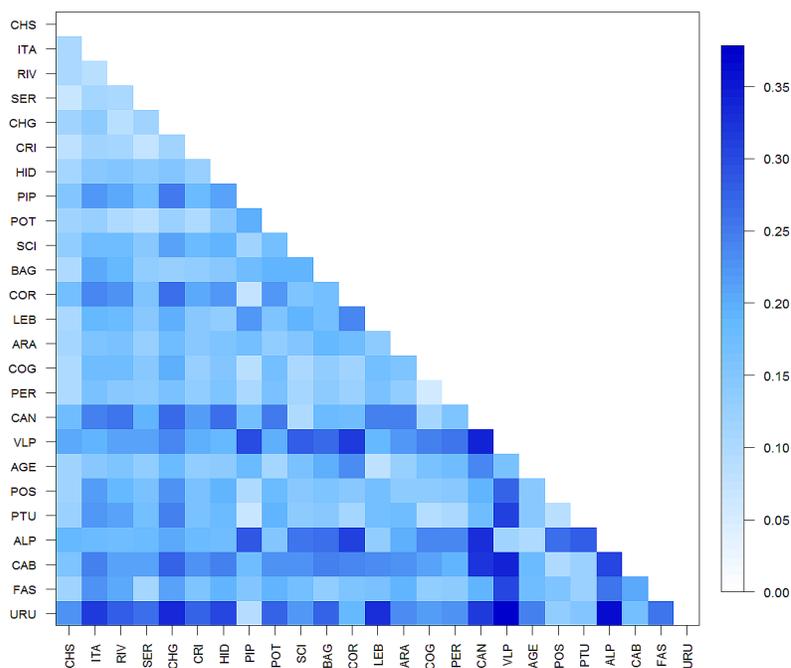
A estimativa de  $F$ , que quantifica a endogamia que surge em função da subdivisão da população total, em demes foi igual a 0,224. Além de aumentar a diferenciação das subpoulações, a deriva genética também aumenta o nível de homozigose, que é refletido nas estimas de  $F$ . Ainda que a maioria das subpopulações estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, elas podem ser consideradas unidades panmíticas, há endogamia na população total, pois os indivíduos de uma subpopulação cruzam com maior frequência entre si, que entre indivíduos de subpopulações diferentes. Assim, a população total não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois há diferenciação nas frequências alélicas ( $\theta$ ) e endogamia devido à subdivisão ( $F$ ). Os intervalos de confiança para as duas estimavas não incluem o zero ( $\theta_{Lim.Inf} = 0,150$  e  $\theta_{Lim.Sup} = 0,222$ ;  $F_{lim.Inf} = 0,193$  e  $F_{lim.Sup} = 0,268$ ), o que indica que esses valores diferem estatisticamente de zero e, portanto, são significativos.

O teste para hipótese de igualdade dos valores de  $\theta$  e  $R_{ST}$  mostrou que a diferenciação é significativa a 5% de significância (valor de  $p = 0,0173$ ). Da mesma forma, há diferenciação entre os valores de  $f$  e  $R_{IS}$  (valor de  $p < 0,001$ ) e  $F$  e  $R_{IT}$  (valor de  $p < 0,001$ ). As estatísticas  $R$  levam em consideração o modelo de mutação “stepwise” (SMM), enquanto que os índices  $\theta$ ,  $f$  e  $F$  consideram o modelo de infinitos alelos (IAM). Quando os valores das estatísticas  $R$  excedem em magnitude os valores  $\theta$ ,  $f$  e  $F$  e as distribuições das frequências alélicas mostram um comportamento irregular, multimodal (Figura 8), é um indicativo que os locos SRR estão evoluindo segundo o modelo SMM e não IAM. No presente estudo, o valor global de  $R_{ST}$  foi igual a 0,226,  $R_{IS}$  igual a 0,181 e  $R_{IT}$  de 0,367.

Embora os valores das estatísticas  $R$  sejam, em magnitude, maiores que os valores de  $\theta$ ,  $f$  e  $F$  é preciso ser cauteloso na adoção das estimativas de  $R$ . No presente estudo as conclusões não seriam tão diferentes, pois ( $\theta = 0,181$  e  $R_{ST} = 0,226$ ) ambos representam um grau de estruturação considerado forte, de acordo com Wright (1978). Além disso, as estimativas de  $R_{ST}$ , apesar de mais adequadas ao processo de mutação SMM, quando a evolução dos locos SRR desviam de um modelo SMM perfeito, o viés sobre a estimativa de  $R_{ST}$  é elevado. Adicionalmente, a variância da  $R_{ST}$  e de vários outros

parâmetros baseados no tamanho do alelo são mais elevadas, que dos parâmetros baseados na identidade do alelo, como o caso de  $\theta$ . Dados de simulação sugerem, ainda, que as estimativas de fluxo gênico histórico, baseadas no  $R_{ST}$  resultam em valores de  $Nm$  (número de migrantes por geração) com maiores erros associados, quando comparado ao uso do  $\theta$  para essa finalidade (Balloux & Goudet, 2002). Por exemplo, no presente estudo as estimativas de  $R_{ST}$  par a par, que deveriam variar de 0 a 1 variou de -0,002 (LEB-ALP) a 1,187 (SER-CHG).

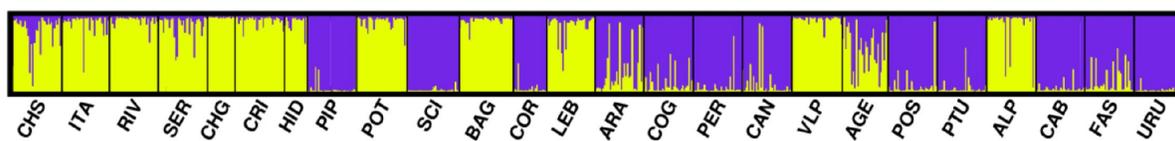
A análise de distância genética, baseada na estimativa de  $\theta$  entre pares de subpopulações evidenciou que a maior divergência é encontrada entre os demes URU e VLP (0,370) (Figura 9). Consequentemente são as que possuem a menor taxa de *fluxo* gênico histórico, representada pela estimativa do número de migrantes por geração, que foi menor que 1 (0,41). A menor divergência genética encontrada *foi entre* as subpopulações PER e COG (0,054) e, portanto, a maior taxa de fluxo gênico (4,17). Os pares de demes VLP-CAN, CAB-VLP e URU-ALP também apresentam menos que 1 “migrante” por geração. Os outros pares de subpopulações exibem, pelo menos  $Nm$  igual a 1.



**Figura 9.** Matriz de distância genética genética de  $\theta$  entre os 25 pares de subpopulações de *A. crassiflora* no Cerrado brasileiro

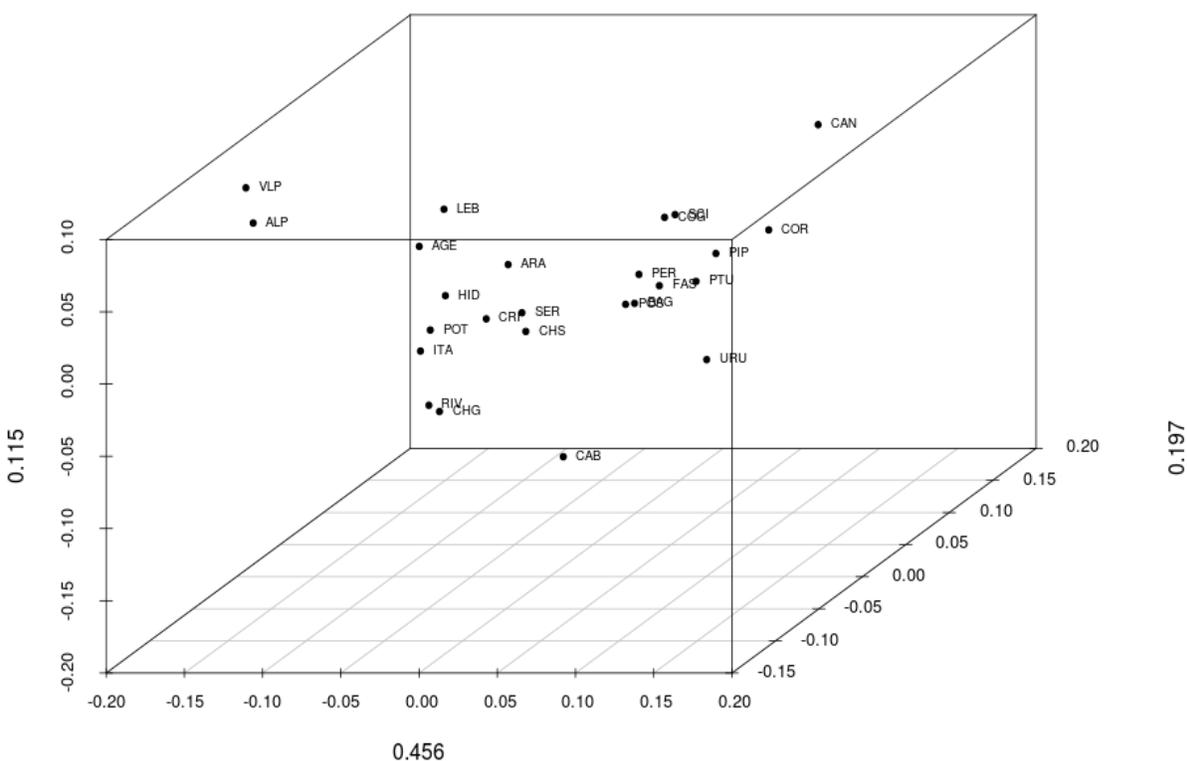
O fluxo gênico tem efeito oposto à deriva genética, quanto maior o número de migrantes por geração, menor a diferenciação genética. Uma pequena taxa de fluxo gênico é suficiente para homogeneizar as frequências alélicas e reduzir drasticamente a divergência entre os demes. Sob o modelo de ilhas, um único “migrante” por geração, por exemplo, diminui a diferenciação de  $\theta$  para 0,20. Entretanto, vale ressaltar que a medida de divergência genética baseada na variância das frequências alélicas ( $\theta$ ) é afetada por alelos que apresentam frequências intermediárias nas subpopulações. A presença de alelos privados tem pouco efeito nas estimativas de  $\theta$ . Por conta de sua frequência baixa, dificilmente esses alelos serão incluídos nos “migrantes”, a menos que a taxa de fluxo gênico seja muito alta. Alelos privados tendem a ficar em suas subpopulações de origem, até que sua frequência aumente o suficiente para que sejam dispersos (Hartl & Clark, 2010).

O agrupamento Bayesiano, resultante da análise no programa *Strucutre* e do uso do método de Evanno et al., (2005) mostram a formação de dois grupos consistentes. O valor de  $\Delta k$  foi igual a 428,155. Os indivíduos são alocados nos grupos de acordo com seus genótipos e as frequências alélicas dos grupos, de modo a maximizar a diferenciação entre eles. A distância genética entre os grupos é de 0,077. A diversidade genética ( $H_e$ ) no grupo amarelo é de 0,888 e no grupo roxo é 0,775. Os valores de  $F_{ST}$  entre as subpopulações dentro do grupo amarelo é de 0,017 e no grupo roxo é de 0,085. É possível notar, por meio do gráfico de barras (Figura 10), que todas as subpopulações apresentaram mistura (*admixture*) de indivíduos dos dois grupos. Essa mistura é maior nas subpopulações CHS, ARA e AGE, que apresentam, respectivamente 79%, 26% e 55% dos indivíduos sendo pertencentes ao grupo amarelo.



**Figura 10.** Agrupamento Bayesiano resultante do programa *Structure*, mostrando os dois grupos formados a partir da análise genética de 25 subpopulações de *Annona crassiflora* no Cerrado brasileiro.

Com relação à análise de coordenadas principais (PCoA), foi possível observar que as três primeiras coordenadas, explicam, juntas 76,8% da variação contida na matriz de distância genética ( $\theta$  par a par). A primeira coordenada, sozinha, explica 45,6%, enquanto que a segunda explica 19,7% e a terceira 11,5% (Figura 11).

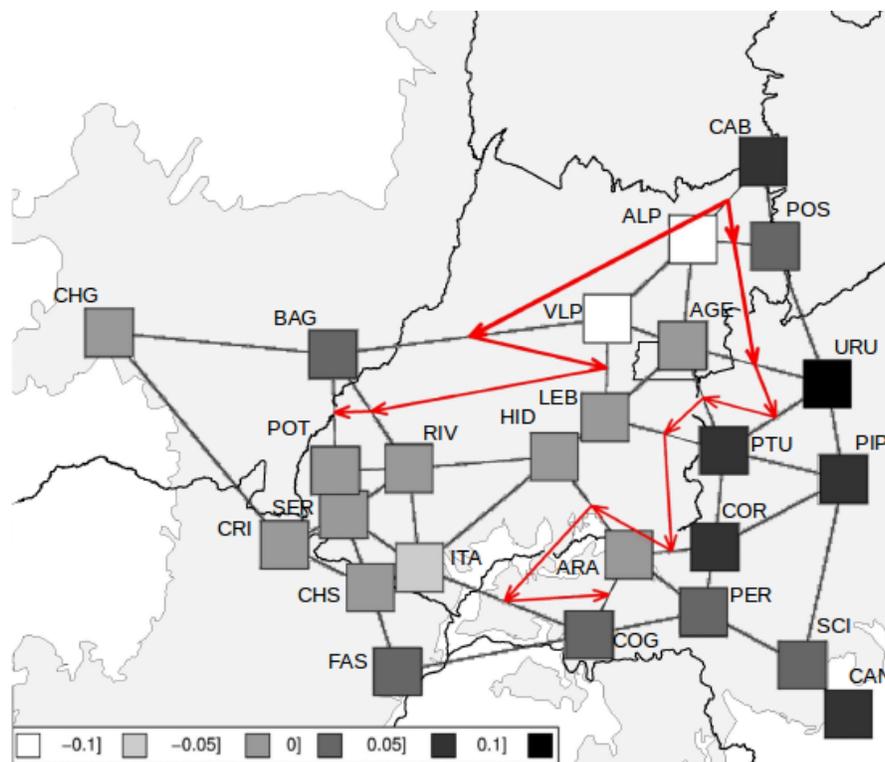


**Figura 11.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) a partir da matriz de distância genética ( $\theta$  par a par), mostrando as três primeiras coordenadas principais resultante da avaliação genética de 25 subpopulações naturais de *Annona crassiflora* no Cerrado brasileiro.

O padrão ordenado pela PCoA é praticamente o mesmo evidenciado pelo agrupamento bayesiano do programa *Strucutre*. A análise também mostrou a formação de dois grupos principais. A inclusão da terceira dimensão, no entanto, mostrou que as subpopulações VLP e ALP se afastam de um dos grupos, assim como CAB, enquanto que

CAN se afasta do segundo grupo. Das 25 subpopulações, nos dois métodos houve 21 concordâncias. Nos casos de discordância, as subpopulações AGE e ARA apresentaram mistura (*admixture*) de indivíduos, o que explica a discrepância entre os dois métodos.

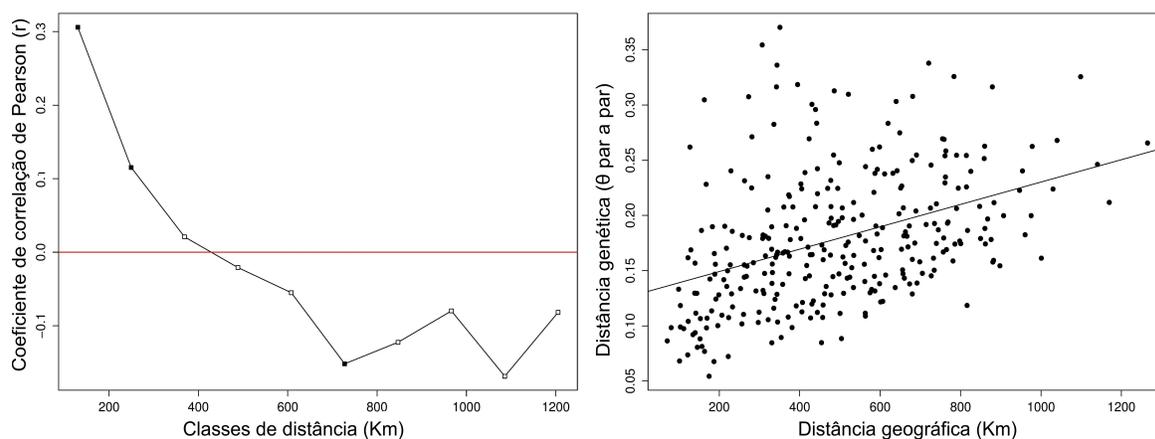
A análise de descontinuidade genética, com base no algoritmo de Monmonier evidenciou a separação dos demes a sudeste da distribuição, representadas pelas subpopulações pertencentes ao grupo “roxo” do gráfico de barras do *Strucutre* e as subpopulações a noroeste, que fazem parte do grupo “amarelo”. A exceção foi BAG, que está localizada na região noroeste, mas foi agrupada pela PCoA junto com as subpopulações do sudeste. O algoritmo de Monmonier demarcou a aresta desse deme, demonstrando que há descontinuidade genética em relação às outras subpopulações da região noroeste (Figura 12).



**Figura 12.** Algoritmo de Monmonier aplicado nas arestas da Rede de Gabriel evidenciando a primeira coordenada principal do  $\theta$  par a par, com o objetivo de mostrar a descontinuidade genética nas subpopulações de *Annona crassiflora* no Cerrado brasileiro.

As subpopulações localizados a noroeste da distribuição dos sítios de coleta em relação ao grupo localizado a sudeste. Adicionalmente é possível verificar, com base no  $r^2$  da análise de regressão linear da primeira coordenada principal (explica 45,6% da diferenciação entre as subpopulações) com a longitude ( $r^2 = 0,257$ ; valor de  $p = 0,009$ ), que existe um aumento na divergência genética entre as subpopulações no sentido oeste-leste. Esses resultados corroboram com a descontinuidade revelada pelo algoritmo de Monmonier.

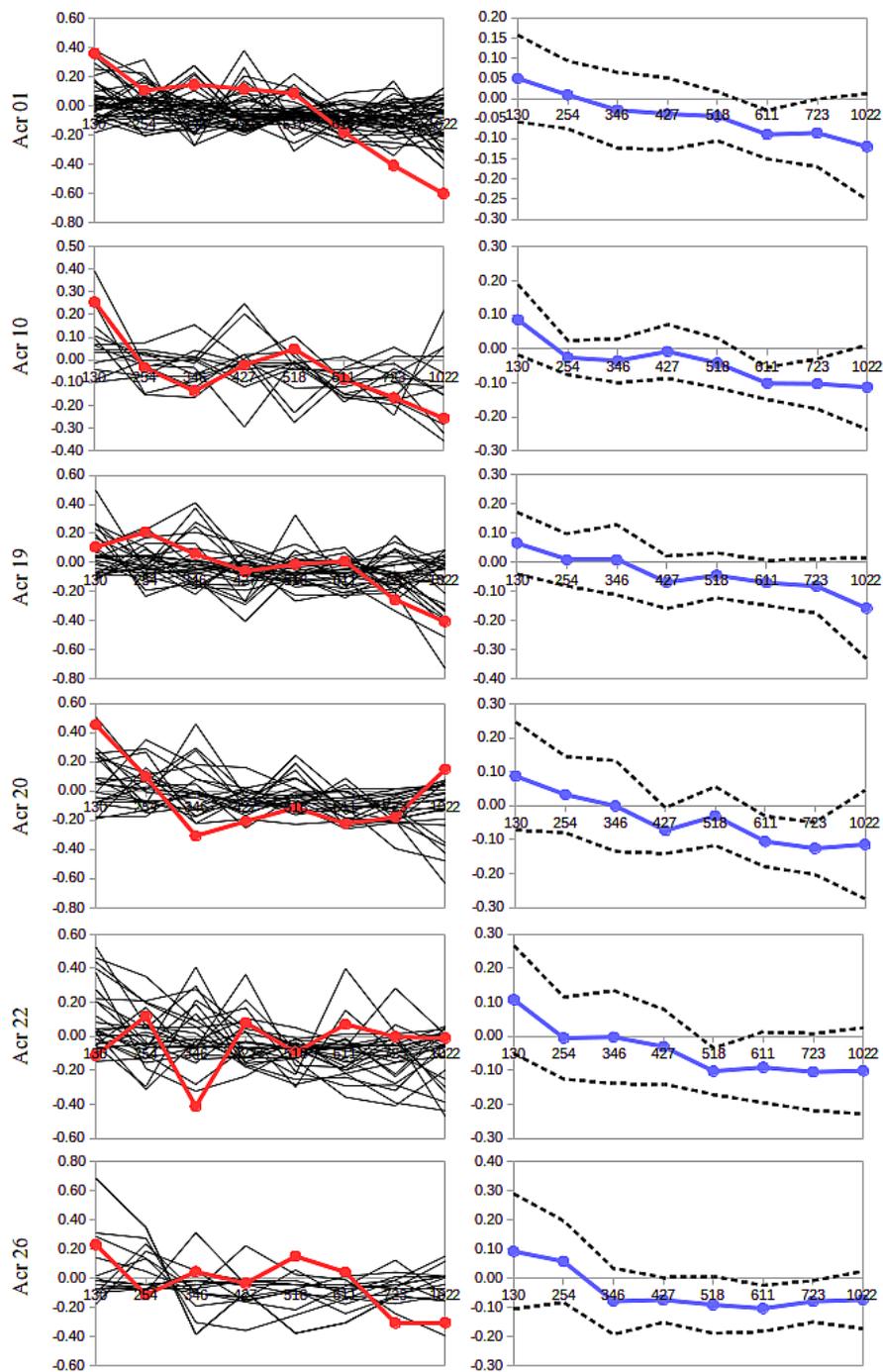
O teste de Mantel evidenciou uma correlação de baixa magnitude, porém significativa entre a distância genética e geográfica ( $r = 0,405$ ; valor de  $p < 0,001$ ). De uma maneira geral, a distância espacial entre os demes explica 16,40% da diferenciação genética. O teste realizado em classes de distância mostrou que a relação é significativa na primeira ( $r = 0,306$ ; valor de  $p < 0,001$ ), segunda ( $r = 0,115$ ; valor de  $p = 0,026$ ) e sexta classes ( $r = -0,152$ ; valor de  $p = 0,042$ ). O diagrama de dispersão mostra, ainda, que o decaimento da similaridade genética, com o aumento da distância geográfica ocorre linearmente.



**Figura 13.** Correlograma de Mantel e diagrama de dispersão entre a matriz de distância genética e geográfica das 25 subpopulações de *A. crassiflora* no Cerrado brasileiro.

Isso indica que as populações mais próximas, espacialmente, também são mais semelhantes geneticamente, até 250 km. Após essa distância, a diferenciação genética não pode ser explicada pela distância geográfica. A relação passa a existir novamente em 600 km de distância, no entanto com valor de  $r$  negativo e de baixa magnitude. Após 800 km a relação deixa de ser significativa novamente.

Os valores do coeficiente I de Moran variaram, no loco Acr01 de 0,393 a -0,137 ( $0,028 \pm 0,087$ ), no loco Acr10 de 0,157 a -0,096 ( $0,013 \pm 0,057$ ), Acr19 de 0,333 a -0,096 ( $0,049 \pm 0,092$ ), Acr20 de 0,186 a -0,117 ( $0,029 \pm 0,064$ ), Acr22 de 0,385 a -0,086 ( $0,059 \pm 0,103$ ) e Acr26 de 0,378 a -0,052 ( $0,041 \pm 0,095$ ). Os correlogramas médios de todos os locos mostram um decaimento na autocorrelação espacial na primeira classe de distância, até 254 km, para valores de I de Moran próximos a zero (Figura 14).



**Figura 14.** Correlograma de Moran univariado mostrando a autocorrelação espacial nas frequências alélicas. Na esquerda os valores de I de Moran para cada alelo, em vermelho o correlograma do alelo mais frequente e na direita o correlograma médio por loco com o desvio padrão resultante da análise genética de 25 subpopulações naturais de *Annona crassiflora* no Cerrado brasileiro

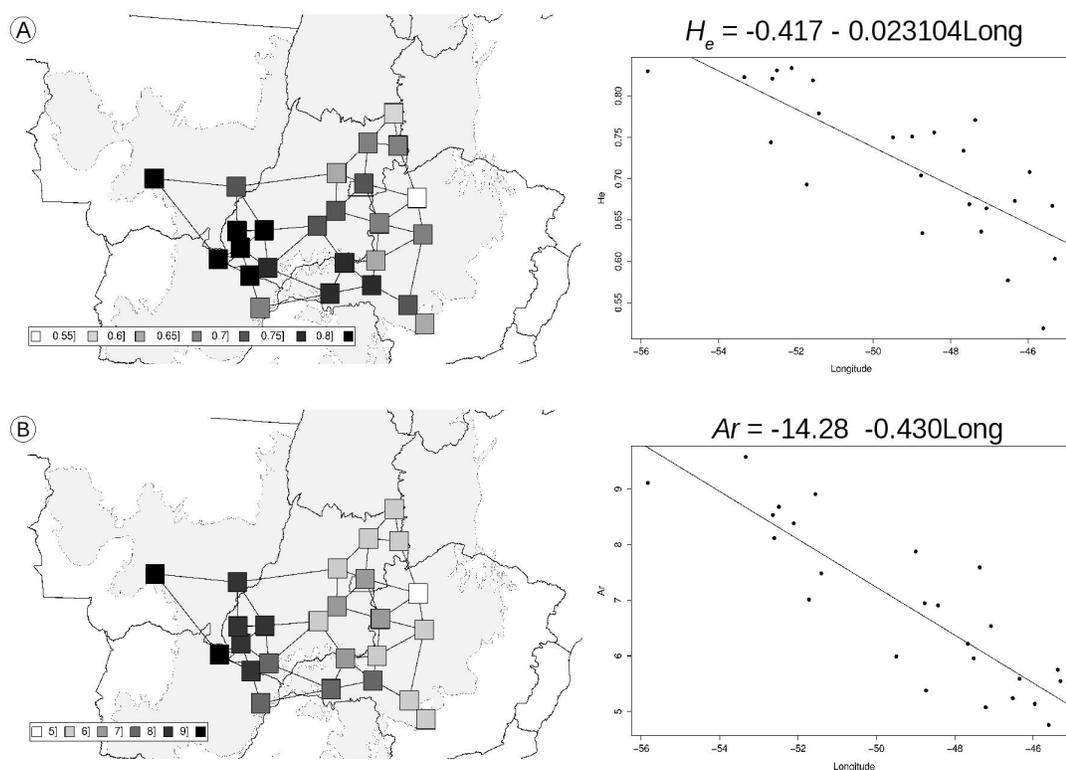
A magnitude da autocorrelação espacial avaliada em diferentes locos é semelhante, em termos de média e desvio padrão. No entanto é possível verificar que a amplitude de valores do coeficiente I de Moran, dentro de cada loco é variável. O alelo mais frequente mostra padrão espacial, conforme visualizado na linha vermelha da Figura 14, que é semelhante ao correlograma médio, por loco. Os alelos mais raros, no entanto, presentes em poucas subpopulações, não evidenciam padrão espacial e os valores do coeficiente I de Moran são próximos a zero, ou negativos. A estrutura espacial da variabilidade genética raramente é consistente entre diferentes locos (Heywood, 1991). A estrutura espacial é fraca, pois o fluxo gênico não tem sido suficiente para carrear os alelos mais raros. Esses alelos podem, inclusive, ser usados para mensurar o número de migrantes por geração (Slatkin, 1985). Assim, alelos raros não mostram padrão espacial e os alelos mais frequentes mostram estrutura espacial na primeira classe de distância (padrão espacial fraco).

O padrão espacial observado é frequentemente encontrado na natureza. As plantas, por serem sésseis, dependem de agentes externos, como animais, ou o vento para realizarem a dispersão de frutos e pólen. Assim, ao longo do tempo, em função da dispersão limitada, emerge uma estrutura de autocorrelação nas frequências alélicas, em que os indivíduos mais próximos geograficamente tendem a ser mais próximos geneticamente (Vekemans & Hardy, 2004). Esse padrão pode ser observado em diferentes escalas e o mesmo princípio é válido em um contexto geográfico. A dispersão limitada leva a uma relação positiva entre a distância genética e geográfica, entre as subpopulações. (Meirmans, 2012). A conexão ocorre até determinado intervalo, após o qual não há mais efeito do aumento da distância espacial na diferenciação genética, sendo a associação aleatória a partir de então.

O padrão espacial observado tem relação com a interação dos agentes polinizadores e dispersores de sementes, responsáveis pelo fluxo gênico na espécie. Foi evidenciado que a distância de polinização dos besouros do gênero *Cyclocephala sp.* nas flores da espécie *A. crassiflora* ocorre em curtas distâncias. Em até 160 m foi observado a ocorrência de 71% dos eventos de polinização (Resultados do capítulo 1). A ocorrência de fluxo gênico via pólen entre demes espacialmente distantes deve ocorrer muito raramente e

ainda não foi mensurado. Com relação à dispersão da semente, por outro lado, a anta (*Tapirus terrestris*) tem o hábito de transportá-las por longas distâncias, muitas vezes superiores a 2 km. Outra característica do dispersor, responsável por reforçar a estrutura genética espacial é o hábito de defecar repetidamente em intervalos regulares (Fragoso, 1997).

A análise de regressão linear simples entre as variáveis genéticas e as duas dimensões espaciais, separadamente, revelou um padrão geográfico no sentido oeste-leste muito forte, entre a diversidade genética ( $H_e$ ) e a longitude ( $r^2 = 0,602$ ; valor de  $p < 0.001$ ) e entre a riqueza alélica ( $Ar$ ) e a longitude (0,747; valor de  $p < 0.001$ ). O mesmo cenário não foi observado em relação ao  $H_e$  e a latitude (valor de  $p = 0.187$ ), assim com  $Ar$  e a latitude (valor de  $p = 0,340$ ). O valor de  $f$  não mostrou relação com nenhuma das duas dimensões espaciais; latitude (valor de  $p = 0,786$ ) e longitude (valor de  $p = 0,512$ ). Os valores de  $f$  são de baixa magnitude e só diferem de zero em oito subpopulações. (figura 15).



**Figura 15.** Regressão linear simples entre; **A** – diversidade genética ( $H_e$ ); **B** – riqueza alélica ( $Ar$ ) e a longitude de 25 subpopulações naturais de *A. crassiflora* no Cerrado.

O padrão espacial das variáveis  $H_e$  e  $Ar$ , com decaimento em suas magnitudes na direção oeste-leste, sugere uma expansão da área de distribuição da espécie. Após esses eventos é comum observar uma variação clinal nas frequências alélicas, ao longo do eixo de expansão. A dilatação da área de distribuição da espécie afeta os alelos raros, presentes nas bordas, que por múltiplos eventos de efeito fundador podem aumentar suas frequências ao longo da expansão. A consequência da flutuação dos alelos é uma redução na diversidade alélica e genética, que estão diretamente relacionadas a magnitude do fluxo gênico, quando ele não é suficiente para permitir uma homogeneização das frequências alélicas durante a expansão. Além disso, quando o fluxo gênico é espacialmente estruturado, dificilmente os alelos presentes no centro da distribuição alcançarão as bordas. Assim, as bordas exibirão índices inferiores de diversidade genética. Da mesma forma, as frequências dos alelos mais comuns tendem a se diferenciar, por meio da deriva genética. Isso pode levar tanto a um aumento global na diferenciação genética, quanto a formação de grupos geográficos (Hallatschek et al., 2007; Excoffier & Ray, 2008).

A expansão, no passado, da área de distribuição da espécie deixa rastros detectáveis nas variáveis genéticas (Hallatschek et al., 2007). Isso pode ser evidenciado, no presente estudo, pelo primeiro eixo da análise de PCoA, que mostra um aumento na diferenciação genética na direção oeste-leste, da mesma forma em que há uma redução dos índices  $H_e$  e  $Ar$ . Adicionalmente o algoritmo de Monmonier detectou a presença de descontinuidade genética e as técnicas de agrupamento do *structure* e ordenção da PCoA, evidenciaram a formação de grupos geográficos distintos. Todas essas evidências apontam para expansão da área de distribuição da espécie. Os resultados observados aqui são semelhantes aos obtidos por Barbosa et al. (2015). Os autores avaliaram 23 subpopulações naturais de *Eugenia dysenterica* DC., conhecida popularmente por cagaiteira. É interessante notar que o padrão de descontinuidade genética obtida por eles também separou as populações de noroeste a sudeste, em parte na mesma área geográfica das subpopulações de *A. crassiflora*. A diferenciação também aumenta no mesmo sentido indicado aqui. Os autores também evidenciam a possibilidade de expansão da área de distribuição da cagaiteira.

#### 4.4 CONCLUSÕES

- As subpopulações naturais de *A. crassiflora* apresentam níveis elevados de diversidade genética;
- A diversidade genética está fortemente estruturada nas subpopulações naturais de *A. crassiflora*;
- A maior parte das subpopulações naturais de *A. crassiflora* amostradas apresenta ausência de endogamia que se deve ao sistema de cruzamento;
- Não há evidência de redução recente no tamanho efetivo das subpopulações de *A. crassiflora*;
- As subpopulações naturais de *A. crassiflora* estão alocadas em dois grupos geográficos distintos, com descontinuidade genética.
- Há um padrão espacial até 250 km na estrutura genética das subpopulações naturais de *A. crassiflora*;
- Há evidências de expansão histórica no sentido oeste-leste da distribuição geográfica da espécie.

5 EFEITO DO CLIMA E DA PAISAGEM NA DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE SUBPOPULAÇÕES NATURAIS DE *Annona crassiflora* Mart. NO CERRADO BRASILEIRO.

RESUMO

A distribuição da variabilidade genética nas populações naturais pode ser moldada por meio da interação de diferentes fatores relacionados no tempo e espaço. Para compreender o efeito desses fatores, os modelos de distribuição potencial têm sido correlacionados com os parâmetros genéticos populacionais, no intuito de evidenciar o efeito das mudanças climáticas na diversidade genética das populações de uma espécie. Da mesma forma, as características da paisagem também estão sendo relacionadas com os processos microevolutivos, com o objetivo de encontrar locais de descontinuidade genética, isolamento e barreiras ao fluxo gênico decorrente das características da paisagem. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho é avaliar a relação entre as estimativas dos parâmetros genéticos com a adequabilidade climática no último máximo glacial e no período pré-industrial, além das características da paisagem. Foram amostradas 25 subpopulações naturais, que foram avaliadas com 6 locos microssatélites. Além disso, foi utilizado a medida de adequabilidade proveniente da utilização de cinco modelos climáticos e 14 modelos de nicho. Adicionalmente, foi empregado a porcentagem de cobertura vegetal nativa ao redor das subpopulações em quatro tamanhos de raio, 2 km, 5km, 10 km e 15 km. Foi observado que a distribuição espacial da diversidade genética e riqueza alélica estão relacionadas com a adequabilidade climática no último máximo glacial por um efeito indireto do espaço geográfico, enquanto que nenhuma relação foi observada em relação a adequabilidade no presente. A porcentagem de remanescentes da vegetação natural, por sua vez não explicou a distribuição espacial da diversidade genética, riqueza alélica e coeficiente de endogamia.

*Palavras-chave:* adequabilidade, parâmetros de diversidade genética, porcentagem de remanescentes.

SUITABILITY AND LANDSCAPE EFFECT IN GENETIC VARIABILITY  
DISTRIBUTION OF NATURAL SUBPOPULATIONS OF *Annona*  
*crassiflora* Mart. ON BRAZILIAN CERRADO.

ABSTRACT

The genetic variability distribution in natural populations can be shaped through interaction by ongoing space-time factors. To understand the effect of these factors, the potential distribution models have been correlated with estimates of genetic parameters in order to observe the effect of climate change on genetic diversity of species' population. Farther, the landscape features are also being linked to the micro-evolutionary processes, with the aim to finding genetic discontinuity, isolation and barriers to gene flow. In this sense, the objective of this study was to evaluate the relationship between estimates of genetic parameters with climate suitability at the last glacial maximum and the present, in addition to landscape features. They were sampled 25 natural subpopulations, which were genetically evaluated with six SSR locos. Farther, we used the suitability from five climatic models (AOGCM) and 14 ENMs. Additionally, we used the percentage of vegetation cover in four buffer sizes, 2 km, 5 km, 10 km and 15 km. It was observed that the spatial distribution of genetic diversity and allele richness are related to climate suitability from last glacial maximum by an indirect effect of geographical space, while no correlation was observed for suitability in the present. The percentage of remaining natural vegetation, in turn did not explain the spatial distribution of genetic diversity, allele richness and inbreeding coefficient;

*Keywords:* climatic suitability, genetic parameters, percentage of vegetation cover.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Os modelos de nicho ecológico (ENM) têm sido usados, tradicionalmente, para prever a distribuição geográfica das espécies, com base em registros de ocorrência, que cada vez mais estão sendo disponibilizados em domínios da internet (Jiménez-Valverde et al., 2008). Existem vários algoritmos que podem ser usados, com o objetivo de relacionar os registros observados de uma dada espécie, com dados ambientais, para gerar mapas de distribuição potencial. Esses resultados podem ser projetados para outros períodos de tempo, para o passado, ou futuro, com o objetivo de compreender o impacto das mudanças climáticas na distribuição espacial da espécie, além de evidenciar áreas de estabilidade climática, que podem ser importantes refúgios históricos da biodiversidade. Mapas de estabilidade podem ser usados para evidenciar padrões de diversidade e auxiliar em planejamentos voltados para a conservação (Werneck et al., 2012; Diniz-Filho et al., 2015).

Recentemente, os mapas de adequabilidade ambiental estão sendo empregados como preditores das estimativas dos parâmetros genéticos. Os estudos procuram relacionar padrões de distribuição da variabilidade genética com locais climaticamente adequados, no passado ou no presente para a espécie em estudo (Knowles et al., 2007; Soares et al., 2014; Diniz-Filho et al., 2015). O uso de técnicas de modelagem de nicho e inferências sobre processos demográficos históricos podem auxiliar no delineamento de cenários para testar hipóteses relativas à distribuição da variabilidade genética (Soares et al., 2014).

O padrão de distribuição da variabilidade genética nas populações naturais também pode ser amplamente afetado por variáveis ambientais, relacionadas com as características atuais da paisagem. Essa linha de pesquisa, que procura unir teorias e ferramentas da genética de populações e ecologia de paisagens tem sido chamada de genética na escala da paisagem (*landscape genetics*). A disciplina procura relacionar as características da paisagem com processos microevolutivos, como o fluxo gênico, deriva genética e seleção natural. Adicionalmente ajuda a identificar quebras de fluxo gênico entre populações, sem uma causa óbvia, ou ainda a elucidar eventos de contato secundário entre populações isoladas (Manel et al., 2003).

A espécie *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), conhecida popularmente por

araticunzeiro, é uma planta de porte arbóreo que ocorre nas fitofisiomias do bioma Cerrado que incluem o cerradão, cerrado denso, cerrado típico e cerrado ralo. A distribuição geográfica é ampla, sendo encontrado nos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Pará, Bahia, Piauí, Tocantins, Maranhão e, em remanescentes, no Paraná e em São Paulo (Ratter et al., 2000)

Com relação à biologia reprodutiva, *A. crassiflora* tem sido considerada como prevalentemente alógama. A espécie é contarófila, sendo polinizado por besouros do gênero *Cyclocephala* (Cavalcante et al., 2009). No Cerrado, a dispersão dos frutos é realizada pela anta (*Tapirus terrestris*). Outros animais podem, ocasionalmente, consumir os frutos do araticunzeiro, tais como o veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), lobinho (*Cerdocyon thous*) e tatu (*Dasybus sp.*), além de algumas espécies de aves, mas elas não constituem dispersores efetivos. Além disso, as características dos locais de defecação do *T. terrestris* e a eliminação das sementes intactas do araticunzeiro podem favorecer a germinação da planta (Golin et al., 2011).

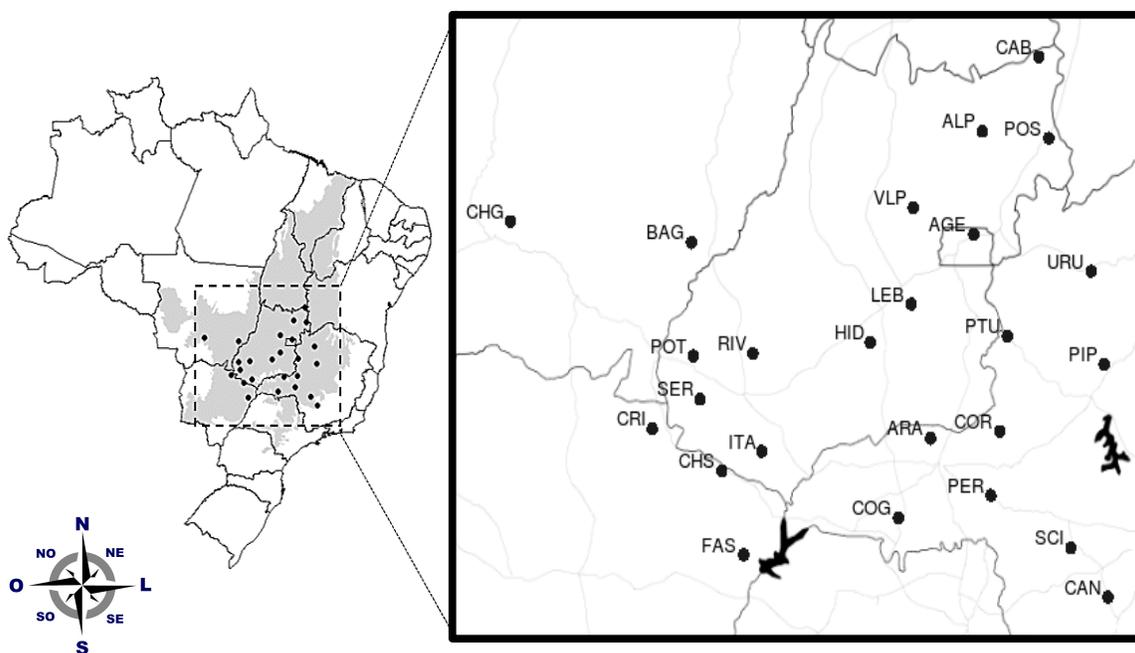
Estudos anteriores (capítulo 2) indicam que as subpopulações de *A. crassiflora* apresentam forte estrutura genética. A diferenciação genética aumenta no sentido oeste-leste. Além disso, foi evidenciado que a diversidade genética e riqueza alélica também apresentam uma relação muito forte com a longitude. As subpopulações localizadas ao leste da distribuição dos sites de coleta apresentam valores inferiores de  $H_e$  e  $A_r$ . Uma possibilidade é que esse padrão espacial seja decorrente das variáveis ambientais.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar se a distribuição da variabilidade genética pode ser explicada pela adequabilidade climática passada ou atual e pela porcentagem de remanescentes, presente nas áreas de coleta das populações.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Parâmetros genéticos populacionais

Foram amostradas vinte e cinco subpopulações de araticunzeiro – *A. crassiflora* Mart., distribuídas na área natural de ocorrência da espécie (Figura 16). Em cada uma das subpopulações foram coletadas folhas de aproximadamente trinta plantas adultas, totalizando 762 plantas. As amostras foram acondicionadas em sílica gel e transportadas para o Laboratório de Genética & Biodiversidade, no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás.



**Figura 16** Área de coleta das 25 subpopulações naturais de araticunzeiro – *A. crassiflora* Mart. no Cerrado brasileiro.

Os indivíduos foram avaliados a partir de seis pares de iniciadores microssatélites. Os genótipos foram obtidos por meio da análise dos eletroferogramas no programa GeneMapper® V. 5 da Applied Biosystems®. A planilha de genótipos foi empregada para quantificação da magnitude da variabilidade genética presente nas

subpopulações. Para tal finalidade foi realizada a estimativa da riqueza alélica ( $Ar$ ). A diversidade genética nas populações foi caracterizada a partir das estimativas da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, a partir do estimador da diversidade genética não viesado de Nei (1972). Foi estimado o índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), com base na análise de variância de frequências alélicas, conforme Weir & Cockerham (1984). O parâmetro quantifica o excesso, ou deficit de homozigotos nas populações locais, ou subpopulações, de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. O procedimento experimental e obtenção das estimativas dos parâmetros genéticos populacionais foram realizadas no capítulo 02 (Tabela 10).

**Tabela 10.** Estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a riqueza alélica ( $Ar$ ), a diversidade genética ( $H_e$ ) e o índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), obtidos da genotipagem de seis pares de locos microssatélites em 25 subpopulações naturais de *A. crassiflora* provenientes do Cerrado brasileiro.

Subpopulações	$n$	$Ar$	$H_e$	$H_o$	$f$
CHS	32	8,383	0,834	0,799	0,048
ITA	32	7,483	0,779	0,682	0,123*
RIV	32	8,909	0,819	<b>0,820</b>	-0,013
SER	32	8,680	0,831	0,796	0,039
CHG	20	9,111	<b>0,830</b>	0,743	0,094*
CRI	32	<b>9,577</b>	0,823	0,782	0,057*
HID	15	5,990	0,750	0,763	-0,013
PIP	32	5,751	0,667	0,627	0,058
POT	33	8,118	0,821	0,732	0,110*
SCI	35	5,136	0,708	0,711	-0,003
BAG	35	8,532	0,744	0,695	0,068*
COR	22	5,075	0,636	0,621	0,003
LEB	31	6,945	0,704	0,611	0,099*
ARA	32	6,908	0,756	0,711	0,081
COG	32	7,878	0,751	0,766	-0,008
PER	32	7,590	0,771	0,734	0,060
CAN	32	5,545	0,603	<b>0,495</b>	<b>0,158*</b>
VLP	32	5,377	0,634	0,611	0,040
AGE	32	6,217	0,734	0,733	-0,005
POS	32	5,588	0,673	0,596	0,106*
PTU	32	6,538	0,664	0,634	0,041
ALP	32	5,958	0,669	0,672	-0,009
CAB	32	5,240	0,577	0,535	0,056
FAS	30	7,010	0,693	0,678	0,011
URU	32	<b>4,759</b>	<b>0,519</b>	0,524	<b>-0,018</b>
<b>Média</b>	<b>30.6</b>	<b>6,892</b>	<b>0,719</b>	0,683	<b>0,047</b>

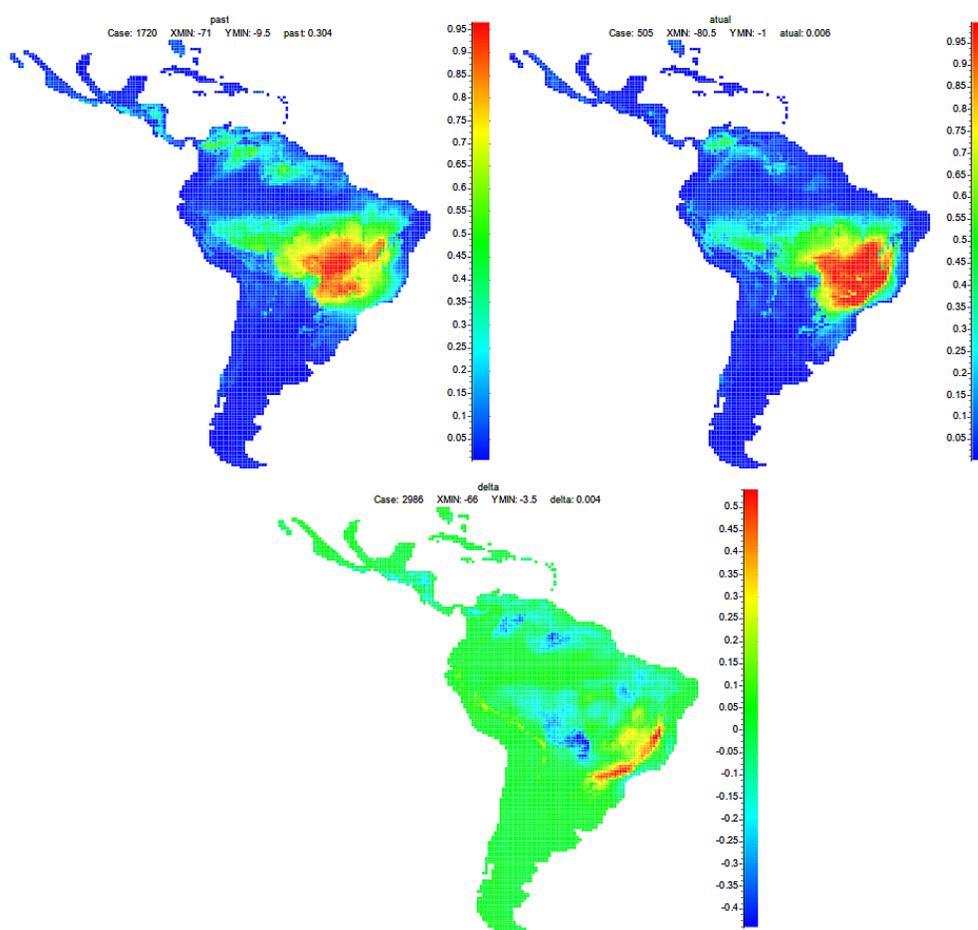
### 5.2.2 Modelagem de nicho ecológico

As medidas de adequabilidade climática foram obtidas para a espécie *A. crassiflora* usando modelos de nicho ecológico (ENM). A distribuição potencial foi modelada com base em 108 registros de ocorrência da espécie, disponíveis no banco de dados do *Species Link* (<http://splink.cria.org.br/>). Os registros foram examinados, para remoção de erros, duplicatas e as sinônimas botânicas. Para detalhes e alguns cuidados ao lidar com esse tipo de dado ver De Giovanni et al. (2012). Os registros de ocorrência foram mapeados em uma quadrícula de 0,5° de resolução espacial. Foram usados 14 ENMs: Análise de fator de nicho ecológico (ENFA), distância euclidiana (ED), distância de Gower (GD), distância de Mahalanobis (MD), algoritmo genético para produção de conjunto de regras (GARP), modelos lineares generalizados (GLM), máxima entropia (Maxent), modelos aditivos generalizados (GAM), análise discriminante flexível (FDA), regressão multivariada adaptável Splines (MARS), Modelos generalizados *Boosted* (GBM), redes neurais (ANN) *Random Forest* (RNDFOR).

Para modelar a ocorrência da espécie foram empregadas cinco variáveis climáticas, derivadas de quatro modelos climáticos globais acoplados oceano-atmosfera (AOGCMs: CCSM, GISS, MIROC e MRI). As variáveis incluem a temperatura média anual, amplitude térmica anual, precipitação do mês mais chuvoso e precipitação do trimestre mais quente, juntamente com o pH do solo. Os AOGCMs fornecem uma simulação para o clima do presente, representado pelo período pré-industrial e para o último máximo glacial LGM (~21 mil anos). Os dados foram obtidos do banco *EcoClimate* (<http://ecoclimate.org>) em quadrícula de 0,5°. Os dados de solo, por sua vez, foram obtidos do *Harmonized World Soil Database* (HWSD). Os modelos foram combinados para gerar os mapas de adequabilidade.

Os modelos de nicho foram construídos para o cenário climático atual e projetados para o passado, nas condições do último máximo glacial. A modelagem foi repetida 50 vezes, para cada combinação de método e AOGCM. A frequência de ocorrência da espécie em cada célula, no processo de replicação permite inferir sobre a adequabilidade climática para cada combinação entre os 14 métodos de ENM e 4 AOGCMs. Sobrepondo

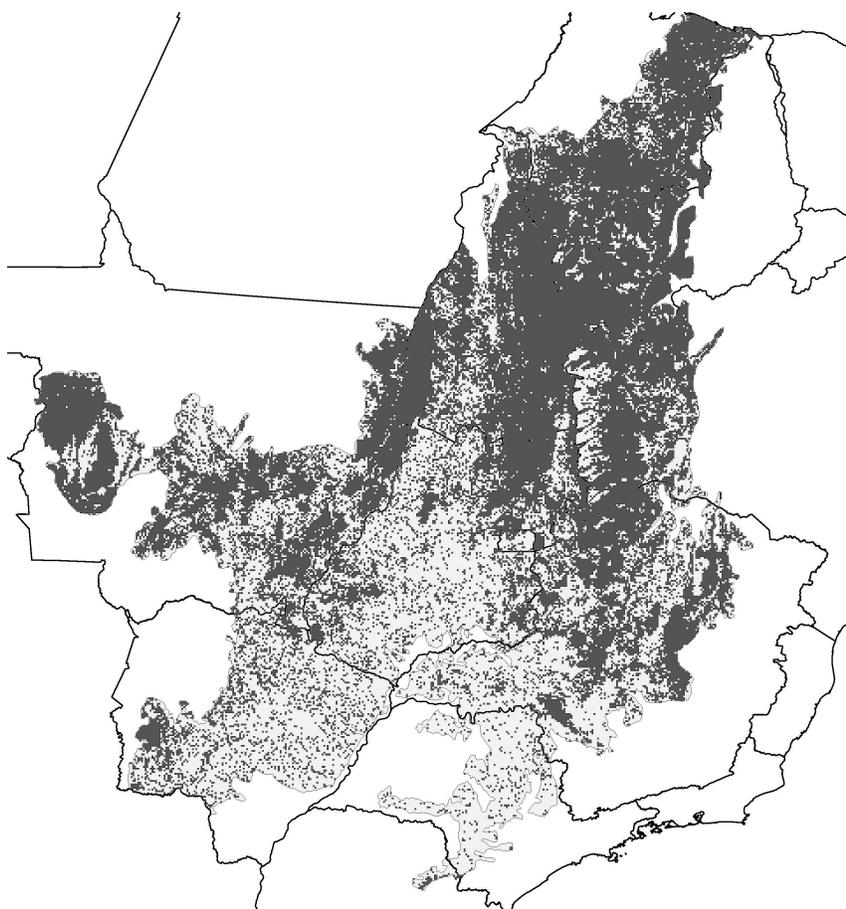
os mapas de adequabilidade foi possível obter um consenso (ensemble), que foi usado, no presente estudo, como a métrica de adequabilidade ambiental para *A. crassiflora*, no tempo presente, no período pré-industrial ( $PI_S$ ), no passado; último máximo glacial ( $LGM_S$ ). A variação entre  $PI_S$  e  $LGM_S$  foi usada para obter o  $\Delta S$  (Figura 17). Os valores positivos de  $\Delta S$  indicam os locais que ganharam adequabilidade ambiental, desde o último máximo glacial. Todo o procedimento descrito nesse tópico foi realizado por Terribile et al. (2012).



**Figura 17.** Mapas de adequabilidade ambiental da espécie *A. crassiflora*, obtidos por meio de 14 modelos de nicho ecológico e 5 modelos climáticos acoplados oceano-atmosfera projetados, reespectivamente, para o último máximo glacial ( $LGM_S$ ), o presente, no período pré-industrial ( $PI_S$ ) e o resultante  $\Delta S$

### 5.2.3 Caracterização da paisagem nas subpopulações

A caracterização da paisagem nas subpopulações de *A. crassiflora* foi realizada quanto a % de remanescentes da vegetação natural do Cerrado. Para essa finalidade foi usada uma camada rasterizada, na resolução de 1 km, proveniente do Mapeamento das áreas de vegetação remanescente do Cerrado, para os anos de 2008 e 2009, com base no PMDBBS - Projeto de Monitoramento do Desmatamento dos Biomas Brasileiros por Satélite (Figura 18). A camada está disponível no banco de dados do Laboratório de Processamento de Imagens e Geoprocessamento – LAPiG/UFG (<http://www.lapig.iesa.ufg.br/lapig/>).



**Figura 18.** Camada rasterizada dos remanescentes de vegetação natural do Cerrado na resolução espacial de 1 km, proveniente do Mapeamento das áreas de vegetação remanescente do Cerrado, para os anos de 2008 e 2009 do LAPiG/UFG.

O tamanho da área a ser caracterizada ao redor das subpopulações normalmente é definido de acordo com a capacidade de dispersão da espécie. Como essas informações são incertas e variáveis, foram empregadas quatro tamanhos diferentes de área, com raio de 2 km, 5 km, 10 km e 15 km. Dentro dessa área foram sorteados 1000 pontos. A camada raster é composta por pixels aos quais são atribuídos valores de uma matriz, por exemplo 0 para ausência e 1 para presença de remanescente. O sorteio de pontos amostra esses valores. Assim, a porcentagem de remanescentes é dada pela soma da quantidade de pontos amostrados, que continham valores de presença, no total de pontos amostrados na área. O método foi desenvolvido por Diniz-Filho (2015, dados não publicados). Esse procedimento foi realizado no programa *R*, com o pacote raster (Hijmans, 2015).

#### 5.2.4 Análise de dados

O conjunto de valores de adequabilidade ambiental do período pré-industrial ( $PI_S$ ), do último máximo glacial ( $LGM_S$ ) e o resultante ( $\Delta S$ ) para cada coordenada geográfica, correspondente ao sítio de coleta da subpopulação foram utilizados como preditores em uma análise de regressão linear simples entre as estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a diversidade genética ( $H_e$ ), riqueza alélica ( $Ar$ ) e índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ). O objetivo é avaliar se as áreas com maior adequabilidade, no passado ou presente abrigam subpopulações com maiores índices de variabilidade e diversidade genética e menor endogamia. As porcentagens de remanesces de vegetação natural do Cerrado, resultantes da caracterização dos *buffers* em 2 km, 5 km, 10 km e 15 km foram usadas, da mesma forma, como preditor em uma análise de regressão linear simples entre as estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a diversidade genética ( $H_e$ ), riqueza alélica ( $Ar$ ) e índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ).

Os resultados estatisticamente significativos foram utilizados em uma análise do resíduo. Um dos pressupostos da regressão linear é a independência dos erros, assim, a presença de autocorrelação no resíduo pode aumentar a ocorrência de erro tipo I, além de enviesar as estimativas dos coeficientes de regressão. Para verificar a independência do

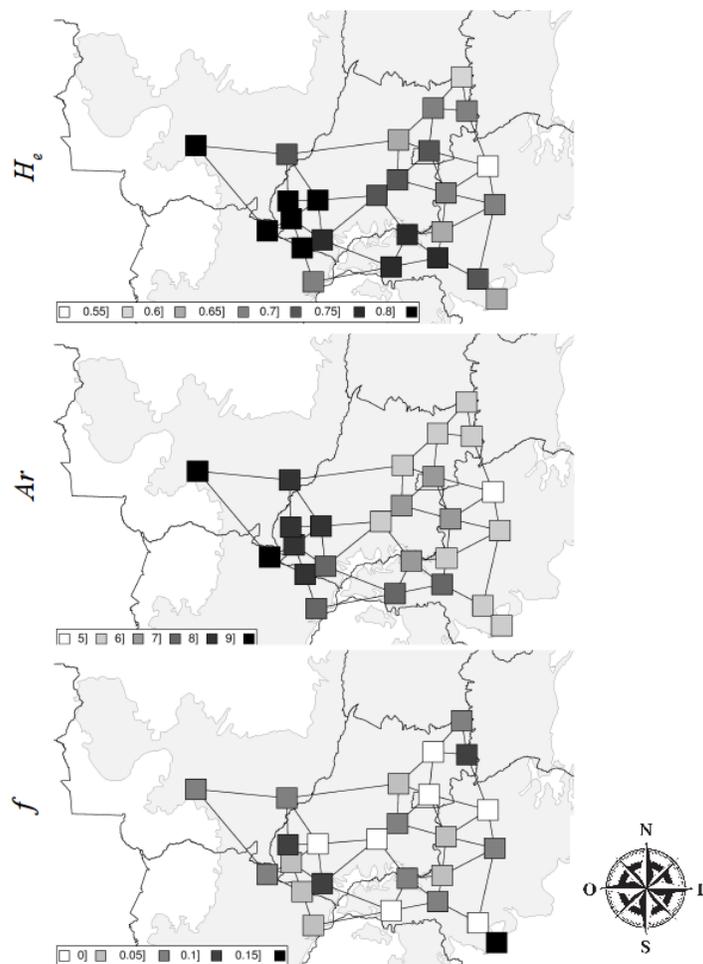
resíduo foi utilizado o coeficiente I de Moran, a partir do pacote *ape* – *Analyses of Phylogenetics and Evolution* (Paradis et al., 2004) e o correlograma de Moran do pacote *ncf* – *spatial nonparametric covariance functions* (Bjornstad, 2015), no programa R. Quando constatada a presença de autocorrelação no resíduo foi usada a correção de Duttileul para os graus de liberdade, de modo a tornar a análise mais restritiva, descontando o efeito da dependência espacial das observações. A correção foi realizada com o pacote *SpatialPack* – *Package for analysis of spatial data* (Osorio & Vallejos, 2014).

Outra maneira de considerar a presença de autocorrelação espacial no resíduo é adicionar o espaço explicitamente na análise. Para descontar o efeito do padrão espacial na distribuição e magnitude da variabilidade genética, o espaço geográfico foi usado como um dos preditores dos parâmetros genéticos populacionais. Para essa finalidade, inicialmente foi gerada uma variável que captou a maior parte da variação do espaço geográfico de ocorrência das subpopulações de *A. crassiflora*, a partir das coordenadas dos sítios de coleta. Esses pontos foram usados para a construção de uma matriz de distância geográfica truncada. Essa matriz foi usada em uma análise de coordenadas principais (PCoA). O método é conhecido por PCNM – *principal coordinates of neighbor matrices* e foi executado no programa *SAM* – *spatial analysis in macroecology* (Rangel et al., 2006).

Foi usado o primeiro autovetor do PCNM como segundo preditor, sempre que a análise de regressão linear simples entre o primeiro preditor ( $PI_s$ ,  $LGM_s$  ou  $\Delta S$ ) e a variável resposta ( $H_e$ ,  $Ar$  e  $f$ ) fosse estatisticamente significativa. Para essa finalidade foi realizada uma Análise de Redundância (RDA). O RDA combina uma regressão linear múltipla com análise de componentes principais (PCA). Os eixos da RDA representam combinações lineares dos preditores, que melhor explicam a variável resposta. A análise de variância foi usada para gerar efeitos para cada preditor, individualmente, com base na decomposição dos componentes de variância e para testar a sua significância, a partir do teste F.

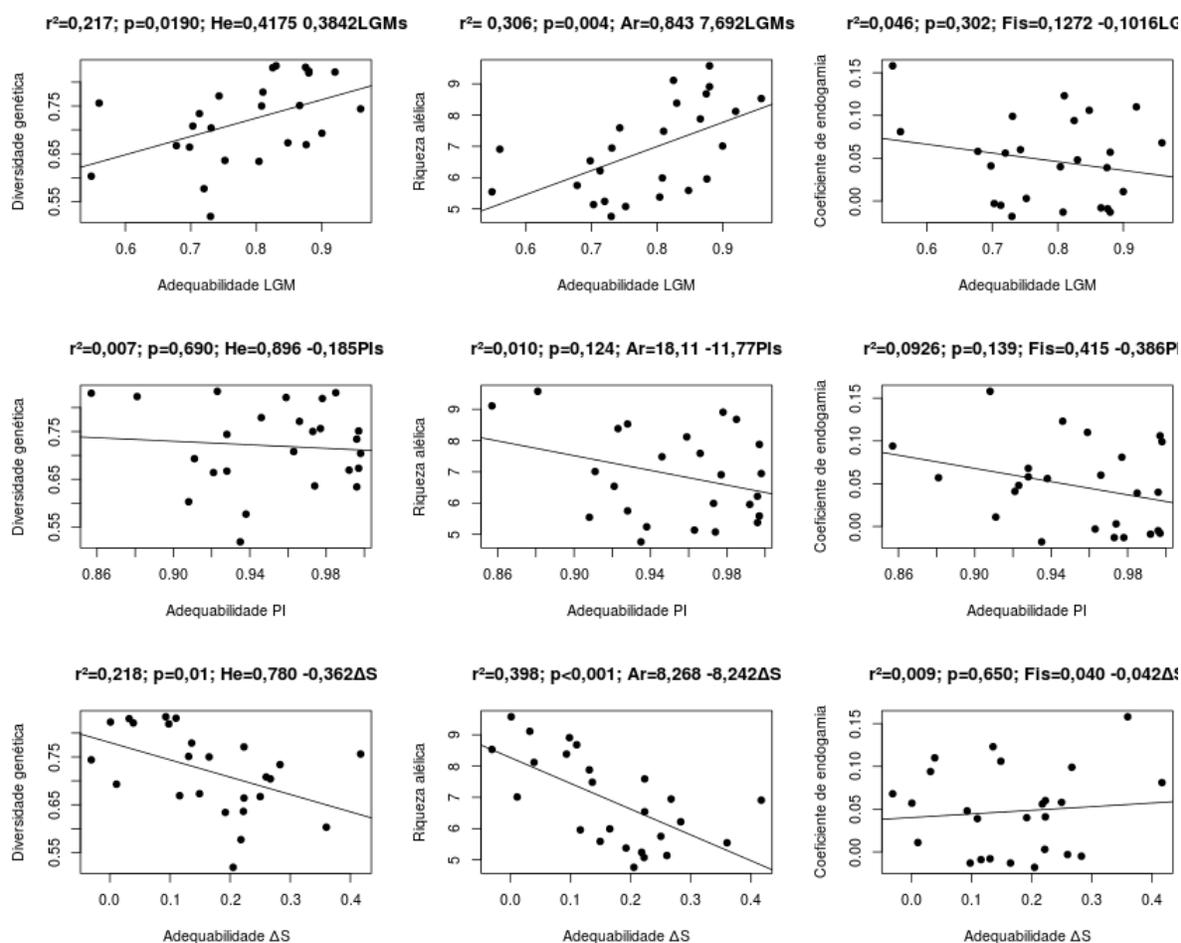
### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estimativas de  $H_e$  e a  $Ar$  mostram um padrão longitudinal de variação, no sentido oeste-leste, enquanto que as estimativas do coeficiente de fixação intrapopulacional não mostram o mesmo padrão (Figura 19). Trabalhos anteriores, conduzidos com a espécie, mostram que  $H_e$  e  $Ar$  estão fortemente correlacionados com a longitude. Os autores sugerem que esse tipo de sinal nos parâmetros genéticos é um indício de expansão do range da espécie (Capítulo 02).



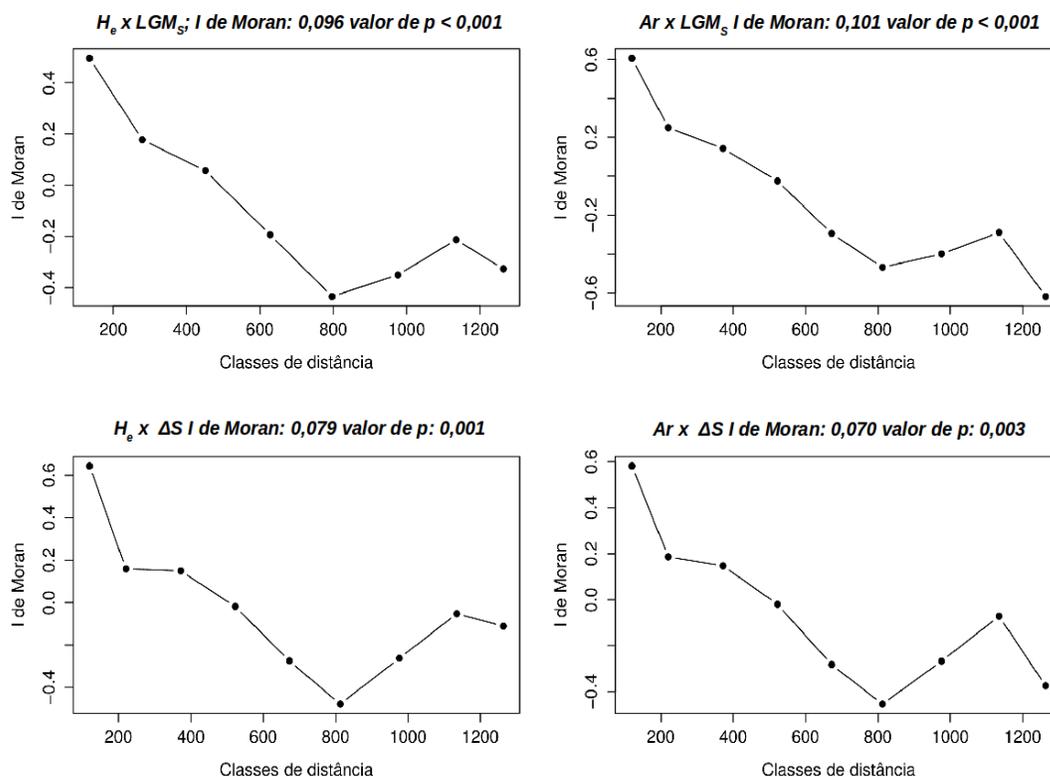
**Figura 19.** Estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a diversidade genética ( $H_e$ ), riqueza alélica ( $Ar$ ) e coeficiente de fixação intrapopulacional ( $f$ ) das subpopulações naturais de *A. crassiflora* no Cerrado brasileiro.

As estimativas da diversidade genética ( $r^2 = 0,217$ ;  $p = 0,019$ ) e riqueza alélica ( $r^2 = 0,306$ ;  $p = 0,004$ ) mostraram relação com a adequabilidade ambiental para a espécie no último máximo glacial (LGM). O coeficiente de endogamia, por outro lado, não mostrou relação com  $LGM_s$  ( $r^2 = 0,046$ ;  $p = 0,302$ ). O mesmo cenário não foi observado em relação  $H_e$  ( $r^2 = 0,007$ ;  $p = 0,690$ ),  $Ar$  ( $r^2 = 0,010$ ;  $p = 0,124$ ) e  $f$  ( $r^2 = 0,0926$ ;  $p = 0,139$ ) e a adequabilidade climática no período pré-industrial (presente). Adicionalmente, as estimativas de  $H_e$  ( $r^2 = 0,218$ ;  $p = 0,01$ ),  $Ar$  ( $r^2 = 0,398$ ;  $p < 0,001$ ) mostraram relação positiva com as áreas que ganharam adequabilidade ( $\Delta S$ ), enquanto que o  $f$  ( $r^2 = 0,009$ ;  $p = 0,650$ ) permaneceu não significativo (Figura 20).



**Figura 20.** Regressão linear simples entre as estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a diversidade genética ( $H_e$ ), riqueza alélica ( $Ar$ ) e coeficiente de endogamia ( $f$ ) com a adequabilidade ambiental do último máximo glacial ( $LGM_s$ ), do período pré-industrial ( $P$ ) e o resultante entre eles ( $\Delta S$ ) da espécie *A. crassiflora*, no Cerrado brasileiro.

A avaliação do resíduo da análise de regressão linear indicou a presença de autocorrelação espacial na relação entre a diversidade genética ( $H_e$ ) e riqueza alélica ( $Ar$ ) com a adequabilidade do último máximo glacial ( $LGM_S$ ) e a adequabilidade resultante ( $\Delta S$ ) (Figura 21).



**Figura 21.** Correlograma de Moran mostrando a autocorrelação espacial do resíduo da análise de regressão linear entre as estimativas de diversidade genética ( $H_e$ ) e riqueza alélica ( $Ar$ ) com a adequabilidade no último máximo glacial ( $LGM_S$ ) e a adequabilidade resultante ( $\Delta S$ ) da espécie *Anona crassiflora* no Cerrado brasileiro.

A existência de autocorrelação no resíduo exigiu a utilização da correção de Duttileul. Após as correções dos graus de liberdade todas as associações entre as estimativas dos parâmetros genéticos e a adequabilidade climática, identificados inicialmente com a análise de regressão linear simples deixaram de ser significativas. Assim, não foi possível identificar qualquer efeito da adequabilidade climática na

magnitude e distribuição da variabilidade genética, tanto no presente, quanto há 21 m.a atrás, no último máximo glacial (Tabela 11).

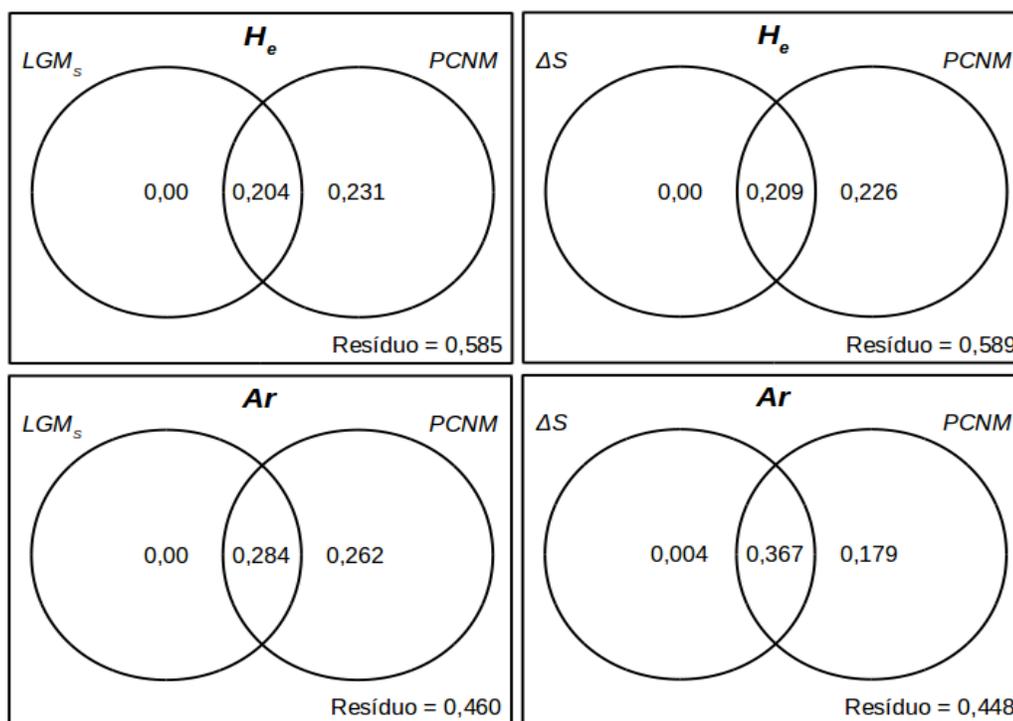
**Tabela 11.** Graus de liberdade geograficamente efetivos e valores de p associados às análises de regressão linear entre as estimativas dos parâmetros genéticos e a adequabilidade para espécie *A. crassiflora*, após aplicada a correção de Dutilleul

Regressão linear	GL efetivo	Valor de p	Valor de p corrigido
$H_e \times LGM_S$	6,441	0,019	0,227
$Ar \times LGM_S$	5,362	0,004	0,180
$H_e \times \Delta S$	5,701	0,010	0,257
$Ar \times \Delta S$	4,596	0,001	0,146

Ao mesmo tempo em que a ausência de independência das  $n$  observações resulta em um problema estatístico, relacionado com o número de graus de liberdade efetivos, para os testes de hipótese, a autocorrelação espacial é uma propriedade de muitas variáveis biológicas (Legendre, 1993). Essa característica é, muitas vezes, exatamente o que se deseja mensurar. Em *A. crassiflora*, por exemplo, foi detectada a presença de padrão espacial, em que as subpopulações em até 250 km de distância são mais próximas geneticamente, um resultado decorrente de um processo evolutivo, a magnitude do fluxo gênico histórico, na espécie (capítulo 2).

Em função dessa autocorrelação das variáveis biológicas, os métodos de correção para os graus de liberdade são muito importantes, para permitir testes de hipóteses que atendam aos pressupostos das análises. No entanto, eles podem ter algumas limitações relacionadas com o tamanho amostral. Na presença de autocorrelação, a correção de Dutilleul remove graus de liberdade proporcionalmente à magnitude do padrão espacial. Assim, se o  $n$  amostral não é muito grande ( $< 100$ , na presença de forte autocorrelação), a correção diminui a acurácia da estatística F e a capacidade de detectar associação entre as variáveis preditivas e resposta (Legendre et al., 2002). Assim, a falta de significância das análises de regressão linear entre as estimativas dos parâmetros genéticos e a adequabilidade, após aplicada a correção de Dutilleul pode ser um reflexo da restritividade do método, para  $n$  amostral pequeno.

A relação entre a diversidade genética ( $H_e$ ) e a adequabilidade no último máximo glacial ( $LGM_s$ ) não é significativa (valor de  $p = 0,736$ ), quando descontado o efeito do espaço geográfico, após a adição do primeiro autovetor da PCNM como preditor na análise de RDA, o que evidencia que a relação entre  $LGM_s$  e  $H_e$  só existe por efeito indireto do espaço geográfico (valor de  $p = 0,006$ ). Assim como em relação ao efeito da adequabilidade resultante ( $\Delta S$ ) com  $H_e$  (valor de  $p = 0,979$ ) só existe por efeito indireto do espaço (valor de  $p = 0,005$ ). Exatamente o mesmo cenário foi observado entre a relação da riqueza alélica ( $Ar$ ) com  $LGM_s$  (valor de  $p = 0,977$ ), quando adicionado o PCNM (valor de  $p = 0,009$ ) e entre  $Ar$  e  $\Delta S$  (valor de  $p = 0,275$ ) por efeito da distribuição espacial (valor de  $p = 0,008$ ). O espaço geográfico sozinho foi responsável por 17,9% a 26,2% da variação observada nas estimativas dos parâmetros genéticos, que incluem a diversidade genética e a riqueza alélica. A maior parte da variação está alocada no resíduo e não foi explicada por nenhum dos preditores usados (entre 46% e 58,9%) (Figura 22).



**Figura 22.** Diagrama de Venn mostrando os valores obtidos com a análise de partição da variância entre as estimativas dos parâmetros genéticos ( $H_e$  e  $Ar$ ) e a adequabilidade ( $LGM_s$ ,  $\Delta S$ ), após descontar o efeito do espaço geográfico, por meio do PCNM.

A relação entre as estimativas dos parâmetros genéticos e a adequabilidade ( $LGM_s$  e  $\Delta S$ ) para a espécie *A. crassiflora* só foi significativa na ausência do espaço geográfico na análise. É possível notar que as estimativas de  $H_e$  e  $Ar$  mostram valores de magnitudes mais elevadas, nas regiões a oeste da distribuição geográfica da espécie (Figura 17). Nesses locais, a adequabilidade climática também se mostra mais elevada, no último máximo glacial e permanece elevada (áreas em vermelho), no presente (Figura 17). Nos últimos 21 mil anos ocorreu um aumento das áreas consideradas mais adequadas, em direção ao sudeste da área de distribuição da espécie, de acordo com a distribuição potencial modelada por Terribile et al. (2012).

Análises palinológicas, conduzidas no Cerrado, mostraram uma alteração profunda da vegetação nessa região, do último máximo glacial (LGM), para o presente. Há 32 mil anos atrás, o clima era parecido com o atual, mas um pouco mais úmido e com uma estação seca mais curta. A vegetação era composta por palmeiras do gênero *Mauritia*. Essa fase foi precedida por um período mais árido, entre 50 mil e 40 mil anos atrás. Entre 32 mil anos e 19 mil anos ocorre um decréscimo no pólen arbóreo, juntamente com a abundância de plantas aquáticas e herbáceas. Apesar de, inicialmente, a umidade ainda ser alta no Brasil Central, a temperatura diminuiu. A umidade começa a diminuir há 20 mil anos atrás, deixando o clima seco e frio, provavelmente entre 5°C e 8°C a menos, em relação ao presente. No Cerrado, a fase seca perdurou até 7 mil anos, indicando que o início do holoceno foi mais seco, que o clima atual. A umidade começa a aumentar a partir de então, iniciando a transição para um clima mais úmido, em que a abundância de palmeiras aumenta subsequentemente (Salgado-Labouriau et al., 1998).

Terribile et al. (2012) modelaram a distribuição potencial de 18 espécies do Cerrado, incluindo *A. crassiflora* e projetaram os modelos no quaternário, no último máximo glacial, no presente e no futuro, até 2100. Os autores observaram que áreas na porção central do Cerrado representam regiões de estabilidade climática. Esses locais são refúgios históricos da biodiversidade.

A medida em que o clima ficou mais seco e frio, no último máximo glacial, a vegetação arbórea, que inclui *A. crassiflora* deve ter retraído, ficando restrita às regiões mais centrais e a noroeste da distribuição da espécie. Esses locais mantiveram condições

climáticas adequadas. Conforme o clima voltou a aquecer e a ficar mais úmido, depois de 7 mil anos atrás, a distribuição da espécie expandiu, em direção ao sudeste. No período do último máximo glacial, os locais com adequabilidade mais elevada são também as regiões com maiores índices de diversidade genética e riqueza alélica no presente. Com a expansão da adequabilidade para sudeste, praticamente toda área de ocorrência ficou com valores elevados de adequabilidade, no presente.

As informações apresentadas podem ser um indicativo de que adoção da correção de Dutilleul e a inclusão do PCNM nas análises representam métodos muito restritivos para o  $n$  amostral do presente estudo, quebrando a relação entre  $H_e$ ,  $Ar$  com  $LGM_S$  e  $\Delta S$ . Vale ressaltar que os resultados da distribuição potencial corroboram com a expansão da distribuição geográfica da espécie, observada no capítulo 2. Embora não tenha sido constatada relação direta entre as estimativas dos parâmetros genéticos populacionais e a adequabilidade.

Com relação a porcentagem de remanescentes, os valores dos coeficientes de regressão linear não mostraram ajuste entre nenhuma das estimativas dos parâmetros genéticos com a porcentagem de remanescentes da vegetação natural do Cerrado, em nenhum tamanho de área avaliada (Tabela 12).

**Tabela 12.** Coeficiente de regressão linear e valor de p associado a hipótese de ausência de relação entre as estimativas dos parâmetros genéticos com a porcentagem de cobertura vegetal, obtida em quatro tamanhos diferentes de área ao redor das populações naturais de *A. crassiflora*, no Cerrado brasileiro.

Raio do <i>buffer</i> (km)	Parâmetro	Regressão linear	
		$r^2$	Valor de p
2	$H_e$	0,093	0,138
	$Ar$	0,016	0,545
	$f$	0,049	0,285
5	$H_e$	0,066	0,213
	$Ar$	0,004	0,739

Continua....

**Tabela 12.** Continua.

	$f$	0,020	0,498
10	$H_e$	0,094	0,135
	$Ar$	0,015	0,552
	$f$	0,020	0,496
15	$H_e$	0,090	0,051
	$Ar$	0,016	0,537
	$f$	0,025	0,450

A ausência de relação entre as estimativas dos parâmetros genéticos com a porcentagem de remanescentes da vegetação natural do Cerrado é um indicativo de que as subpopulações de *A. crassiflora* podem não ter tido tempo para reagir aos efeitos da atropização ainda. A fragmentação do Cerrado é um evento muito recente na história e data dos últimos 60 anos. Ainda que o tempo de geração da espécie seja de 15 anos (Collevatti et al., 2014), ou seja, 4 gerações desde o início da fragmentação, pode existir um atraso nessa resposta. Algo semelhante foi observado na espécie *Caryocar brasiliense*, conhecida popularmente por pequi. Os autores não verificaram relação entre a antropização e a diversidade genética e o coeficiente de endogamia (Collevatti et al., 2001).

Além disso, é preciso considerar o tipo de caractere sob avaliação. Alguns deles respondem mais rapidamente aos efeitos da fragmentação do ambiente, enquanto outros são menos responsivos. Mesmo os caracteres sob seleção exigem algum tempo para que a fragmentação tenha algum impacto que possa ser notado (Ewers & Didham, 2006). Nesse ponto vale ressaltar que os marcadores moleculares usados no presente estudo são neutros. Por isso pode ser necessário mais tempo para que os efeitos da fragmentação do Cerrado afetem a composição genética das subpopulações. Outra possibilidade para a ausência de relação entre as estimativas dos parâmetros genéticos populacionais e a porcentagem de remanescentes é um confundimento entre esses efeitos e a expansão da distribuição geográfica da espécie. Se esses eventos deixam assinaturas nas estimativas de  $H_e$  e  $Ar$ , então os efeitos da fragmentação do bioma podem estar mascarados.

## 5.4 CONCLUSÕES

- A distribuição da diversidade genética e riqueza alélica estão relacionadas com a adequabilidade climática no último máximo glacial por um efeito indireto do espaço geográfico;
- O coeficiente de endogamia não está relacionado com a adequabilidade em nenhum dos períodos avaliados;
- A distribuição da diversidade genética, riqueza alélica e coeficiente de endogamia não estão relacionados com a adequabilidade do presente;
- A distribuição da diversidade genética, riqueza alélica e coeficiente de endogamia não estão relacionados com a porcentagem de remanescentes da vegetação natural do Cerado;

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

- A polinização em *A. crassiflora* ocorre em curtas distâncias, em até 360 metros.
- As subpopulações naturais de *A. crassiflora* apresentam níveis elevados de diversidade e estrutura genética;
- As subpopulações naturais de *A. crassiflora* estão alocadas em dois grupos geográficos distintos, com descontinuidade genética;
- Há evidências de expansão histórica no sentido oeste-leste da distribuição geográfica da espécie;
- A distribuição espacial da diversidade genética e riqueza alélica das subpopulações de *A. crassiflora* estão relacionadas com a adequabilidade climática no último máximo glacial, por um efeito indireto do espaço geográfico;

## 7 REFERÊNCIAS

- AKAGI, H., YOKOZEKI, Y., INAGAKI, A., MORI, K. & FUJIMURA, T. Micron, a microsatellite-targeting transposable element in the rice genome. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 266, n. 3, p. 471–480, 2001.
- ALMEIDA, S.P., PROENCA, C.E.B., SANO, S.M. & RIBEIRO, J.F. **Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1998.
- ALMEIDA, S.P., SILVA, J.A. & RIBEIRO, J.F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1987.
- ASHLEY, M. V. Plant Parentage, Pollination, and Dispersal: How DNA Microsatellites Have Altered the Landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 3, p. 148–161, 2014.
- BALLOUX, F. & GOUDET, J. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 4, p. 771–783, 2002.
- BARBOSA, A.C.D.O.F., COLLEVATTI, R.G., CHAVES, L.J., GUEDES, L.B.S., DINIZ-FILHO, A.F., TELLES, M.P.C. Range-wide genetic differentiation of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) populations in Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 288–296, 2015.
- BARRETT, S.C.. The evolution of plant sexual diversity. **Nature**, v. 3, p. 274–284, 2002.
- BITTENCOURT, J.V.M., SEBBENN, A.M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v. 99, n. 6, p. 580–591, 2007.
- BJORNSTAD, O.N. Spatial nonparametric covariance functions. **R package version 1.1-5**, 2015.
- BLANCO, A.J. V, PEREIRA, M.F., COELHO, A.S.G. & CHAVES, L.J. Diversidade genética em populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) por meio da análise de sequências de cpDNA. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 37, n. 3, p. 169–175, 2007.

- BORÉM, A. & MIRANDA, G. **Melhoramento de Plantas**. 5<sup>o</sup> ed. Viçosa: UFV, 2009.
- BRINKMANN, B., KLINTSCHAR, M., NEUHUBER, F., HÜHNE, J. & ROLF, B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. **The American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 6, p. 1408–1415, 1998.
- CAMPBELL, D.R. Multiple paternity in fruits of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). **American Journal of Botany**, v. 85, n. 7, p. 1022–1027, 1998.
- CAVALCANTE, T.R.M.B., NAVES, R.V., FRANCESCHINELLI, E.V., SILVA, P., DA SILVA, R.P. Polinização e formação de frutos em araticum. **Bragantia**, v. 68, n. 1, p. 13–21, 2009.
- CHAPUIS, M.P., ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621–631, 2007.
- CHARLESWORTH, D., WRIGHT, S.I. Breeding systems and genome evolution. **Current opinion in genetics & development**, v. 11, n. 6, p. 685–690, 2001.
- COLLEVATTI, R.G., BRONDANI, R. V., GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v. 83, n. 6, p. 748–756, 1999.
- COLLEVATTI, R.G., ESTOLANO, R., GARCIA, S.F., HAY, J.D. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, n. 4, p. 555–564, 2010.
- COLLEVATTI, R.G., GRATTAPAGLIA, D., HAY, J.D., NORTE, A., BRASIL, D.F. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite locos. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 349–356, 2001.
- COLLEVATTI, R.G., NABOUT, J.C., DINIZ-FILHO, J.A.F. Range shift and loss of genetic diversity under climate change in *Caryocar brasiliense*, a Neotropical tree species. **Tree Genetics & Genomes**, v. 7, n. 6, p. 1237–1247, 2011.
- COLLEVATTI, R.G., TELLES, M.P.C., LIMA, J.S., GOUVEIA, F.O., SOARES, T.N. Contrasting spatial genetic structure in *Annona crassiflora* populations from fragmented and pristine savannas. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 7, p. 1719–1727, 2014.
- CORNUET, J.M. & LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 2001–2014, 1996.

CORRÊA, P.G., CHAGAS, M.G.S. & PIMENTEL, R.M.M. Caracterização morfoanatômica foliar de *Annona crassiflora* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 816–818, 2007.

CRUZ, C.D., FERREIRA, F.M. & PESSONI, L.A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011.

DAMIANI, C., VILAS BOAS, E.V.B., ASQUIERI, E.R., LAGE, M.E., OLIVEIRA, R.A., PINTO, D.M., RODRIGUES, L.J., SILVA, E.P., PAULA, N.R.F. Characterization of fruits from the savanna: Araça (*Psidium guinnensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 31, n. 3, p. 723–729, 2011.

DICK, C.W., ETCHELECU, G., AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 753–764, 2003.

DINIZ FILHO, J.A.F., TELLES, M.P.C. Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations. **Conservation Biology**, v. 16, n. 4, p. 924–935, 2001.

DINIZ-FILHO, J.A.F., NABOUT, J.C., BINI, L.M., SOARES, T.N., TELLES, M.P.C., DE MARCO JUNIOR, P. COLLEVATTI, R.G. Niche modelling and landscape genetics of *Caryocar brasiliense* (“Pequi” tree: Caryocaraceae) in Brazilian Cerrado: An integrative approach for evaluating central-peripheral population patterns. **Tree Genetics and Genomes**, v. 5, n. 4, p. 617–627, 2009.

DINIZ-FILHO, J.A.F., RODRIGUES, H., TELLES, M.P.D.C., OLIVEIRA, G., TERRIBILE, L.C., SOARES, T.N., NABOUT, J.C. Correlation between genetic diversity and environmental suitability: taking uncertainty from ecological niche models into account. **Molecular Ecology Resources**, p. n/a–n/a, 2015.

DINIZ-FILHO, J.A.F., SOARES, T.N., LIMA, J.S., DOBROVOLSKI, R., LANDEIRO, V.L., TELLES, M.P.C., RANGEL, T.F., BINI, L.M. Mantel test in population genetics. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 475–485, 2013.

DOYLE, J.A., LE THOMAS, A. Phylogeny and geographic history of Annonacea. **Géographie physique et Quaternaire**, v. 51, n. 3, p. 353–361, 1997.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11–15, 1987.

DUDASH, M., RITLAND, K. Multiple paternity and self-fertilization in relation to floral

age in *Mimulus guttatus* (Scroph- ulariaceae). **American Journal of Botany**, v. 78, n. 12, p. 1746–1753, 1991.

EARL, D.A., VONHOLDT, B.M. STRUCTURE Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2012.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, 2004. Nature Publishing Group.

ELLSTRAND, N.C. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. **Oikos**, p. 77–86, 1992. JSTOR.

EPPERSON, B. **Geographical Genetics**. Princeton: Princeton University Press, 2003.

EVANNO, G., REGNAUT, S., GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.

EWERS, R.M., DIDHAM, R.K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 81, n. 1, p. 117–42, 2006.

EXCOFFIER, L., LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

EXCOFFIER, L., RAY, N. Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, n. 7, p. 347–351, 2008.

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**, v. 131, n. 2, p. 479–491, 1992.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. UFV, 1987.

FERREIRA, M., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 1998.

FERREIRA, V.J.B., FERRI, P.H., GUILLO, L.A., CHEN CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Braz. J. Biol.**, v. 64, n. 1, p. 141–147, 2008.

- FRAGOSO, J.M. V. Tapir-generated seed shadows: scale-dependent patchiness in the Amazon rain forest. **Journal of Ecology**, 1997.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., BRISCOE, D.A. **Fundamentos de genética da conservação**. Editora SBG, 2008.
- FRYXELL, P. A. Mode of reproduction of higher plants. **The Botanical Review**, v. 23, n. 3, p. 135–233, 1957. Springer.
- GABRIEL, K., SOKAL, R. A New Statistical Approach to Geographic Variation Analysis. **Systematic Biology**, v. 18, n. 3, p. 259–278, 1969.
- DE GIOVANNI, R., BERNACCI, L.C., DE SIQUEIRA, M.F., ROCHA, F.S. The real task of selecting records for ecological niche modelling. **Natureza e Conservacao**, v. 10, n. 2, p. 139–144, 2012.
- GOLIN, V., SANTOS-FILHO, M., PEREIRA, M.J.B. Dispersal and predation of araticum seeds in the Cerrado of Mato Grosso, Brazil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 101–107, 2011.
- GOTTSBERGER, G. The reproductive biology of primitive angiosperms. **Taxon**, v. 37, n. 3, p. 630–642, 1988.
- GOTTSBERGER, G. Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona spp.* (Annonaceae) in Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 167, p. 165–187, 1989a.
- GOTTSBERGER, G. Comments on flower evolution and beetle pollination in the genera *Annona* and *Rollinia* (Annonaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 167, n. 167, p. 189–194, 1989b.
- GOTTSBERGER, G. Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. **Plant Species Biology**, v. 14, p. 143–152, 1999.
- GOUDET, J. Hierfstat, a package for R to compute and test variance components and F-statistics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 184–186, 2005.
- GRIMALDI, M.C., CROUAU-ROY, B. Microsatellite allele homoplasy due to variable flanking sequences. **J. Mol. Evol.**, v. 44, p. 336–340, 1997.
- GUSSON, E., SEBBENN, A.M., KAGEYAMA, P.Y. Sistema de reprodução em populações de *Eschweilera ovata* (Cambess.) Miers. **Revista Árvore**, v. 30, n. 4, p. 491–502, 2006.
- HALLATSCHKEK, O., HERSEN, P., RAMANATHAN, S., NELSON, D.R. Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. **PNAS**, v. 104, n. 50, p. 19926–19930,

2007.

HAMRICK, J.L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. **Isozymes in plant biology**, v. 4, p. 87–105, 1989. Dioscorides Oregon.

HAMRICK, J.L., MURAWSKI, D.A., NASON, J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Plant Ecology**, v. 107, n. 1, p. 281–297, 1993.

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

HARLAN, J. **Crops and man**. Madison: American Society of Agronomy, 1975.

HARTL, D.L., CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HEYWOOD, J. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 22, p. 335–355, 1991.

HIJMANS, R.J. raster: Geographic Data Analysis and Modeling. , 2015. R package.

HOLDEREGGER, R., BUEHLER, D., GUGERLI, F., MANEL, S. Landscape genetics of plants. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 12, p. 675–683, 2010.

INOUE, M.H., SANTANA, D.C., POSSAMAI, A.P.S., VA, L.E., PEREIRA, M.J.B., PEREIRA, K.M. Potencial alelopático de *Annona crassiflora*: efeitos sobre plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 489–498, 2010.

JANZEN, D.H., MARTIN, P.S. Neotropical Anachronisms : The Fruits the *Gomphotheres Ate*. **Science**, v. 215, n. 1, p. 19–27, 1982.

JIMÉNEZ-VALVERDE, A., LOBO, J.M., HORTAL, J. Not as good as they seem: The importance of concepts in species distribution modelling. **Diversity and Distributions**, v. 14, n. 6, p. 885–890, 2008.

JOMBART, T. Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, n. 11, p. 1403–1405, 2008.

JUDD, W., CAMPBELL, C., KELLOGG, E., STEVENS, P., DONOGHUE, M. **Sistemática vegetal**. 3<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

- KALINOWSKI, S.T., TAPER, M.L., MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099–1106, 2007.
- KARASAWA, M.M., DORNELAS, M., ARAÚJO, A.C., OLIVEIRA, G. Biologia e genética dos sistemas reprodutivos. In: KARASAWA, M.M (Org.); **Diversidade reprodutiva de plantas**. p.26–52, 2009. Ribeirão Preto: Editora SBG.
- KIILL, L.H.P., COSTA, J.G. DA. Biologia floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 851–856, 2003.
- KIMURA, M., WEISS, G.H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, v. 49, n. 4, p. 561, 1964.
- KNOWLES, L.L., CARSTENS, B.C., KEAT, M.L. Coupling Genetic and Ecological-Niche Models to Examine How Past Population Distributions Contribute to Divergence. **Current Biology**, v. 17, n. 11, p. 940–946, 2007.
- KULEUNG, C., BAENZIGER, P.S., DWEIKAT, I. Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 6, p. 1147–1150, 2004.
- LACERDA, A.E.B., KANASHIRO, M., SEBBENN, A.M. Long-pollen Movement and Deviation of Random Mating in a Low-density Continuous Population of a Tropical Tree *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, v. 40, n. 4, p. 462–470, 2008.
- LANDE, R., SCHEMSKE, D.. The Evolution of Self-Fertilization and Inbreeding Depression in Plants. I. Genetic Models. **Evolution**, v. 39, n. 1, p. 24–40, 1985.
- LEBERG, P.L. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 11, p. 2445–2449, 2002. Wiley Online Library.
- LEGENDRE, P. Autocorrelation: trouble or new paradigm? **Ecology**, v. 74, n. 6, p. 1659–1673, 1993.
- LEGENDRE, P., DALE, M.R.T., FORTIN, M.J., GUREVITCH, J., HOHN, M., MYERS, D. The consequences of spatial structure for the design and analysis of ecological field surveys. **Ecography**, v. 25, n. March, p. 601–615, 2002.
- LEGENDRE, P., FORTIN, M.-J. Spatial pattern and ecological analysis. **Vegetatio**, v. 80, p. 107–138, 1989.

- LEWIS, P.O., ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data, 2001.
- LITT, M., LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 397, 1989.
- LORA, J., HERRERO, M., HORMAZA, J.I. Stigmatic receptivity in a dichogamous early-divergent angiosperm species, *Annona cherimola* (Annonaceae): Influence of temperature and humidity. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 2, p. 265–274, 2011.
- LOVELESS, M.D., HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Reviews**, v. 15, p. 65–95, 1984.
- MANEL, S., SCHWARTZ, M.K., LUIKART, G., TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 4, p. 189–197, 2003.
- MARSHALL, D., ELLSTRAND, N.C. Selection in *Raphanus sativus*: experimental data on nonrandom fertilization, maternal choice, and consequences of multiple paternity. **The American Naturalist**, v. 127, n. 4, p. 446–461, 1986.
- MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUIK, L.E.B., PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639–655, 1998.
- MATSUKI, Y., TOMITA, M., ISAGI, Y. Pollination efficiencies of insects visiting *Magnolia obovata*, as determined by single-pollen genotyping. In: ISAGI, Y., SUYAMA, Y. (Orgs.); **Single-pollen genotyping**, Ecological Research Monographs. Tokyo: Springer Japan p.17–32, 2011.
- MEGLÉCZ, E., ANDERSON, S.J., BOURGUET, D., BUTCHER, R., CALDAS, A., CASSEL-LUNDHAGEN, A., D'ACIER, A.C., DAWSON, D.A., FAURE, N., FAUVELOT, C., FRANCK, P., HARPER, G., KEYGHOBADI, N., KLUETSCH, C., MUTHULAKSHMI, M., NAGARAJU, J., PATT, A., PÉTÉNIAN, F., SILVAIN, J.F., WILCOCK, H.R. Microsatellite flanking region similarities among different locos within insect species. **Insect Molecular Biology**, v. 16, p. 175–185, 2007.
- MEIRMANS, P.G. The trouble with isolation by distance. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 12, p. 2839–2846, 2012.
- MELO, D.L.B. **Dispersão, fenologia e conservação de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)** Departamento de Ciências Florestais, 2009. Lavras: Universidade Federal

de Lavras.

MIYAZAKI, Y., ISAGI, Y. Pollen flow and the interpopulation genetic structure of *Heloniopsis orientalis* on the forest floor as determined using microsatellite markers.

**Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 718–723, 2000.

MORGANTE, M., OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 175–182, 1993. Wiley Online Library.

MOURA, T.M., SEBBENN, A.M., CHAVES, L.J., et al. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum spp.* do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 82, p. 143–150, 2009.

MURAWSKI, D.A., HAMRICK, J.L. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v. 67, n. 2, p. 167–174, 1991.

MURAWSKI, D.A., HAMRICK, J.L. Mating system and phenology of *Ceiba pentandra*. **Journal of Heredity**, v. 83, p. 401–404, 1992.

MURAWSKI, D.A., HAMRICK, J.L., HUBBELL, S.P., FOSTER, R.B. Mating systems of two *Bombacaceous* trees of a neotropical moist forest. **Oecologia**, v. 82, n. 4, p. 501–506, 1990.

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

NASON, J.D., HERRE, E. A., HAMRICK, J.L. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. **Nature**, v. 5504, n. 1979, p. 1996–1998, 1998.

NAVES, R. V, ALMEIDA NETO, J.X., ROCHA, M.R., MORGES, J.D., CARVALHO, G.C., CHAVES, L.J. Determinação de características físicas em frutos e teor de nutrientes, em folhas e no solo, de três espécies frutíferas de ocorrência natural nos Cerrados de Goiás. **Anais Esc. Agron e Vet.**, v. 25, n. 2, p. 107–114, 1995.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American naturalist**, v. 106, p. 283–292, 1972.

NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 12, p. 3321–3323, 1973.

OKSANEN, J., BLANCHET, F., KINDT, R., JENSEN, P., MINCHIN, P.R., O'HARA, R.B., SIMPSON, G.L., SOLYMOS, P., STEVENS, M.H.H., WAGNER, H. Vegan: Community Ecology Package. **R package version**, 2015.

VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W.F., WILLS, D.P.M. & SHIPLEY, P. Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.

OSORIO, F., VALLEJOS, R. SpatialPack: Package for analysis of spatial data. **R package version 0.2-3**, 2014.

PARADIS, E., CLAUDE, J., STRIMMER, K. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. **Bioinformatics**, v. 20, n. 2, p. 289–290, 2004.

PEAKALL, R., GILMORE, S., KEYS, W., MORGANTE, M., RAFALSKI, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular biology and evolution**, v. 15, n. 10, p. 1275–1287, 1998.

PEREIRA, M.F. Desenvolvimento de marcadores moleculares SSR e caracterização genética de populações naturais de *Annona crassiflora* Mart. do Estado de Goiás. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 2, 2007.

PEREIRA, M.F., BANDEIRA, L.F., BLANCO, A. J. V, CIAMPI, A. Y., COELHO, A. S.G. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart. a brazilian Cerrado fruit tree species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 6, p. 1329–1331, 2008.

POCHEVILLE, A. The Ecological Niche: History and Recent Controversies. **Handbook of Evolutionary Thinking in the Sciences**. Dordrecht: Springer Netherlands, p.547–586, 2015.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Viena, Austria: **R Foundation for Statistical Computing**, 2014.

RAMSAY, L., MACAULAY, M., CARDLE, L., MORGANTE, M., DEGLI, I., STEPHANIA, M., ELENA, P., WAYNE, W.R. Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. **Plant Journal**, v. 17, n. 4, p. 415–425, 1999.

RANGEL, T.F.L.V.B., DINIZ-FILHO, J.A.F., BINI, L.M. Towards an integrated computational tool for spatial analysis in macroecology and biogeography. **Global Ecology and Biogeography**, v. 15, n. 4, p. 321–327, 2006.

RATTER, J.A., BRIDGEWATER, S., RIBEIRO, J.F., DIAS, T.A.B., SILVA, M.R. Distribuicao das especies lenhosas da fitofisionomia cerrado sentido restrito nos estados compreendidos no bioma cerrado. **Boletim do Herbario Ezechias Paulo Heringer**, v. 5, p. 5–43, 2000.

- RAVEN, P., EVERT, R. & EICHHORN, S.. **Biologia Vegetal**. 7<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007.
- RITLAND, K. Correlated-matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v. 43, p. 848–859, 1989.
- RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent locos. **Heredity**, v. 88, n. 4, p. 221–228, 2002.
- RITLAND, K., JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent locos. **Heredity**, v. 47, n. 1, p. 35–52, 1981.
- ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. (Org.); **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. p.627, 2006. Viçosa: Editora UFV.
- ROESLER, R., CATHARINO, R.R., MALTA, L., EBERLIN, M., PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1048–1054, 2007.
- SALGADO-LABOURIAU, M.L., BARBERI, M., FERRAZ-VICENTINI, K.R., PARIZZI, M.G. A dry climatic event during the late Quaternary of tropical Brazil. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 99, n. 2, p. 115–129, 1998.
- SANMIGUEL, P., TIKHONOV, A, JIN, Y.K., TCHOULSKAIA, N., ZAKHAROV, D., MELAKE-BERHAN, A., SPRINGER, P.S., EDWARDS, K.J., LEE, M., AVRAMOVA, Z., BENNETZEN, J.L. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 274, n. 5288, p. 765–768, 1996.
- SANTOS, L.P.S., BOAVENTURA, M.A. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 387–391, 1994.
- SCHNABEL, A. Parentage analysis in plants: mating systems, gene flow, and relative fertilities. **Advances in Molecular Ecology**. p.173–189, 1998.
- SEBBENN, A.M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Rev. do Inst. Flor**, v. 14, n. 2, p. 115–132, 2002.
- SEBBENN, A.M. **Análises de genética de populações em espécies arbóreas**. 2005.
- SEOANE, C.E.S., KAGEYAMA, P.Y., SEBBENN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal

- na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, n. 57, p. 123–139, 2000.
- SHAW, P.W., PIERCE, G.J., BOYLE, P.R. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 3, p. 407–417, 1999.
- SILVA, E.A.A., MELO, D.L.B., DAVIDE, A.C., et al. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, v. 99, p. 823–830, 2007.
- SILVA, E.P. **Caracterização do desenvolvimento de frutos do Cerrado: marolo (*Annona crassiflora* Mart.) e gabioba (*Campomanesia pubescens*)**. Departamento de Ciência dos Alimentos, UFLA, 2009.
- SILVA JÚNIOR, C. **100 árvores do Cerrado**. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2005.
- SIMPSON, M. **Plant Systematics**. Elsevier Academic Press, 2006.
- SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, v. 39, n. 1, p. 53–65, 1985.
- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 787, 1987.
- SLATKIN, M. A Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 162, n. 139, p. 457–462, 1995.
- SMOUSE, P., PEAKALL, R. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. **Heredity**, v. 82, n. 561-573, 1999.
- SOARES, F.P., PAIVA, R., NOGUEIRA, R.C., STEIN, V.C., SANTANA, J.R.F. **Marolo**. Lavras: Editora UFLA, 2009.
- SOARES, T.N., CHAVES, L.J., DE CAMPOS TELLES, M.P., DINIZ-FILHO, J.A.F., RESENDE, L.V. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. **Genetica**, v. 132, n. 1, p. 9–19, 2008.
- SOARES, T.N., DINIZ-FILHO, J. A. F., NABOUT, J.C., TELLES, M.P.C. Patterns of genetic variability in central and peripheral populations of *Dipteryx alata* (Fabaceae) in the Brazilian Cerrado. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, n. 5, p. 1315–1324, 2014.
- SOBERÓN, J., PETERSON, A. Interpretation of models of fundamental ecological niches and species’ distributional areas. **Biodiversity Informatics**, v. 2, p. 1–10, 2005.

- SOBRINHO, R.B. **Potencial de exploração de anonáceas do Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.
- SOKAL, R.R., WARTENBERG, D.E. A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. **Genetics**, v. 105, p. 219–237, 1983.
- SOUZA, V., LORENZI, H. **Botânica sistemática**. 2<sup>o</sup> ed. Odessa: Instituto Plantarum, 2008.
- SUN, M., RITLAND, K. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. **Heredity**, v. 80, n. 2, p. 225–232, 1998.
- TELLES, M.P.C., VALVA, F.D., BANDEIRA, L.F., COELHO, A.S.G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasil. Bot.**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.
- TERRIBILE, L.C., LIMA-RIBEIRO, M.S., ARAÚJO, M.B., et al. Areas of climate stability of species ranges in the Brazilian cerrado: Disentangling uncertainties through time. **Natureza e Conservação**, v. 10, n. 2, p. 152–159, 2012.
- VALDES, A. M., SLATKIN, M., FREIMER, N.B. Allele frequencies at microsatellite locos: The stepwise mutation model revisited. **Genetics**, v. 133, n. 3, p. 737–749, 1993.
- VEKEMANS, X., HARDY, O.J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 921–935, 2004.
- WARD, M., DICK, C.W., GRIBEL, R., LOWE, A.J. To self, or not to self... a review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. **Heredity**, v. 95, n. 4, p. 246–54, 2005.
- WEIR, B. **Genetic Data Analysis: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer, 1990.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**. Sunderland: Sinauer, 1996.
- WEIR, B.S., COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, p. 1358–1370, 1984. JSTOR.
- WERNECK, F.P., NOGUEIRA, C., COLLI, G.R., SITES, J.W., COSTA, G.C. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. **Journal of Biogeography**, v. 39, n. 9, p. 1695–1706, 2012.

- WORKMAN, P.L., NISWANDER, J.D. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. **American Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 1, p. 24, 1970.
- WRIGHT, S. Systems of mating I. The biometrical relations between parent and offspring. **Genetics**, v. 6, n. 11, p. 111–123, 1920.
- WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97–158, 1931.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, n. 2, p. 114, 1942.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, n. 1, p. 323–354, 1950.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, n. 3, p. 395–420, 1965.
- YOUNG, H.J. Beetle Pollination of *Dieffenbachia longispatha* (Araceae). **American Journal of Botany**, v. 73, n. 6, p. 931, 1986.
- YOUNG, H.J. Neighborhood size in a beetle pollinated tropical aroid: effects of low density and synchronous flowering. **Oecologia**, v. 76, n. 3, p. 461–466, 1988a.
- YOUNG, H.J. Differential Importance of Beetle Species Pollinating *Dieffenbachia Longispatha* (Araceae). **Ecology**, v. 69, n. 3, p. 832–844, 1988b.
- ZUCCHI, M.I., BRONDANI, R.P. V, PINHEIRO, J.B., CHAVES, L.J., COELHO, A.S.G., VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC. in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 449, 2003.
- ZUCCHI, M.I., BRONDANI, R.P. V, PINHEIRO, J.B., BRONDANI, C., VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus spp.* to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 512–513, 2002.

## APÊNDICE

- Apêndice A.** Tamanho amostral usado em cada um dos estudos presentes no capítulo 01. O  $n$  é diferente, pois na análise de paternidade são removidas as sementes com dados perdidos em pelo menos três locos. 146
- Apêndice B.** Resultado da análise de paternidade conduzida no programa *CERVUS* mostrando a distância entre todas as sementes e os doadores de pólen que tiveram a paternidade atribuída a 95% de confiança. .... 147
- Apêndice C.** Localidade e tamanho amostral das subpopulações naturais de *Annona crassiflora* no Cerrado brasileiro. .... 153
- Apêndice D.** Estimativas dos parâmetros genéticos populacionais; diversidade genética ( $H_e$ ), riqueza alélica ( $A_r$ ), coeficiente de endogamia ( $f$ ) e das variáveis ambientais; adequabilidade no presente ( $P_I$ ), adequabilidade no passado ( $LGM_S$ ) e proporção de remanescentes (Reman.) das subpopulações naturais de *A. crassiflora* no Cerrado brasileiro..... 154

**Apêndice A.** Tamanho amostral usado em cada um dos estudos presentes no capítulo 01. O  $n$  é diferente, pois na análise de paternidade são removidas as sementes com dados perdidos em pelo menos três locos.

Matrizes	Tamanho amostral	
	Sistema de cruzamento	Análise de paternidade
M01	23	20
M02	22	11
M03	23	23
M04	23	22
M05	23	22
M06	23	23
M07	23	19
M08	23	23
M09	23	23
M10	23	23
M11	23	23
M12	23	22
M13	23	23
M14	23	23
M15	23	23
M16	23	22
M17	23	23
M18	23	23
M19	23	22
M20	23	22
<b>Total</b>	<b>459</b>	<b>435</b>

**Apêndice B.** Resultado da análise de paternidade conduzida no programa *CERVUS* mostrando a distância entre todas as sementes e os doadores de pólen que tiveram a paternidade atribuída a 85% de confiança.

ID	Sementes		Doadores de pólen (95% de confiança)			Distância (m)
	Latitude	Logitude	ID	Latitude	Logitude	
M1F2.4	-15,20447	-48,73066	VLPGO 36	-15,20236	-48,73092	236,126
M1F5.2	-15,20447	-48,73066	VLPGO 41	-15,20358	-48,73042	102,018
M1F5.5	-15,20447	-48,73066	VLPGO 87	-15,20381	-48,72839	254,624
M2F1.11	-15,20455	-48,73055	VLPGO 04	-15,20465	-48,73092	40,885
M2F1.12	-15,20455	-48,73055	VLPGO 04	-15,20465	-48,73092	40,885
M2F1.15	-15,20455	-48,73055	VLPGO 04	-15,20465	-48,73092	40,885
M2F1.13	-15,20455	-48,73055	VLPGO 66	-15,20389	-48,72900	181,836
M2F1.24	-15,20455	-48,73055	Matriz02	-15,20455	-48,73055	0,000
M3F3.3	-15,20433	-48,73025	VLPGO 65	-15,20372	-48,72894	155,593
M3F1.10	-15,20433	-48,73025	VLPGO 66	-15,20389	-48,72900	142,811
M3F2.22	-15,20433	-48,73025	Matriz03	-15,20433	-48,73025	0,000
M4F1.22	-15,20451	-48,73015	VLPGO 04	-15,20465	-48,73092	83,725
M4F1.18	-15,20451	-48,73015	VLPGO 65	-15,20372	-48,72894	156,281
M4F1.19	-15,20451	-48,73015	VLPGO 65	-15,20372	-48,72894	156,281
M4F1.17	-15,20451	-48,73015	VLPGO 65	-15,20372	-48,72894	156,281
M4F1.13	-15,20451	-48,73015	Matriz03	-15,20433	-48,73025	22,710
M4F1.5	-15,20451	-48,73015	Matriz03	-15,20433	-48,73025	22,710
M5F1.15	-15,20455	-48,72998	VLPGO 11	-15,20432	-48,73035	47,428
M5F3.24	-15,20455	-48,72998	VLPGO 32	-15,20438	-48,72972	33,792
M5F2.6	-15,20455	-48,72998	VLPGO 40	-15,20350	-48,73053	130,726
M5F1.12	-15,20455	-48,72998	VLPGO 60	-15,20378	-48,72925	116,210
M5F2.7	-15,20455	-48,72998	VLPGO 69	-15,20394	-48,72894	129,994
M5F2.13	-15,20455	-48,72998	VLPGO 94	-15,20397	-48,72831	190,777
M5F2.3	-15,20455	-48,72998	Matriz16	-15,20486	-48,72880	131,225
M5F1.10	-15,20455	-48,72998	Matriz20	-15,20499	-48,72722	300,169

Continua...

**Apêndice B.** Continuação

M5F1.23	-15,20455	-48,72998	Matriz20	-15,20499	-48,72722	300,169
M5F1.21	-15,20455	-48,72998	Matriz20	-15,20499	-48,72722	300,169
M6F3.1	-15,2045	-48,72974	VLPGO 24	-15,20450	-48,72990	17,168
M6F7.11	-15,2045	-48,72974	VLPGO 33	-15,20435	-48,72978	17,315
M6F1.23	-15,2045	-48,72974	VLPGO 40	-15,20350	-48,73053	139,692
M6F1.11	-15,2045	-48,72974	VLPGO 40	-15,20350	-48,73053	139,692
M6F1.15	-15,2045	-48,72974	VLPGO 52	-15,20372	-48,72986	87,479
M6F2.13	-15,2045	-48,72974	VLPGO 52	-15,20372	-48,72986	87,479
M6F4.14	-15,2045	-48,72974	VLPGO 88	-15,20378	-48,72833	170,994
M6F4.20	-15,2045	-48,72974	VLPGO 94	-15,20397	-48,72831	164,693
M6F4.7	-15,2045	-48,72974	Matriz12	-15,20448	-48,72848	135,220
M7F2.16	-15,20443	-48,72955	VLPGO 17	-15,20450	-48,73022	71,957
M7F2.10	-15,20443	-48,72955	VLPGO 33	-15,20435	-48,72978	26,571
M7F1.6	-15,20443	-48,72955	VLPGO 41	-15,20358	-48,73042	132,383
M7F1.13	-15,20443	-48,72955	VLPGO 49	-15,20372	-48,72983	84,380
M7F2.22	-15,20443	-48,72955	Matriz16	-15,20486	-48,72880	93,609
M8F6.23	-15,20446	-48,72925	VLPGO 17	-15,20450	-48,73022	103,821
M8F3.12	-15,20446	-48,72925	VLPGO 32	-15,20438	-48,72972	50,795
M8F5.2	-15,20446	-48,72925	VLPGO 32	-15,20438	-48,72972	50,795
M8F6.10	-15,20446	-48,72925	VLPGO 39	-15,20350	-48,73053	173,783
M8F3.1	-15,20446	-48,72925	VLPGO 60	-15,20378	-48,72925	75,835
M8F4.9	-15,20446	-48,72925	VLPGO 71	-15,20392	-48,72883	75,151
M8F4.1	-15,20446	-48,72925	VLPGO 71	-15,20392	-48,72883	75,151
M8F4.4	-15,20446	-48,72925	VLPGO 71	-15,20392	-48,72883	75,151
M8F7.12	-15,20446	-48,72925	VLPGO 72	-15,20403	-48,72889	61,709
M8F7.2	-15,20446	-48,72925	VLPGO 72	-15,20403	-48,72889	61,709
M8F2.10	-15,20446	-48,72925	VLPGO 72	-15,20403	-48,72889	61,709
M8F1.22	-15,20446	-48,72925	VLPGO 74	-15,20397	-48,72889	66,671
M8F2.20	-15,20446	-48,72925	VLPGO 78	-15,20400	-48,72847	97,905
M8F7.19	-15,20446	-48,72925	Matriz12	-15,20448	-48,72848	82,653

Continua...

**Apêndice B.** Continuação

M9F2.20	-15,20427	-48,72916	VLPGO 44	-15,20353	-48,73025	143,133
M9F2.3	-15,20427	-48,72916	VLPGO 44	-15,20353	-48,73025	143,133
M9F2.14	-15,20427	-48,72916	VLPGO 44	-15,20353	-48,73025	143,133
M9F1.14	-15,20427	-48,72916	VLPGO 69	-15,20394	-48,72894	43,026
M9F1.10	-15,20427	-48,72916	VLPGO 69	-15,20394	-48,72894	43,026
M9F1.2	-15,20427	-48,72916	VLPGO 69	-15,20394	-48,72894	43,026
M9F1.5	-15,20427	-48,72916	VLPGO 69	-15,20394	-48,72894	43,026
M9F1.15	-15,20427	-48,72916	VLPGO 69	-15,20394	-48,72894	43,026
M9F2.16	-15,20427	-48,72916	Matriz10	-15,20427	-48,72880	38,629
M9F1.18	-15,20427	-48,72916	Matriz15	-15,20472	-48,72863	75,750
M10F3.1	-15,20427	-48,72888	VLPGO 25	-15,20443	-48,72982	110,593
M10F3.5	-15,20427	-48,72888	VLPGO 25	-15,20443	-48,72982	110,593
M10F2.14	-15,20427	-48,72888	VLPGO 28	-15,20462	-48,72972	105,645
M10F4.4	-15,20427	-48,72888	VLPGO 31	-15,20440	-48,72965	92,346
M10F1.8	-15,20427	-48,72888	VLPGO 66	-15,20389	-48,72900	47,491
M10F1.3	-15,20427	-48,72888	VLPGO 66	-15,20389	-48,72900	47,491
M10F3.7	-15,20427	-48,72888	VLPGO 91	-15,20389	-48,72825	72,648
M10F2.6	-15,20427	-48,72888	VLPGO 94	-15,20397	-48,72831	62,512
M10F4.19	-15,20427	-48,72888	Matriz10	-15,20427	-48,72880	0,000
M10F2.20	-15,20427	-48,72888	Matriz16	-15,20486	-48,72880	65,605
M11F9.4	-15,20425	-48,72859	VLPGO 03	-15,20415	-48,73147	308,875
M11F4.11	-15,20425	-48,72859	VLPGO 05	-15,20457	-48,73072	230,898
M11F10.15	-15,20425	-48,72859	VLPGO 25	-15,20443	-48,72982	133,194
M11F2.17	-15,20425	-48,72859	VLPGO 36	-15,20236	-48,73092	326,293
M11F5.22	-15,20425	-48,72859	VLPGO 36	-15,20236	-48,73092	326,293
M11F1.10	-15,20425	-48,72859	VLPGO 40	-15,20350	-48,73053	224,052
M11F8.11	-15,20425	-48,72859	VLPGO 66	-15,20389	-48,72900	59,555
M11F7.24	-15,20425	-48,72859	VLPGO 66	-15,20389	-48,72900	59,555
M11F10.11	-15,20425	-48,72859	VLPGO 78	-15,20400	-48,72847	30,546
M11F10.12	-15,20425	-48,72859	Matriz10	-15,20427	-48,72880	22,643

Continua...

**Apêndice B.** Continuação

M11F7.16	-15,20425	-48,72859	Matriz13	-15,20462	-48,72842	45,005
M12F4.9	-15,20448	-48,72848	VLPGO 35	-15,20430	-48,72968	130,663
M12F1.21	-15,20448	-48,72848	VLPGO 40	-15,20350	-48,73053	245,291
M12F3.16	-15,20448	-48,72848	VLPGO 40	-15,20350	-48,73053	245,291
M12F1.9	-15,20448	-48,72848	VLPGO 40	-15,20350	-48,73053	245,291
M12F4.22	-15,20448	-48,72848	VLPGO 40	-15,20350	-48,73053	245,291
M12F2.20	-15,20448	-48,72848	VLPGO 53	-15,20367	-48,72975	163,534
M12F2.16	-15,20448	-48,72848	VLPGO 69	-15,20394	-48,72894	77,660
M12F5.16	-15,20448	-48,72848	Matriz12	-15,20448	-48,72848	0,000
M12F5.17	-15,20448	-48,72848	Matriz12	-15,20448	-48,72848	0,000
M12F5.6	-15,20448	-48,72848	Matriz12	-15,20448	-48,72848	0,000
M12F5.12	-15,20448	-48,72848	Matriz12	-15,20448	-48,72848	0,000
M12F4.2	-15,20448	-48,72848	Matriz18	-15,20471	-48,72792	65,306
M13F2.7	-15,20462	-48,72842	VLPGO 24	-15,20450	-48,72990	159,367
M13F3.22	-15,20462	-48,72842	VLPGO 32	-15,20438	-48,72972	141,603
M13F3.8	-15,20462	-48,72842	VLPGO 32	-15,20438	-48,72972	141,603
M13F3.7	-15,20462	-48,72842	VLPGO 32	-15,20438	-48,72972	141,603
M13F1.15	-15,20462	-48,72842	VLPGO 44	-15,20353	-48,73025	230,874
M13F2.23	-15,20462	-48,72842	VLPGO 47	-15,20372	-48,72986	184,063
M13F2.20	-15,20462	-48,72842	VLPGO 94	-15,20397	-48,72831	73,085
M13F3.17	-15,20462	-48,72842	VLPGO 97	-15,20408	-48,72831	60,952
M13F3.16	-15,20462	-48,72842	VLPGO 97	-15,20408	-48,72831	60,952
M13F1.20	-15,20462	-48,72842	Matriz13	-15,20462	-48,72842	0,000
M13F1.18	-15,20462	-48,72842	Matriz18	-15,20471	-48,72792	54,577
M14F2.4	-15,20461	-48,72853	VLPGO 08	-15,20468	-48,73058	220,479
M14F2.22	-15,20461	-48,72853	VLPGO 09	-15,20470	-48,73045	206,264
M14F1.6	-15,20461	-48,72853	VLPGO 36	-15,20236	-48,73092	357,970
M14F2.18	-15,20461	-48,72853	VLPGO 37	-15,20319	-48,73069	280,552
M14F2.1	-15,20461	-48,72853	VLPGO 39	-15,20350	-48,73053	247,382
M14F1.8	-15,20461	-48,72853	VLPGO 74	-15,20397	-48,72889	80,726

Continua...

**Apêndice B.** Continuação

M14F1.21	-15,20461	-48,72853	VLPGO 74	-15,20397	-48,72889	80,726
M14F1.17	-15,20461	-48,72853	VLPGO 75	-15,20403	-48,72875	68,887
M14F2.7	-15,20461	-48,72853	VLPGO 79	-15,20394	-48,72856	74,108
M14F2.3	-15,20461	-48,72853	VLPGO 97	-15,20408	-48,72831	63,338
M14F2.13	-15,20461	-48,72853	Matriz16	-15,20486	-48,72880	40,151
M15F1.1	-15,20472	-48,72863	VLPGO 37	-15,20319	-48,73069	279,003
M15F1.7	-15,20472	-48,72863	VLPGO 37	-15,20319	-48,73069	279,003
M15F1.14	-15,20472	-48,72863	VLPGO 39	-15,20350	-48,73053	244,705
M15F1.11	-15,20472	-48,72863	VLPGO 79	-15,20394	-48,72856	86,652
M15F1.20	-15,20472	-48,72863	VLPGO 88	-15,20378	-48,72833	109,486
M15F1.18	-15,20472	-48,72863	VLPGO 88	-15,20378	-48,72833	109,486
M15F1.17	-15,20472	-48,72863	Matriz03	-15,20433	-48,73025	179,158
M15F1.13	-15,20472	-48,72863	Matriz14	-15,20461	-48,72853	16,271
M15F1.9	-15,20472	-48,72863	Matriz14	-15,20461	-48,72853	16,271
M16F3.7	-15,20486	-48,7288	VLPGO 05	-15,20457	-48,73072	208,234
M16F3.5	-15,20486	-48,7288	VLPGO 37	-15,20319	-48,73069	274,993
M16F3.17	-15,20486	-48,7288	VLPGO 47	-15,20372	-48,72986	170,217
M16F3.2	-15,20486	-48,7288	VLPGO 78	-15,20400	-48,72847	101,899
M16F1.11	-15,20486	-48,7288	VLPGO 78	-15,20400	-48,72847	101,899
M16F2.4	-15,20486	-48,7288	VLPGO 97	-15,20408	-48,72831	101,363
M16F1.16	-15,20486	-48,7288	Matriz18	-15,20471	-48,72792	95,888
M17F1.20	-15,20448	-48,72812	VLPGO 40	-15,20350	-48,73053	280,424
M17F1.19	-15,20448	-48,72812	VLPGO 91	-15,20389	-48,72825	67,180
M18F2.2	-15,20471	-48,72792	VLPGO 17	-15,20450	-48,73022	247,542
M18F2.5	-15,20471	-48,72792	VLPGO 25	-15,20443	-48,72982	205,829
M18F2.23	-15,20471	-48,72792	VLPGO 30	-15,20450	-48,72963	185,322
M18F2.18	-15,20471	-48,72792	VLPGO 70	-15,20394	-48,72897	141,412
M18F2.12	-15,20471	-48,72792	VLPGO 70	-15,20394	-48,72897	141,412
M18F1.6	-15,20471	-48,72792	VLPGO 77	-15,20408	-48,72842	87,777
M18F2.8	-15,20471	-48,72792	VLPGO 91	-15,20389	-48,72825	97,918

Continua...

**Apêndice B.** Continuação

M18F1.22	-15,20471	-48,72792	VLPGO 97	-15,20408	-48,72831	81,094
M18F1.20	-15,20471	-48,72792	VLPGO 97	-15,20408	-48,72831	81,094
M18F2.24	-15,20471	-48,72792	Matriz08	-15,20446	-48,72925	145,395
M19F2.4	-15,20463	-48,72754	VLPGO 45	-15,20350	-48,73019	311,269
M19F1.15	-15,20463	-48,72754	VLPGO 82	-15,20394	-48,72842	121,137
M19F2.7	-15,20463	-48,72754	Matriz08	-15,20446	-48,72925	184,459
M19F1.24	-15,20463	-48,72754	Matriz13	-15,20462	-48,72842	94,433
M19F2.16	-15,20463	-48,72754	Matriz13	-15,20462	-48,72842	94,433
M19F2.19	-15,20463	-48,72754	Matriz15	-15,20472	-48,72863	117,387
M20F3.17	-15,20499	-48,72722	VLPGO 91	-15,20389	-48,72825	164,934
M20F3.14	-15,20499	-48,72722	VLPGO 91	-15,20389	-48,72825	164,934
M20F1.6	-15,20499	-48,72722	VLPGO 97	-15,20408	-48,72831	154,113
M20F1.9	-15,20499	-48,72722	VLPGO 97	-15,20408	-48,72831	154,113
M20F1.7	-15,20499	-48,72722	VLPGO 97	-15,20408	-48,72831	154,113
M20F2.4	-15,20499	-48,72722	Matriz02	-15,20455	-48,73055	360,651
M20F2.12	-15,20499	-48,72722	Matriz08	-15,20446	-48,72925	225,656
M20F1.2	-15,20499	-48,72722	Matriz12	-15,20448	-48,72848	146,613
M20F2.10	-15,20499	-48,72722	Matriz16	-15,20486	-48,72880	170,153
M20F1.8	-15,20499	-48,72722	Matriz16	-15,20486	-48,72880	170,153

---

**Apêndice C.** Localidade e tamanho amostral das subpopulações naturais de *Annona crassiflora* no Cerrado brasileiro

<b>Código</b>	<b>Localidade</b>	<b>n</b>	<b>Lat</b>	<b>Long</b>
CHS	Chapadão do Sul - MS	32	-19.00388	-52.10931
ITA	Itarumã - GO	32	-18.72243	-51.40616
RIV	Rio Verde - GO	32	-17.32011	-51.55827
SER	Serranópolis - GO	32	-17.97388	-52.48944
CHG	Chapada dos Guimarães - MT	20	-15.40036	-55.82967
CRI	Costa Rica - MS	32	-18.40172	-53.33315
HID	Hidrolândia - GO	15	-17.15833	-49.49000
PIP	Pirapora - MG	32	-17.47342	-45.36958
POT	Portelândia - GO	33	-17.35041	-52.60777
SCI	Bambuú, Serra da Canastra - MG	35	-20.10067	-45.95694
BAG	Barra do Garças - MT	35	-15.70781	-52.64347
COR	Coromandel - MG	22	-18.43547	-47.20917
LEB	Leopoldo de Bulhões - GO	31	-16.60090	-48.76710
ARA	Araguari - MG	32	-18.53784	-48.42895
COG	Comandador Gomes - MG	32	-19.67272	-48.99474
PER	Perdizes - MG	32	-19.35180	-47.36516
CAN	Candeias - MG	32	-20.79669	-45.30299
VLP	Vila Propício – GO	32	-15.20300	-48.73242
AGE	Águas Emendadas - DF	32	-15.58467	-47.66561
POS	Posse-GO	32	-14.18185	-46.34370
PTU	Paracatu-MG	32	-17.06706	-47.07411
ALP	Alto Paraiso-GO	32	-14.08082	-47.51600
CAB	Campos Belos-GO	32	-12.98610	-46.51933
FAS	Fazenda Alecrim, Selvíria-MS	30	-20.19618	-51.72039
URU	Urucuaia-MG	32	-16.12480	-45.60240

**Apêndice D.** Estimativas dos parâmetros genéticos populacionais; diversidade genética ( $H_e$ ), riqueza alélica ( $Ar$ ), coeficiente de endogamia ( $f$ ) e das variáveis ambientais; adequabilidade no presente ( $P_t$ ), adequabilidade no passado ( $LGM_s$ ) e proporção de remanescentes (Reman.) das subpopulações naturais de *A. crassiflora* no Cerrado brasileiro.

Subpop.	$H_e$	$Ar$	$f$	$P_t$	$LGM_s$	PCNM	Reman.
CHS	0,834	8,383	0,048	0,923	0,830	0,280	0,170
ITA	0,779	7,483	0,123	0,946	0,810	0,264	0,190
RIV	0,819	8,909	-0,013	0,978	0,880	0,277	0,220
SER	0,831	8,680	0,039	0,985	0,875	0,301	0,420
CHG	0,830	9,111	0,094	0,857	0,825	0,011	0,840
CRI	0,823	9,577	0,057	0,881	0,880	0,300	0,370
HID	0,750	5,990	-0,013	0,973	0,808	-0,008	0,300
PIP	0,667	5,751	0,058	0,928	0,678	-0,158	0,700
POT	0,821	8,118	0,110	0,959	0,920	0,300	0,400
SCI	0,708	5,136	-0,003	0,963	0,703	-0,085	0,050
BAG	0,744	8,532	0,068	0,928	0,959	0,190	0,670
COR	0,636	5,075	0,003	0,974	0,752	-0,200	0,210
LEB	0,704	6,945	0,099	0,998	0,731	-0,170	0,150
ARA	0,756	6,908	0,081	0,977	0,560	-0,113	0,180
COG	0,751	7,878	-0,008	0,997	0,866	0,025	0,240
PER	0,771	7,590	0,060	0,966	0,743	-0,142	0,140
CAN	0,603	5,545	0,158	0,908	0,548	-0,053	0,000
VLP	0,634	5,377	0,040	0,996	0,804	-0,159	0,510
AGE	0,734	6,217	-0,005	0,996	0,713	-0,246	0,350
POS	0,673	5,588	0,106	0,997	0,848	-0,160	0,650
PTU	0,664	6,538	0,041	0,921	0,698	-0,251	0,790
ALP	0,669	5,958	-0,009	0,992	0,876	-0,182	0,970
CAB	0,577	5,240	0,056	0,938	0,720	-0,101	0,580
FAS	0,693	7,010	0,011	0,911	0,900	0,275	0,230
URU	0,519	4,759	-0,018	0,935	0,730	-0,195	0,780