

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
EVOLUÇÃO

Felipe Oliveira Gouveia

Estrutura genética intrapopulacional de *Annona crassiflora* MART. (Annonaceae) em áreas conservada e antropizada do Cerrado

Orientador (a): Dra Thannya Nascimento Soares

Co-orientador (a): Dra. Rosane Garcia Collevatti

GOIÂNIA – GO

JUNHO - 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
EVOLUÇÃO

Felipe Oliveira Gouveia

Estrutura genética intrapopulacional de *Annona*
***crassiflora* MART. (Annonaceae) em área conservada e**
antropizada do Cerrado

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução para obtenção do título de Mestre.

Orientador (a): Dra. Thannya Nascimento Soares

Co-orientador (a) Dra. Rosane Garcia Collevatti

GOIÂNIA – GO

JUNHO - 2011

FELIPE OLIVEIRA GOUVEIA

Estrutura genética intrapopulacional de *Annona crassiflora* MART. (Annonaceae) em áreas conservada e antropizada do Cerrado

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução para obtenção do título de Mestre.

Dra. Thannya Nascimento Soares (Orientadora)

Dra. Rosane Garcia Collevatti (Co-orientadora)

Dra. Mariana Pires de Campos Telles (Membro interno/ Banca examinadora)

Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho (Membro externo/ Banca examinadora)

APROVADO: 21 de Junho de 2011

DEDICATÓRIA

A minha Tia/avó Maria de Oliveira Campos

OFEREÇO

À minha mãe

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Hildo e Mariângela que nunca mediram esforços para que eu realizasse os meus sonhos. Pelo amor incondicional que me fortalece a cada dia e me torna uma pessoa mais realizada

A minha orientadora e amiga Dra. Thannya Nascimento Soares por ter me oferecido muitas oportunidades, pelas horas de atenção e disponibilidade em ensinar e aconselhar em todos os momentos. Pela seriedade e confiança depositada em mim.

A minha co-orientadora Dra. Rosane Garcia Collevatti pelos preciosos ensinamentos, por acompanhar cada etapa desta dissertação. Sinto-me honrado por essa convivência, tenha consigo minha imensa admiração.

A professora Dra. Mariana Pires de Campos Telles que me ajudou a crescer na graduação e por fazer parte da banca examinadora

Aos meus amigos, colegas do Laboratório de Genética & Biodiversidade da UFG, obrigado por me aturar e por fazer meus dias de trabalho mais agradáveis.

Ao professor Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho por ter cedido os *primers* deste estudo e aceitado a fazer parte da banca examinadora.

Ao laboratório de Melhoramento de plantas da Agronomia da UFG pelo uso do seqüenciador, em especial a Priscila Rangel por ter me ensinado a analisar os dados no software.

A pesquisadora Tereza Borba do laboratório de biotecnologia da Embrapa *Arroz e Feijão* por ter cedido horários no seqüenciador, principalmente nestes últimos meses, esta ajuda foi essencial para finalizar a coleta de dados.

Aos estudantes do programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Advaldo Carlos Sousa Neto, Thiago Bernardi e Jacqueline Lima pela imensa ajuda na interpretação dos dados e confecção dos mapas das coletas.

A Capes, CNPq e FAPEG, pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização dessa dissertação.

RESUMO

A estrutura genética espacial é a distribuição não aleatória de genótipos dentro de uma população como o resultado de fluxo gênico, deriva genética e seleção. *Annona crassiflora* (Annonaceae) é uma árvore hermafrodita e alógama. A sua polinização é do tipo entomófila, sendo realizada por besouros do gênero *Cyclocephala* (Scarabeidae). A dispersão de sementes é do tipo zoocórica, realizada principalmente por *Tapirus terrestris*. O objetivo desse estudo foi estudar e comparar a diversidade e a estrutura genética espacial em duas populações de *Annona crassiflora*, uma em área de conservação e outra em área antropizada. Foram analisadas 97 plantas provenientes de uma população da Estação Ecológica Águas Emendadas (ESECAE) no Distrito Federal e 87 plantas em Padre Bernardo (PBE) em Goiás, com base em oito locos microssatélites desenvolvidos para a espécie. Os produtos de PCR foram submetidos à análise de fragmentos no seqüenciador ABI3100, para obtenção dos genótipos. Para os oito locos analisados, o número total de alelos foi igual a 126, variando entre 6 e 23 com uma média de 15,75 alelos por loco. A riqueza alélica, por população foi maior na população de ESECAE do que na população de PBE. Foram encontrados valores de f significativos para PBE, o que sugere que existe endogamia, ou seja, há cruzamento de indivíduos aparentados dentro dessa população. Na população de ESECAE foi observado valor de f não significativo indicando ausência de endogamia nesta população, ou seja, as frequências alélicas estão seguindo as proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A análise de estrutura genética espacial na população de ESECAE revelou uma tendência de pequena magnitude à estruturação genética espacial ($b=-0,00478$; $R^2=0,001$; $p=0,0257$). Na população de PBE, a análise de estrutura genética espacial revelou que o coeficiente de parentesco está relacionado com o logaritmo da distância, apresentando um modelo de fluxo gênico de isolamento por distância ($b=-0,01958$; $R^2 = 0,001$; $p < 0,0001$). O valor global de F foi significativo e igual a 0,309 e o valor de θ apresentou-se alto e significativo (0,239). Foi encontrada uma pequena diferença entre as estimativas de θ e R_{st} ($p=0,064$). Sob o teste de *bottleneck* as populações não se mostraram em equilíbrio Mutação-Deriva. O estudo revela que a fragmenta o pode estar influenciando negativamente a dinâmica evolutiva da espécie. A forte endogamia na área fragmentada, alta diferencia o genética entre as popula es e estrutura o espacial dos indivíduos permite inferir que a conserva o da espécie   de extrema importância, pois além do intenso extrativismo, a espécie possui baixas taxas de frutifica o e problemas de germina o. Eventos que favorecem ainda mais probabilidade de extin o.

ABSTRACT

The spatial genetic structure is the non-random distribution of genotypes within a population as the outcome of gene flow, genetic drift and selection. *Annona crassiflora* (Annonaceae) is a hermaphroditic tree. Pollination is entomophilous, being carried by beetles of the genus *Cyclocephala* (Scarabeidae). Seed dispersal is zoochorous mainly done by *Tapirus terrestris*. This study aimed to compare the genetic diversity and spatial genetic structure in two populations of *Annona crassiflora*, one in a conserved area and other in a disturbed area. We analyzed 97 plants from a population at the Ecological Station of Águas Emendadas (ESECAE) in the Federal District (conserved area) and 87 plants in Padre Bernardo (PBE), Goiás (disturbed area), based on eight microsatellite loci developed for the species. PCR products were electrophoresed in ABI3100 automatic DNA sequencer to obtain the genotypes. For a total of eight loci, the number of alleles ranged from 6 to 23 with an average of 15,75 alleles per locus. The allelic richness per population was larger in ESECAE population than PBE population. Expected and observed heterozygosity values were $0,614 \pm 0,145$ and $0,499 \pm 0,181$, significant f values were found for PBE, showing nonrandom mating. In ESECAE population expected and observed heterozygosity values were $0,746 \pm 0,134$ and $0,723 \pm 0,173$ and f value were not significant, suggesting random mating, the allele frequencies are following the expected ratios for the Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0,003$). Analysis of spatial genetic structure in ESECAE population, showed little absence of autocorrelation ($b = -0,00478$; $p < 0,05$ $R^2 = 0,001$, $p = 0,0257$). In PBE population, autocorrelation analysis showed that kinship is slightly related to the logarithm of distance, showing a gene flow pattern like isolation by distance ($b = -0,01958$; $p < 0,05$ $R^2 = 0,001$, $p < 0,0001$). The significant value of θ (0,239) showed that populations are highly differentiated. Also, under the bottleneck test, a population does not showed up in mutation-drift equilibrium, revealing events of recent bottleneck effects. The study suggests that the species may be highly affected by fragmentation and disturbance of their natural habitats augmenting inbreeding, and leading to high genetic differentiation among populations and significant spatial structure, that may be the outcome of restriction to gene flow.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Variabilidade e estrutura genética: Importância para a conservação.....	1
Estrutura genética espacial e fluxo gênico.....	2
Marcadores Microsatélites.....	4
Bioma Cerrado.....	6
Espécie de estudo.....	8
OBJETIVOS.....	12
METODOLOGIA.....	13
Área de coleta.....	13
Obtenção dos dados moleculares.....	15
Análise estatístico-genéticas.....	17
RESULTADOS.....	21
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXO.....	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto geral do araticumzeiro adulto (*Annona crassiflora*).....9
- Figura 2.** Adaptação de flores de *Annonaceae* à polinização por besouros: *Guatteria neglecta* polinizada por *Nitidulidae* pequenos e *Circulinidae* predando as pétalas. *Annona coriacea* e *A. crassiflora* polinizadas por *Dynastinae* e *Curculionidae* e *Cerambycidae* predando as pétalas (Gottsberger, 1999).....10
- Figura 3.** Fases de germinação de sementes de araticum *Annona crassiflora*. (Fonte: E. A. Amaral da Silva, 2004).....10
- Figura 4.** Mapa do Brasil com os pontos de coleta das duas populações naturais de *Annona crassiflora*.....14
- Figura 5.** Distribuição da frequência alélica para quatro locos microsatélites (Acr1, 26, 44, 10) analisados em duas populações naturais de *Annona crassiflora*. No eixo x encontra-se o tamanho dos alelos e no eixo y a frequência dos alelos.....22
- Figura 6.** Distribuição da frequência alélica para quatro locos microsatélites (Acr19, 34, 22, 20) analisados em duas populações naturais de *Annona crassiflora*. No eixo x encontra-se o tamanho dos alelos e no eixo y a frequência dos alelos.....23
- Figura 7.** Distribuição espacial dos indivíduos de *Annona crassiflora* nas regiões de Águas Emendadas (a) e Padre Bernardo (b).....24
- Figura 8.** Distribuições das distâncias par a par (em metros) entre indivíduos de *Annona crassiflora* das populações de Águas Emendadas e Padre Bernardo.....25
- Figura 9.** Correlograma entre coeficiente de parentesco (*F_{ij}*) e classe de distância dos indivíduos de Águas Emendadas com base em oito marcadores microsatélites. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de aceitação de *H_o* (95%; 10.000 permutações) e a linha continua representa o valor observado do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle *et al.*, 1995.....26
- Figura 10.** Correlograma entre coeficiente de parentesco (*F_{ij}*) e classe de distância dos indivíduos de Padre Bernardo com base em oito marcadores microsatélites. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de aceitação de *H_o* (95%; 10.000 permutações) e a linha

continua representa o valor observado do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle *et al.*, 1995.....26

Figura 11. Distribuição em classes das frequências alélicas (Mode-Shift) utilizando oito locos microssatélites para as duas populações de *Annona crassiflora* segundo o programa Bottleneck. O eixo x encontra-se as classes da frequência e no eixo y a frequência dos alelos.....28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação de oito marcadores microsatélites desenvolvidos para a espécie *Annona crassiflora* (Pereira *et al.*, 2008). São apresentados os tamanhos dos motivos de repetição, seqüências *Forward*, *Reverse* e a temperatura da anelamento (T_a).....15
- Tabela 2.** Conjunto multiplex descrito por Pereira (2007) O triplex é composto por três locos marcados com fluorocromos diferentes.....16
- Tabela 3.** Classes de distância utilizadas para análises de estrutura genética espacial intrapopulacional das duas populações de *Annona crassiflora*.....19
- Tabela 4.** Descrição dos locos com seus respectivos números de indivíduos analisados (N), número de alelos (N_A), heterozigosidade esperada (H_e), observada (H_o), probabilidade de identidade (I) e probabilidade de exclusão de paternidade (Q) para as duas populações de *Annona crassiflora* utilizando oito locos microsatélites.....21
- Tabela 5.** Variabilidade genética nas duas populações de *Annona crassiflora*, baseada em oito marcadores microsatélites. (N) número de indivíduos; (NA) número médio de alelos; riqueza alélica (R_A) heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e índice de fixação (f).....24
- Tabela 6.** Parâmetros de estrutura genética espacial intrapopulacional e vizinhança genética entre as duas populações de *Annona crassiflora* com base em oito marcadores microsatélites. F_I – valor de F_{ij} para a primeira classe de distância; b – inclinação da regressão; Sp – parâmetro de força da estrutura genética espacial; Nb – vizinhança genética.....27
- Tabela 7.** Estrutura genética populacional de duas populações de *Annona crassiflora*, baseada na análise de variância das freqüências alélicas e análise de variância do tamanho dos alelos para os oito marcadores microsatélites.....27
- Tabela 8.** Teste de Wilcoxon para avaliar gargalo genético sob diferentes modelos de mutação: modelo de mutação de infinitos alelos (IAM), modelo de mutação por passo (SMM) e modelo duas fases (TPM) para a população de Águas Emendadas utilizando oito marcadores microsatélites.....28

Tabela 9. Teste de Wilcoxon para avaliar gargalo genético sob diferentes modelos de mutação: modelo de mutação de infinitos alelos (IAM), modelo de mutação por passo (SMM) e modelo duas fases (TPM) para a população de Padre Bernardo utilizando oito marcadores microssatélites.....29

INTRODUÇÃO

Variabilidade e estrutura genética: Importância para conservação

O conhecimento dos níveis de variabilidade genética, forma de reprodução e distribuição espacial dos genótipos dentro das populações são aspectos fundamentais quando se pretende a conservação *in situ* de uma espécie. A persistência de populações viáveis, do ponto de vista evolutivo, é crucial para a preservação dos ecossistemas e da diversidade biológica. As populações naturais possuem em geral altos níveis de variabilidade genética intrapopulacional, que é introduzida continuamente por mutação, migração ou fluxo gênico (Soulé & Wilcox, 1980) podendo assegurar um alto potencial adaptativo e evolutivo para contrapor os efeitos gerados pelas estocasticidades ambientais. A redução da diversidade genética pode conduzir uma espécie à extinção, sendo, portanto, uma das principais ameaças à sua existência (Frankham *et al.*, 2008; Soulé, 1986).

O estudo da variabilidade genética é de suma importância para avaliar a probabilidade de persistência dessas espécies. Pequenas populações estão sujeitas a um rápido declínio em número e à extinção local, devido a três principais razões: perda da variabilidade genética, causada principalmente por endogamia e/ou deriva genética, variações nas taxas de nascimento e mortalidade (flutuações demográficas) e flutuações ambientais de toda ordem (Frankham *et al.*, 2008). A recuperação de ecossistemas, conservação e manejo são possíveis com o conhecimento dos conceitos teóricos da ecologia e da genética de populações de forma a orientar as ações a serem efetuadas e definir parâmetros adequados para seu monitoramento (Kageyama, 1998).

A distribuição da variabilidade genética está associada à forma como os alelos e genótipos estão distribuídos no tempo e no espaço, seja entre populações distintas, ou dentro de um grupo local. Ela pode se manifestar entre populações geograficamente distintas e assim como a diversidade genética, é influenciada por fatores como o modo de reprodução, distribuição espacial dos indivíduos e fatores evolutivos (Loveless & Hamrick, 1984).

As denominadas “estatísticas F hierárquicas” de Wright descrevem a estrutura genética das populações, em que: F_{ST} mede a correlação das frequências alélicas entre indivíduos dentro de subpopulações e reflete o grau de diversidade genética entre elas; F_{IT} mede a correlação entre as frequências alélicas dentro de indivíduos, considerando

todos os indivíduos da população; Fis mede a correlação entre genes dentro de indivíduos e dentro de subpopulações (Wright, 1951). Sendo assim, a estrutura genética da população refere-se à heterogeneidade na distribuição dos alelos nos genótipos entre as populações (Loveless & Hamrick, 1984).

Estrutura genética espacial e fluxo gênico

Estrutura genética espacial é a distribuição espacial não aleatória de genótipos de indivíduos dentro de uma população (Vekmans & Hardy, 2004). Essa distribuição espacial é influenciada por processos evolutivos tais como competição inter e intra-específica e heterogeneidade ambiental, densidade de indivíduos adultos e sistema de reprodução, resultando em genótipos agregados (Schapcott, 1995). Tal estrutura pode ser determinada, ainda, pela dispersão de pólen e sementes (Loiselle *et al.*, 1995), porque a frequência alélica na próxima geração será influenciada pelo número de indivíduos que efetivamente trocarão alelos entre si.

A polinização e a dispersão de sementes são dois estágios independentes e críticos do fluxo gênico. Usualmente, esses dois estágios envolvem a interação de fatores abióticos e de animais que propiciam a dispersão de pólen e sementes. Polinização e dispersão são processos ecológicos críticos que afetam diretamente o sucesso reprodutivo das plantas, podendo sua ruptura, levar a perda da espécie (Corlett & Turner, 1997; Wunderlee Jr., 1997).

Alterações ambientais podem levar à extinção das plantas, tanto através de ações diretas sobre elas quanto através de efeitos indiretos nos polinizadores e/ou nos dispersores. A dispersão de diásporos é um dos processos que podem acelerar a regeneração de florestas degradadas e é fundamental para a restauração da biodiversidade (Wunderlee Jr., 1997). Muitas vezes, os polinizadores e dispersores são capazes de transportar uma grande quantidade de pólen e sementes a longas distâncias (Hardesty *et al.*, 2006), dessa forma, podendo conectar os fragmentos florestais e favorecer a colonização de novas áreas (Murcia, 1995).

As relações entre planta, polinizador e dispersor são muito importantes na estruturação de comunidades, pois podem influenciar na distribuição espacial, na riqueza e na abundância de espécies, na estrutura trófica e na dinâmica fenológica (Heithaus, 1974; Bawa *et al.*, 1985). A estrutura genética espacial intrapopulacional

avalia principalmente a dispersão restrita de sementes, uma vez que para a existência de um evento de fluxo gênico faz-se necessário o estabelecimento de sementes no habitat (Hardy *et al.*, 2006).

A dispersão do pólen e de sementes entre as populações é conhecida como fluxo gênico. Este mecanismo reduz a diferenciação genética entre as populações e pode promover o aumento da variabilidade genética em populações receptoras (Wright, 1931). O fluxo gênico, segundo Slatkin (1981), é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam na movimentação de alelos entre as populações. O seu papel na diversidade genética entre e dentro das populações depende tanto da distribuição geográfica da espécie, quanto da importância dos fatores evolucionários (Slatkin, 1987).

O estudo do fluxo gênico é fundamental para entender o processo de reprodução em plantas como também para o planejamento de conservação populacional das mesmas. Estudos teóricos sugerem que um fluxo gênico restrito reduz o tamanho efetivo da população e causa depressão por endogamia (Slatkin, 1985b). Em geral, quando se tem um fluxo gênico restrito este pode ser resultado de auto-fecundação ou por acasalamento entre parentes podendo causar depressão por endogamia se tornando uma ameaça para a variabilidade genética em populações de plantas (Wang *et al.*, 1999).

Segundo Hamrick & Loveless (1986), populações de espécies que apresentam polinização realizada por animais que percorrem longas distâncias apresentam maior diversidade genética que aquelas polinizadas pelo vento ou por animais que percorrem curtas distâncias, onde o fluxo gênico é limitado. Já a dispersão das sementes pelo vento ou por animais representa maior diversidade genética dentro das populações do que a dispersão por barocoria.

O fluxo gênico pode ser quantificado indiretamente a partir da análise da estrutura genética das populações utilizando o valor de F_{ST} , assumindo um modelo de fluxo gênico em ilhas (Wright, 1943b), ou seja, onde há um equilíbrio entre migração e deriva genética. Apesar da sua grande importância para os estudos genético-populacionais, a avaliação da estrutura genética populacional baseada no estimador F_{ST} compõe apenas as medidas de caracterização primária da variabilidade genética existente. Deste modo, para fazer inferências sobre os processos microevolutivos que atuam nas populações, é necessário que sejam efetuados estudos com base em técnicas mais elaboradas como, por exemplo, as de análise de autocorrelação espacial (Diniz-

Filho, 2002). A estrutura espacial das populações naturais pode ser resultado de processos atuais (principalmente fluxo gênico) ou ser reflexo de processos que atuaram no passado, ao longo da história evolutiva (Epperson, 1997; 2003).

A autocorrelação espacial tem sido usualmente mensurada com o uso do coeficiente *I* de Moran (Legendre, 1993). O valor deste coeficiente varia de -1,0 a +1,0 indicando que quando seus valores são elevados as localidades próximas no espaço tendem a ser mais parecidas entre si ou que as localidades mais distantes são mais diferentes (Legendre, 1993). Além deste coeficiente, a estrutura espacial dos genótipos também tem sido analisada a partir de estimativas de coeficiente de parentesco ou de coancestralidade que auxiliam na detecção de indivíduos aparentados e permitindo inferir sobre o alcance do fluxo gênico e o tamanho do grupo de vizinhança, informações que são importantes para a gestão de programas de conservação (Loiselle *et al.*, 1995; Erickson & Hamrick, 2003).

As técnicas moleculares aliadas à técnica de autocorrelação espacial possibilitaram o aprimoramento dos métodos de análise e permitiram a estimativa do fluxo gênico aparente dentro e entre populações, com base na estrutura genética espacial das plantas (Epperson, 2003; Vekmans & Hardy, 2004; Diniz-filho *et al.*, 2008).

Marcadores Microsatélites

Sequências Microsatélites, também conhecidas como sequências simples repetitivas (SSR – Simple Sequence Repeats) ou repetições curtas em tandem (STR – Short Tandem Repeats), são abundantes e bem distribuídas no genoma de eucariotos (Tautz & Renz, 1984; Weber & Wong, 1993) e menos comuns no genoma de procariotos (Ellegren, 2004). Estão presentes tanto em regiões que codificam proteínas quanto em regiões não codantes do DNA (Tóth *et al.*, 2000).

Os marcadores microsatélites são altamente polimórficos (Tautz, 1989; Weber *et al.*, 1989) uma vez que apresentam grande diversificação no tipo (mononucleotídeo à hexanucleotídeo que podem ser perfeitos, imperfeitos ou compostos) e no número de repetições encontrados nas diferentes espécies. Isto ocorre devido à alta taxa de mutação nessas regiões, variando 10^{-2} a 10^{-6} eventos por loco por geração, comparado a regiões codificantes do genoma, que apresentam taxas de mutação entre 10^{-9} a 10^{-10} (Goldstein, 1999).

Os marcadores microssatélites que são classificados como perfeitos, não possui a seqüência de repetição interrompida por nenhuma base diferente das que compõem seu motivo (por exemplo, TATATATATATATATA) enquanto que nos imperfeitos verifica-se uma ou mais bases diferentes entre os motivos de repetição (por exemplo, TATATATACTATATA). Os compostos são formados por seqüências repetitivas adjacentes com diferentes composições de motivos (por exemplo, TATATATATAGTGTGTGTGT) (Weber, 1990).

Os modelos propostos para explicar o mecanismo de mutação dos microssatélites são em sua maioria baseados no modelo de mutação por passos (SMM – *Stepwise Mutation Model*), onde é assumido que a mudança no estado alélico ocorre pela perda ou ganho de uma unidade de repetição (Ohta & Kimura, 1973). Esses modelos são preferidos para estudos de estrutura populacional em relação ao Modelo de infinitos alelos, que considera que cada novo alelo mutante é um novo estado alélico não existente anteriormente na população (Kimura & Crow, 1964).

Outro modelo proposto para microssatélite é o modelo de mutação de duas fases “*Two phase mutation model*” (Di Rienzo, 1994), que diferentemente dos modelos citados anteriormente, assume que a maioria das mudanças mutacionais resulta em aumento ou decréscimo de uma unidade repetitiva (uma fase) com probabilidade igual a p mas mutações envolvendo mais de uma unidade repetitiva podem ocorrer (duas fases) com probabilidade igual a $1-p$ geralmente menor que p .

Há indícios que o genoma de plantas tenha, em média, dez vezes menos microssatélites dinucleotídicos do que o genoma humano. Wang e colaboradores (1999) observaram que os motivos de repetição mais abundantes dentre 54 espécies de plantas foram (AT) n , seguida por (A) n , (AG) n , (AAT) n , (AAC) n , (CAG) n , (AAG) n , (AATT) n , (AAAT) n e (AC) n .

Os marcadores microssatélites tornaram-se rapidamente o mais utilizado para mapeamentos de genomas e, posteriormente, também em estudos de outras áreas como a genética de populações, genética forense e genética da conservação, permitindo a avaliação detalhada de parentesco e variabilidade genética entre indivíduos, populações e espécies. (Ellegren, 2000; Zane *et al.*, 2002; Ellegren, 2004). Dada a sua ampla aplicação, tem havido um aumento extraordinário no interesse em marcadores

microsatélites, como é indicado pelo grande número de artigos publicados nos últimos anos que envolvem seu uso.

Bioma Cerrado

O Cerrado ocupa mais de 200 milhões de hectares sendo o segundo maior bioma do país, ocupando 23% do território nacional sendo superado apenas pela Amazônia (Klink & Machado, 2005). Abrange os Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Goiás, Tocantins, Maranhão, Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e o Distrito Federal, e faz fronteira com a Floresta Amazônica, o Pantanal Mato-Grossense, a Mata Atlântica e a Caatinga. A região dos Cerrados apresenta duas estações climáticas bem definidas: uma seca e a outra chuvosa. Ocorre predominantemente em regiões de solos ácidos e pobres em nutrientes, caracterizando-se por apresentar fisionomias variáveis: campo limpo, campo sujo, campo rupestre, cerrado *sensu stricto* e Cerradão (Ribeiro *et al.*, 2008).

A biodiversidade do Cerrado é elevada. O número de plantas vasculares é superior àquele encontrado na maioria dos biomas: plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós somam mais de 7.000 espécies. Quarenta e quatro por cento da flora é endêmica e, nesse sentido, o Cerrado é a mais diversificada savana tropical do mundo, apresentando uma grande diversidade de habitat e alternância de espécies (Klink & Machado, 2005). Em um inventário florístico realizado por Ratter e colaboradores (2003), concluiu-se que das 914 espécies de árvores e arbustos registradas em 315 localidades de Cerrado, somente 300 espécies ocorrem em mais de oito localidades, e 614 espécies foram encontradas em apenas uma localidade, evidenciando forte endemismo.

A despeito dessa elevada biodiversidade, a atenção voltada à conservação do Cerrado tem sido muito menor do que aquela dispensada a outros biomas como a Amazônia ou a Mata Atlântica. Somente 2,2% do bioma Cerrado estão legalmente protegidos e existem estimativas indicando que pelo menos 20% das espécies endêmicas e ameaçadas permanecem fora dos parques e reservas existentes (Machado *et al.*, 2004).

O Cerrado é um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (Myers *et al.*, 2000). Pelo menos 137 espécies de animais que ocorrem no Cerrado estão ameaçadas de

extinção em função da grande expansão da agricultura e intensa exploração local de produtos nativos (Fundação Biodiversitas, 2003). Ao lado da mata atlântica o Cerrado é uma das ecorregiões mais alteradas do país. Cerca de 57% da área já foram completamente destruídos e a metade das áreas remanescentes estão bastante alteradas, podendo não mais servir à conservação da biodiversidade. A taxa anual de retirada da vegetação original do bioma é alarmante chegando a 2,2 milhões de hectares/ano (Machado *et al.*, 2004).

A ocupação do Cerrado, de forma mais pronunciada, iniciou-se no século XVIII com assentamentos destinados a oferecer infra-estrutura para a exploração do ouro e pedras preciosas. Porém, o aumento demográfico começou a se intensificar dois séculos depois, em 1930, com a construção da ferrovia entre São Paulo (SP) e Anápolis (GO), o que favoreceu a fixação de povoados em terras férteis nos vales fluviais. Isto se intensificou na década de 40, durante o governo Vargas, através do projeto de Colonização dos Cerrados, com o estabelecimento de colônias agrícolas em Dourados (MS) e Ceres (GO). Em 1960 com a inauguração de Brasília, consolidou-se uma ocupação que iria, em menos de 20 anos, contribuir para que o Cerrado se transformasse na maior região de expansão agropecuária do Brasil (Silva, 2000).

Atualmente, cerca de 80% do cerrado está ocupado com áreas agrícolas, como pastagem cultivadas, culturas anuais e perenes, ou simplesmente degradado sem utilidade agrícola (Machado *et al.*, 2004). Nesse contexto, o desmatamento levando a uma fragmentação desse bioma provoca uma diminuição no tamanho das populações e isolamento entre elas, podendo comprometer a persistência, longo prazo, de muitas espécies. Populações pequenas e isoladas são mais suscetíveis a extinção por processos ecológicos, como flutuação imprevisíveis na taxa de natalidade e mortalidade, e por processos genéticos. Em razão da grande perda de variabilidade genética, populações com o tamanho reduzido podem perder seu potencial evolutivo, ou seja, sua capacidade de responder a variações ambientais aumentando a chance de serem eliminadas (Ellstrand & Elam, 1993).

Devido à grande quantidade de cobertura vegetal original do Cerrado que está sendo perdida, existe uma urgência em implementar planos viáveis para a definição de áreas de conservação no sentido de preservar a biodiversidade deste bioma (Diniz-Filho *et al.*, 2007).

Espécie de estudo

A família Annonaceae compreende aproximadamente 120 gêneros, tendo distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo. A maioria dos representantes é constituída por plantas lenhosas (árvores e arbustos), com folhas inteiras, de disposição alterna dística, sem estípulas. Possuem flores isoladas ou reunidas em inflorescências, grandes ou de tamanho pequeno hemicíclicas, hermafroditas, diclamídeas, com perianto diferenciado em cálice e corola, trímero (três sépalas e três pétalas) carnosos. Apresenta numerosos estames dispostos em espiral e ovário súpero com carpelos numeroso em forma de espiral, livres entre si apocárpico, com um a muitos óvulos. O fruto apocárpico é baciforme e a semente possui endosperma ruminado. As sementes têm período de germinação muito lento (Joly, 2002). Nesta família, os três gêneros mais importantes são: *Annona*, *Rollinia* e *Abernona* (Manica *et al.*, 1997).

O gênero é composto por várias espécies selvagens conhecidas por cabeça-de-negro, pinha, annona, ata, cherimólia, marolo, fruta-do-conde, pinha-azedo, graviola, condessa (Joly, 2002). Neste gênero, incluem-se ata fruta-do-conde ou pinha (*Annona squamosa*), cherimólia (*Annona cherimola* Mill.), condessa (*Annona reticulata* L.), graviola (*Annona muricata* L.), atemólia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), araticum-do-campo (*Annona dióica*), araticum-do-brejo (*Annona paludosa*), cabeça-de-negro (*Annona coriacea*), Llama (*Annona diversifolia*) (Manica *et al.*, 1997) e araticum ou marolo (*Annona crassiflora* Mart.).

O araticum é uma árvore alógama, de 6-8 m de altura, com o diâmetro da copa chegando aos 2-4 m (Figura 1) (Carvalho, 2002). Flores, folhas e ramos com pilosidade marrom-avermelhada. Folhas alternas, simples, pecioladas, sem estípulas. Flores isoladas, axilares, actinomorfas, creme-amareladas internamente, três sépalas livres, seis pétalas livres, numerosos estames, ovário dialicarpelar, súpero com carpelos uniovulados, estigma séssil. Fruto sincárpico marrom-claro externamente e internamente creme-amarelado, sementes com formato elíptico. Possui sistema radicular do tipo axial, que atinge grandes profundidades em busca de água e nutrientes. O tronco é ereto com galhos tortuosos, a casca é corticosa, fendida e grossa. (Carvalho, 2002). Nativo do planalto central brasileiro, o araticum pode ser encontrado nas áreas de Cerradão, Cerrado, Cerrado Denso, Cerrado Ralo e Campo Rupestre. Sua distribuição se dá no

Distrito Federal e nos Estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Tocantins (Maas, 2001).



Figura 1. Aspecto geral do araticumzeiro adulto (*Annona crassiflora*).

As flores apresentam dicogamia protogínica e, por isso, a autofecundação dificilmente ocorre nessa mesma flor ou até na mesma planta (Manica *et al.*, 1997). Nas anonáceas, a polinização geralmente, é do tipo entomófila (Figura 2) com as flores apresentando termogênese (aquecimento ativo no interior da flor), que inicia-se no começo da noite podendo chegar até 10 C acima da temperatura do ar. Essas flores aquecem-se somente uma vez e cai na mesma noite. Por volta das 19 horas, o estigma encontra-se coberto de exsudado transparente que, devido ao aquecimento, exala forte odor para atração de besouros da espécie *Cyclocephala atricapilla*, que penetram na flor, sendo os responsáveis pela polinização (Gottsberger, 1989).

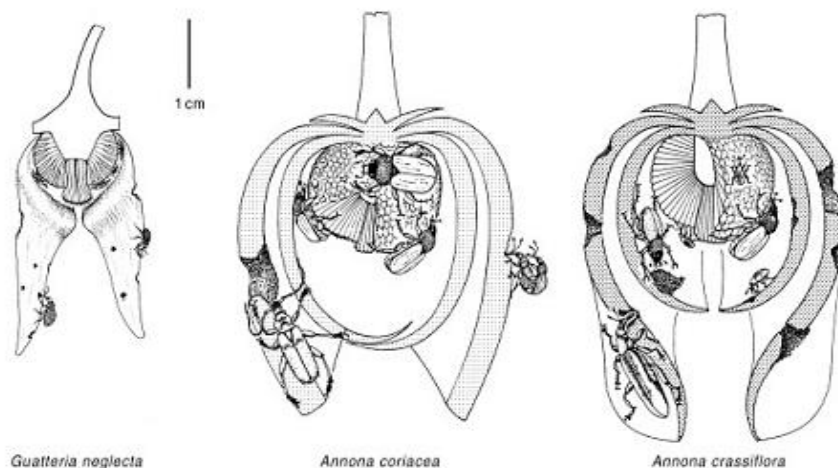


Figura 2. Adaptação de flores de *Annonaceae* à polinização por besouros: *Guatteria neglecta* polinizada por *Nitidulidae* pequenos e *Circulinuidae* predando as pétalas. *Annona coriacea* e *A. crassiflora* polinizadas por *Dynastinae* e *Curculionidae* e *Cerambycidae* predando as pétalas (Gottsberger, 1999).

A família *Annonaceae* tem moderada produção de sementes viáveis, mas de baixo índice de germinação (Vieira & Irber, 1996). A semente de *Annona crassiflora* é relativamente grande, sendo encontradas dentro do gomo, envolvidas pela polpa. Um fruto de mais ou menos 4,5 kg pode render de 150 a 190 unidades. É formada basicamente de amplo endosperma cerebriforme, testa espessa e rígida, hilo aberto e permeável ao ar e a água (Rizzini, 1971). Com tegumento duro e superfície lisa, germina com dificuldade (Figura 3), havendo longo período de dormência; em areia, o início da germinação ocorreu entre 237 e 292 dias (Rizzini, 1971). *A. crassiflora* apresenta problemas de polinização, produção de frutos e baixa germinação, além disto, a planta é alvo de extrativismo, em função de o seu fruto ser muito apreciado pelas comunidades locais (Melo *et al.*, 2002). Estas características levam a uma grande dificuldade de formação de novos indivíduos para a recomposição da população.



Figura 3. Fases de germinação de sementes de araticum *Annona crassiflora*. (Fonte: E. A. Amaral da Silva, 2004).

A eficácia da dispersão pelos diferentes agentes depende de fatores quantitativos e qualitativos das sementes dispersas. Nos fatores quantitativos levam-se em consideração o número de visitas feitas pelos dispersores e o número de sementes dispersas por visita. Por sua vez, os fatores qualitativos contribuem para verificar a probabilidade de uma semente dispersa gerar uma nova planta, além de considerar a qualidade de deposição da semente após passar pelo trato digestório do dispersor (Schupp, 1993).

Dentre os mamíferos que consomem frutos da família Annonaceae, com a possibilidade de dispersarem ou predarem suas sementes, está a anta *Tapirus terrestris*. A anta é dispersora de altas porcentagens de sementes intactas de araticum (Tófoli, 2006). Ela é particularmente importante na estrutura ecológica de várias espécies de plantas, porque pode distribuir variedade e grande quantidade de sementes, portando-se muitas vezes como espécie-chave. Assim sua ausência pode causar rompimento de processos-chave na manutenção da diversidade e funcionamento do ecossistema (Tófoli, 2006).

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi verificar se a diversidade e o padrão de estruturação genética espacial intrapopulacional se mantém em populações de áreas conservadas e antropizadas.

Objetivos específicos

- Estimar a diversidade genética entre e dentro das populações;
- Avaliar o padrão espacial intrapopulacional nas duas populações;
- Estimar o tamanho do grupo de vizinhança genética em cada população;
- Comparar os níveis de diversidade genética e endogamia encontrados nas populações de *A. crassiflora* Mart;
- Verificar se as populações sofreram gargalo genético.

METODOLOGIA

Área de coleta

As coletas foram realizadas em duas regiões de ocorrência da espécie sendo a primeira em uma área de preservação e a outra em uma área antropizada (Figura 4). A área de preservação escolhida foi a Estação Ecológica de Águas Emendadas (ESECAE). A Estação possui 10.547,21 hectares (Decreto nº 11,137 de 16/06/88) e está situada na região de Administrativa VI, Planaltina, nordeste do Distrito Federal, entre as coordenadas 15°32`S - 15°38`S e 47°33`W - 47°33`W e altitude variando entre 1.000-1.1500m (Meirelles et al., 2004). A vegetação e flora da ESECAE tem sido objeto de estudo (Maury *et al.*, 1994; Silva Júnior & Felfili, 1998) que constataram que esta é uma unidade de conservação rica e diversa, muito representativa da flora do Cerrado *stricto sensu* do Distrito Federal e do bioma. Esta grande diversidade foi relacionada, por Felfili (1998), à sua posição geográfica, permeada por nascentes das bacias do Tocantins /Araguaia e do Paraná. Levantamentos apontam que a flora vascular nativa da ESECAE é composta de 1.738 espécies, sendo 612 gêneros e 125 famílias denotando uma elevada riqueza de espécies. Em virtude desses fatores essa área foi escolhida por apresentar características ideais relacionados ao estudo de fluxo gênico.

A outra área de coleta esta localizada no município de Padre Bernardo (GO) a 100 km de Brasília (Figura 4). Tal município ocupa uma área de 3.138km² e possui uma população de 21.514 habitantes sendo que 62% destes estão na área urbana e 38% na área rural. Uma característica peculiar deste município é que atualmente ele possui sete assentamentos de reforma agrária, totalizando aproximadamente seiscentas famílias assentadas. Verifica-se em Padre Bernardo um alto índice de concentração de terra. A principal atividade rural é a pecuária extensiva, que seguindo a lógica desenvolvimentista, ao mesmo tempo em que é a locomotiva da economia local, preenchendo 32,31% do montante arrecadado, é também a grande responsável pela degradação ambiental, substituindo a vegetação nativa por grandes pastagens. Além desta, outras atividades agrícolas se destacam como o cultivo de soja e milho, causando sérios danos ao meio ambiente pelo uso excessivo de agrotóxico, pelo manejo inadequado e pela utilização de tecnologias poupadoras de mão-de-obra, que juntamente com a extração ilegal de madeira e areia se somam à pecuária na geração de prejuízos socioambientais (Aguiar *et al.*, 1994).

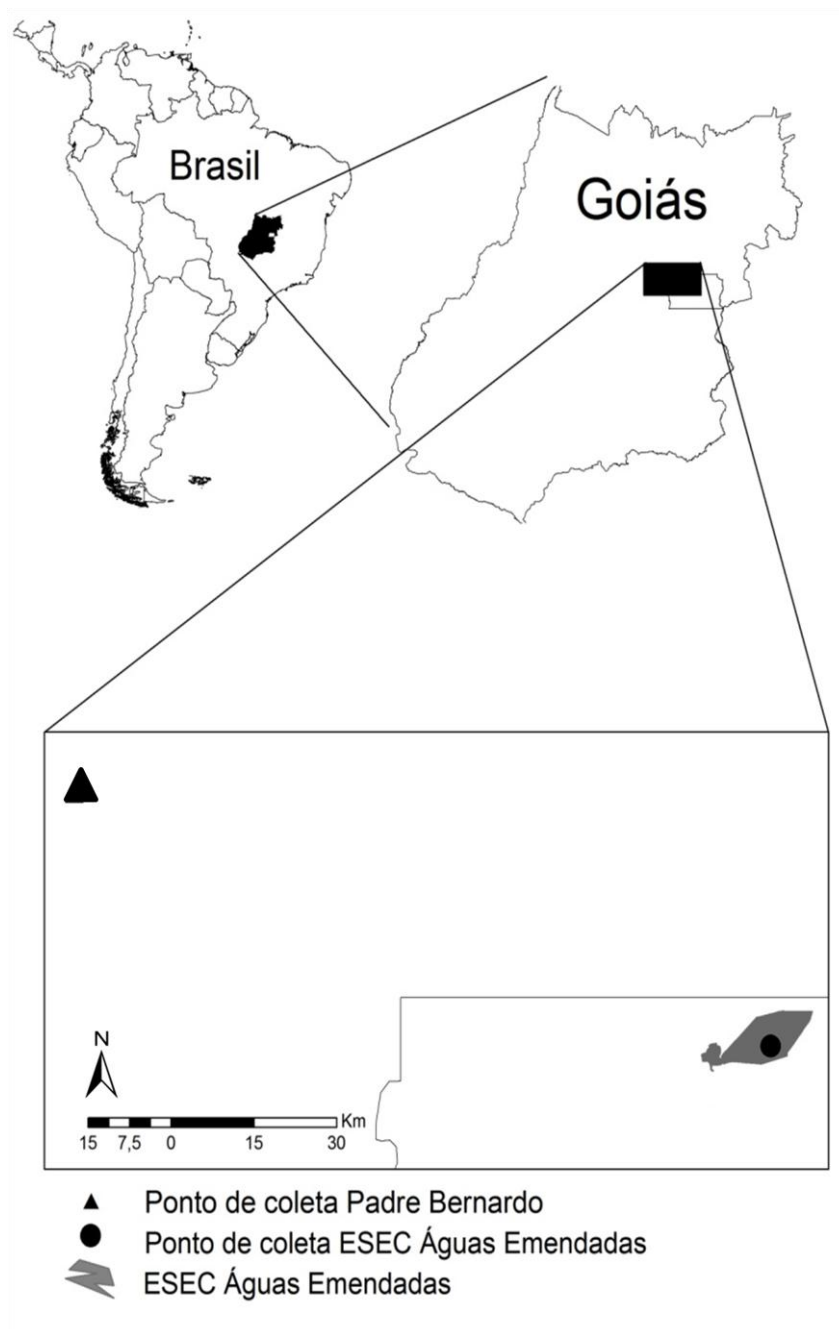


Figura 4. Mapa do Brasil com os pontos de coleta das duas populações naturais de *Annona crassiflora*.

A coleta dos indivíduos foi do tipo varredura onde procurou amostrar um número máximo de indivíduos. Para determinar a distância entre indivíduos, as plantas coletadas foram georreferenciadas pelo Sistema de Posicionamento Global (GPS) e as folhas depositadas em sacos com sílica identificado com o número e a população de origem.

Obtenção dos dados moleculares

Os dados moleculares foram obtidos no Laboratório de Genética & Biodiversidade, situado no Instituto de Ciências Biológicas I da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, GO.

O DNA foi extraído a partir de folhas conforme o protocolo de extração proposto por Doyle & Doyle (1987) e descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998) utilizando o CTAB (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) como detergente do tampão de extração. Após a extração, o DNA total de cada uma das plantas (alíquotas de 3µl) foi submetido à eletroforese horizontal utilizando-se gel de agarose 1% imerso em tampão para eletroforese TBE (Tris Borato EDTA) com o auxílio do marcador de peso molecular *Low - DNA Mass*, da Invitrogen. O gel, depois de corado, foi colocado sobre o trans-iluminador de luz ultravioleta no qual foi fotografado e arquivado. Após a quantificação as amostras de DNA foram diluídas para uma concentração de trabalho de aproximadamente 2,5 ng µL⁻¹.

Para a amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com o DNA de cada indivíduo, foram utilizado oito iniciadores desenvolvidos para a espécie (Pereira *et al.*, 2008) (Tabela 1) Cada reação consistiu de 13 µL contendo: 4,5 ng de DNA, 0,25 µM de cada *primer* (*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 MgCl₂, 0,25mg/mL BSA (*Bovine Serum Albumin*), 1 U Taq DNA polimerase e água ultra pura.

Tabela 1. Relação de oito marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie *Annona crassiflora* (Pereira *et al.*, 2008). São apresentados os tamanhos dos motivos de repetição, seqüências *Forward*, *Reverse* e a temperatura da anelamento (T_a).

Loco	(TC)<i>n</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	T_a
Acr01	20	6FAM-GGCCTTCAAAGGGAGATA	CATGATTCTTCTGCTTCTGTGG	58
Acr10	9	6FAM-TGACGAAAACGAGAAAAGCA	ATGTCCCAACCCAATACAT	58
Acr19	11	HEX-GAGAGCTGGGAGAAGAGCAA	AAAGCTGGGAGAGACGACAC	58
Acr20	21	6FAM-AGAGCCAGAGCCAGTGAGAC	TTGCCTCCATCTCTCAATCC	58
Acr22	18	6FAM-CTGACTCGCTGGCTCTCTCT	CTACAGCCCACATGTGCAAC	58
Acr26	15	HEX-CACGACCAAGGAGAGAGGAG	GGCAACAATCCTGACTCACA	58
Acr34	28	NED-GGAACAGAAGCTGTGGCATT	CGCGCAATTCCACAATAAC	58
Acr44	26	NED-CAATTGCAATGGGTAGAGAGAG	CATCACCGCACAAAGAGAA	58

O programa de amplificação no termociclador segue os seguintes passos: (1º) Desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos; (2º) 94°C por 1 minuto; (3º) temperatura

específica de anelamento do iniciador por 1 minuto; (4°) Extensão da molécula pela enzima *Taq* DNA polimerase a 72°C por 1 minuto; (5°) 30 ciclos seguindo do 2° ao 4° passo; (6°) Passo final de extensão de 7 minutos a 72°C para finalizar os produtos amplificados.

Após a verificação da qualidade de amplificação em gel de poliacrilamida 6%, as amostras foram submetidas a um teste no analisador de fragmentos ABI-3100 (Applied Biosystems) com 16 indivíduos para avaliar a qualidade da fluorescência, pois a análise genética de plantas, na qual se trabalha com dezenas a centenas de amostras, estes iniciadores são estocados por algum tempo, podendo perder essa qualidade (Missiaggia & Grattapaglia, 2006).

Após o teste, foi montado um sistema de genotipagem multiplex descrito por Pereira (2007), onde foram feitos dois triplex (triplex01 e triplex02), (Tabela 2). Os locos Acr20 e Acr22 foram analisados separadamente por possuírem mesma amplitude e mesma coloração.

Tabela 2. Conjunto multiplex descrito por Pereira (2007). O triplex é composto por três locos marcados com fluorocromos diferentes.

Multiplex	Loco	Fluorocromo
Triplex01	Acr01	6FAM
	Acr26	HEX
	Acr44	NED
Triplex02	Acr10	6FAM
	Acr19	HEX
	Acr34	NED

Os conjuntos foram levados para o Laboratório de Melhoramento de Plantas da UFG e analisados no seqüenciador ABI-3100 (Applied Biosystems) contendo um volume final de 10µL sendo: 1µL do produto da reação de amplificação, 0,5 µL de marcador de peso molecular (*ladder*) desenvolvido conforme Brondani & Grattapaglia (2001), marcado com fluorocromo ROX, e 8,5 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems). Essa mistura foi submetida à desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida resfriamento imediato a 0°C.

Os iniciadores utilizados no presente estudo apresentam motivos de dinucleotídeo. Dessa forma, para a determinação dos genótipos, é necessário estabelecer um critério de arredondamento, de forma que a variação dos alelos ocorra a cada dois

pares de bases. O arredondamento pode ser feito de forma manual ou utilizando categorias de alelos com intervalos em pares de bases pré-estabelecido (bin) e os alelos são arredondados de forma automática. Os “bins” foram criados da seguinte maneira: depois de identificado o alelo, criou-se um bin que variou de 1 par de base para a esquerda e 0,99 par de base para a direita de modo que, quando um alelo era identificado dentro deste intervalo, era automaticamente identificado pelo programa Genemaper v 3.2 (Applied Biosystems).

Análise estatístico-genéticos

A heterozigosidade média observada (H_o) foi obtida pela razão entre o número total de heterozigotos e o número de indivíduos. Para a sua obtenção, as proporções obtidas para cada loco foram somadas e divididas pelo número total de locos polimórficos: $H_o = 1 - \sum P_{ii}$, onde P_{ii} é a frequência dos homozigotos.

A heterozigosidade esperada (H_e) foi obtida a partir das frequências alélicas, segundo as frequências genótípicas esperadas, conforme equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com Nei (1973): $H_e = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r \left[2n \frac{(1 - \sum_{j=1}^k P_{ij}^2)}{(2n-1)} \right]$ onde n é o número de indivíduos, r é o número de locos, k é o número de alelos no loco i e p_{ij} é a frequência do j -ésimo alelo do i -ésimo loco. Estas estimativas foram calculadas com o auxílio do programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2002).

A Probabilidade de Exclusão de Paternidade (Q), que se refere à probabilidade de se excluir uma falsa paternidade, foi calculada conforme sugerido por Evett & Weir (1998). Sendo p_u as frequências alélicas do loco u na população e Q a probabilidade de que pelo menos um loco do sistema permita a exclusão de um dos prováveis pais. Esta probabilidade por loco (Q_L), pode ser estimada por

$Q_L = \sum_u p_u (1 - p_u)^2 - \frac{1}{2} \sum_u \sum_{v \neq u} p_u^2 p_v^2 (4 - 3p_u - 3p_v)$, e generalizando para todos os locos, tem-se que $Q = 1 - \prod_L (1 - Q_L)$.

A Probabilidade de Identidade (I), que é a probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente em uma população terem genótipo idêntico, foi calculada segundo Paetkau *et al.* (1998) em que:

$$I = \frac{n^3(2a_2^2 - a_4) - 2n^2(a_3 + 2a_2) + n(9a_2 + 2) - 6}{(n-1)(n-2)(n-3)}$$

na qual, n é o número de amostras, a_i é dado por: $\sum_j p_j^i$, em que p_j é a frequência do j -ésimo alelo calculado por loco e multiplicada para todos os locos. As estimativas de I e Q foram calculadas utilizando o programa Identity 1.0 (Wagner & Sefc, 1999).

Para avaliar a estruturação genética entre as duas populações foi estimado o parâmetro θ conforme sugerem Cockerham & Weir (1993). O estimador θ é uma medida de diferenciação entre subpopulações e é consequência da correlação entre genes de diferentes indivíduos na mesma população (Weir & Cockerham, 1984, Cockerham & Weir, 1993). A significância estatística dessa estimativa foi obtida a partir de randomizações utilizando o programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2002).

Como a maioria das mutações que ocorrem em marcadores microssatélites envolve a adição ou subtração de uma unidade de repetição, de acordo com o modelo de mutação por passos (Otha & Kimura, 1973), a diferenciação genética também foi estimada pelo R_{ST} (Slatkin, 1995), obtido pela análise de variância do tamanho do alelo. O R_{ST} pode ser interpretado como uma correlação do tamanho dos alelos de diferentes indivíduos de uma mesma população. Este índice é análogo ao θ , porém, a correlação entre as frequências alélicas de diferentes indivíduos na mesma população considera que os alelos são idênticos por descendência (Cockerham, 1969; Weir & Cockerham, 1984). Para avaliar se a diferença entre os valores de θ e R_{ST} é significativa, foram realizadas estimativas da média e do erro padrão dos dois valores no programa SPAGeDI 1.2 (*Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity*) (Hardy & Vekemans, 2002).

A avaliação do padrão de estrutura genética espacial em cada uma das duas populações foi feita segundo o estimador de coancestria média, de Loiselle *et al.* (1995) entre plantas dentro das classes de distância. As classes de distância foram determinadas de forma que todas representassem um número aproximado de pares de pontos (Tabela 3).

Este método se baseia na probabilidade de se amostrarem aleatoriamente dois alelos em dois indivíduos e eles serem idênticos por descendência. Os valores de F_{ij} foram computados conforme descrito a seguir:

$$F_{ij} = \sum l \left[\frac{\sum a(\sum ci \sum cj(x_{lcia} - P_{la}) / \sum ci \sum cj^1) + \sum a(P_{la}(1 - P_{la}) / (n_1 - 1))}{\sum l \sum a(P_{la}(1 - P_{la}))} \right]$$

onde, x_{lcia} é uma variável indicadora ($x_{lcia} = 1$ se o alelo no cromossomo c do loco l do indivíduo i é a , caso contrário $x_{lcia} = 0$), p_{la} é a frequência de um alelo no loco l , na amostra de referência, n_1 é o número de genes definidos numa amostra do loco l (o número de indivíduos vezes o nível de ploidia menos o número de alelos *missing*), e $\sum c_i$ representa a soma dos cromossomos homólogos do indivíduo i . Aqui, o termo envolvendo $(n_1 - 1)$ é uma correção do viés de amostragem.

Tabela 3. Classes de distância utilizadas para análises de estrutura genética espacial intrapopulacional das duas populações de *Annona crassiflora*.

População	Classes de Distância (m)																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Águas Emendadas	22	35	45	55	65	75	80	85	95	105	115	125	138	150	175	200	300
Padre Bernardo	15	25	50	68	80	92	105	120	135	150							

Para testar a estrutura do parentesco, foi realizada uma regressão linear dos valores de F_{ij} em função da distância espacial entre os indivíduos. O intervalo de confiança dos valores dos valores de F_{ij} estimado por *jackknife* sobre os locos e também foi realizado teste com 10.000 permutações para verificar a significância do parentesco em todas as classes de distância e da regressão.

Esta análise foi realizada no programa SPAGeDI 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002).

A força da estrutura genética espacial foi quantificada usando o parâmetro $Sp = \frac{b}{(F_1 - 1)}$, onde F_1 é o coeficiente médio de parentesco entre os indivíduos da primeira classe de distância e b é a inclinação da regressão utilizando o logaritmo da distancia espacial (Vekemans & Hardy, 2004).

Wright (1943b) descreveu o modelo de vizinhança para se entender a relação entre dispersão de sementes e polinização, a densidade da população e o efeito destes fatores na estrutura genética espacial. Segundo o modelo, o tamanho da vizinhança ou N_b , o número de indivíduos dentro dela é determinado pela extensão do fluxo gênico e pela densidade da população local. Quanto maior a distância do fluxo gênico maior será o tamanho da vizinhança, menor a deriva genética, portanto, menor a diferenciação genética entre as vizinhanças. Segundo Rousset (1997), N_b é uma maneira eficiente de expressar a síntese do equilíbrio entre deriva genética local e dispersão de genes dentro de populações contínuas para prever estrutura genética espacial. A dispersão de

sementes foi estimada com base na vizinhança genética (N_b) utilizando a inclinação da regressão b e o F_{ij} ($Nb = \frac{F_{ij}-1}{b}$ ou $Nb - \frac{1}{S_p}$) segundo Vekemans e Hardy (2004). A distribuição de frequências da distância par a par das populações foram comparadas pelo teste Kolmogorov-Smirnov.

Para verificar se o padrão de diversidade genética nas populações foi influenciado por efeito gargalo, foi feito um teste utilizando o programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). O programa estima para cada população e para cada loco a distribuição da diversidade alélica esperada pelo número observado de alelos (k), dado um tamanho amostral (n), sobre hipótese do equilíbrio mutação deriva. Três testes estatísticos estão disponíveis para avaliar a significância das comparações entre as heterozigosidades: *sign test* que apresenta pouco poder estatístico, pois considera somente o número esperado de locos que desviam significativamente dos valores de heterozigosidades esperadas no equilíbrio; *standartized differences test* que apresenta mais poder estatístico quando são analisados pelo menos 20 locos polimórficos e considera a probabilidade de desvio do equilíbrio mutação-deriva se todos os locos estiverem evoluindo de acordo com o modelo específico; *Wilcoxon sign-rank test* que tem maior poder estatístico quando utilizados menos de 20 locos e número reduzido de amostras. A análise foi processada para as duas populações assumindo diferentes modelos de mutação, como o de alelos infinitos (IAM), de mutação por passo (SMM) e mutação em duas fases (TPM). Os testes foram realizados baseando-se em 1.000 replicações e a distribuição de frequência alélica (Mode-Shift) foi gerada para verificar o sinal de gargalo genético – espera-se que populações em equilíbrio mutação-deriva tenham distribuição em formato “L”, com muitos alelos nos intervalos de baixa frequência e poucos alelos nos intervalos de alta frequência. (Cornuet & Luikart 1996).

RESULTADOS

Para os oito locos analisados, o número total de alelos foi igual a 126, variando entre 6 e 23 com uma média de 15,75 alelos por loco. Os valores de heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), considerando o conjunto de locos foram iguais a 0,789 e 0,619 respectivamente. As probabilidades combinadas de identidade (I) e de exclusão de paternidade (Q) foram iguais a 0,00012 e 0,999, respectivamente (Tabela 4). O estudo do desequilíbrio de ligação, não detectou valores significativos para o teste na população ESECAE. Já na população de PBE os locos Acr19 e Acr34 se encontram em equilíbrio de ligação ($p < 0,00089$).

Tabela 4. Descrição dos locos com seus respectivos números de indivíduos analisados (N), número de alelos (N_A), heterozigosidade esperada (H_e), observada (H_o), probabilidade de identidade (I) e probabilidade de exclusão de paternidade (Q) para as duas populações de *Annona crassiflora* utilizando oito locos microssatélites.

Locos	N	N_A	H_e	H_o	I	Q
Acr01	136	17	0,803	0,478	0,065	0,620
Acr26	151	6	0,731	0,622	0,111	0,506
Acr44	168	23	0,872	0,749	0,026	0,753
Acr10	181	8	0,515	0,519	0,275	0,297
Acr19	168	20	0,835	0,593	0,048	0,672
Acr34	158	19	0,898	0,601	0,02	0,789
Acr20	158	13	0,844	0,741	0,043	0,688
Acr22	158	20	0,814	0,652	0,056	0,646
Global	-	15,75	0,789	0,619	$1,2 \times 10^{-4}$	0,999

O gráfico de frequência alélica demonstrou uma alta variabilidade genética nas duas populações (Figura 5 e 6). Os locos Acr44, Acr34, Acr22 e Acr19 foram os que apresentaram maior número de alelos enquanto que o loco Acr26, com apenas 6 alelos, foi o que apresentou menor estimativa. Para a maioria dos locos foi possível observar uma grande presença de alelos exclusivos nas duas populações de *Annona crassiflora*. A riqueza alélica, por população, foi maior na população de ESECAE do que na população de PBE (Tabela 5). O índice de fixação f , ou a probabilidade de dois alelos em um indivíduo amostrado aleatoriamente dentro das populações serem idênticos por

descendência, foi 0,187 em PBE, sugerindo a existência de endogamia, ou seja, cruzamento de indivíduos aparentados dentro dessa população. Na população de ESECAE foi observado valor de f não significativo (0,030), o que indica ausência de endogamia nesta população, ou seja, as frequências alélicas estão seguindo as proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

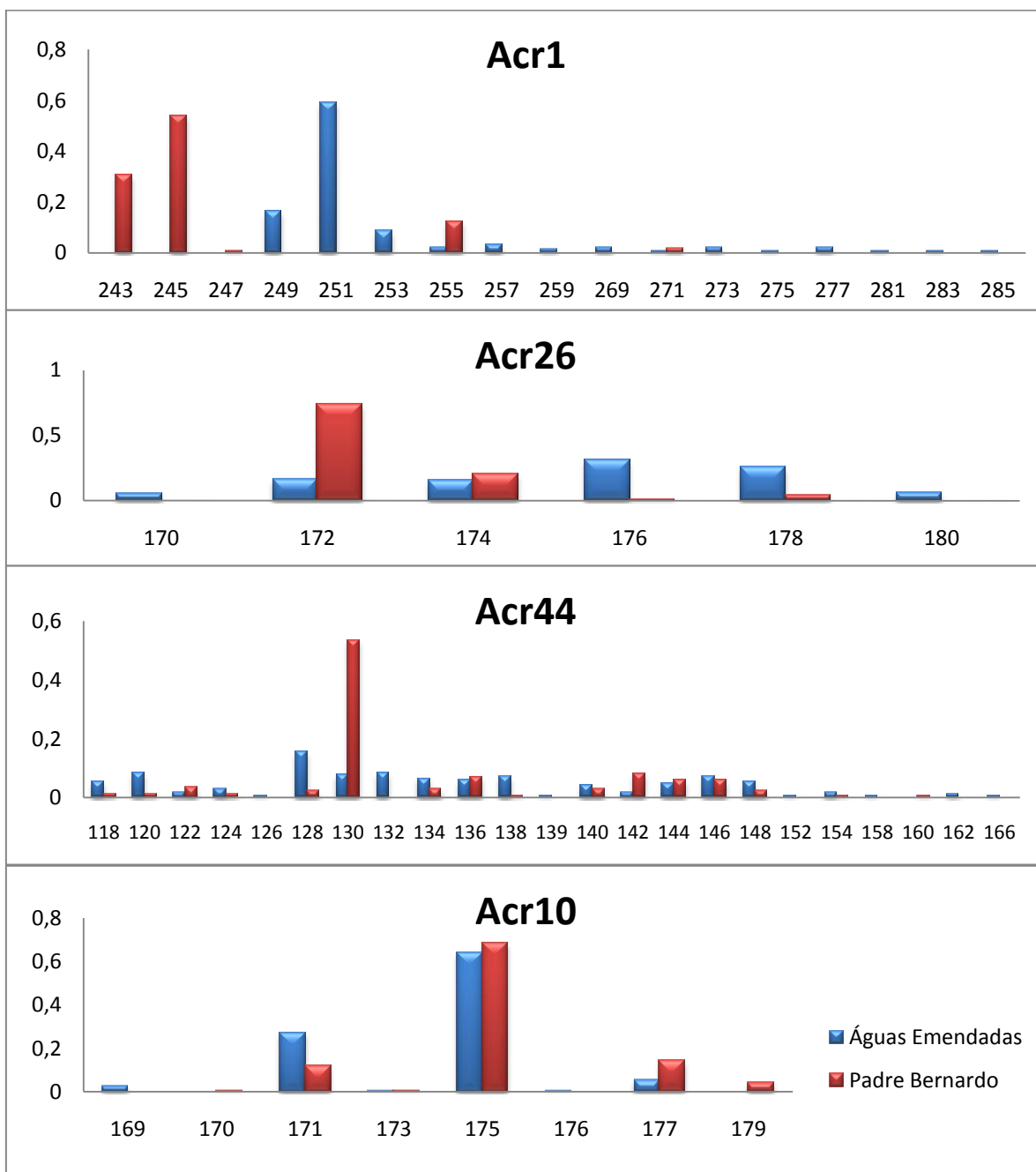


Figura 5. Distribuição da frequência alélica para quatro locos microsatélites (Acr1, 26, 44, 10) analisados em duas populações naturais de *Annona crassiflora*. No eixo x encontra-se o tamanho dos alelos em pares de base e no eixo y a frequência dos alelos.

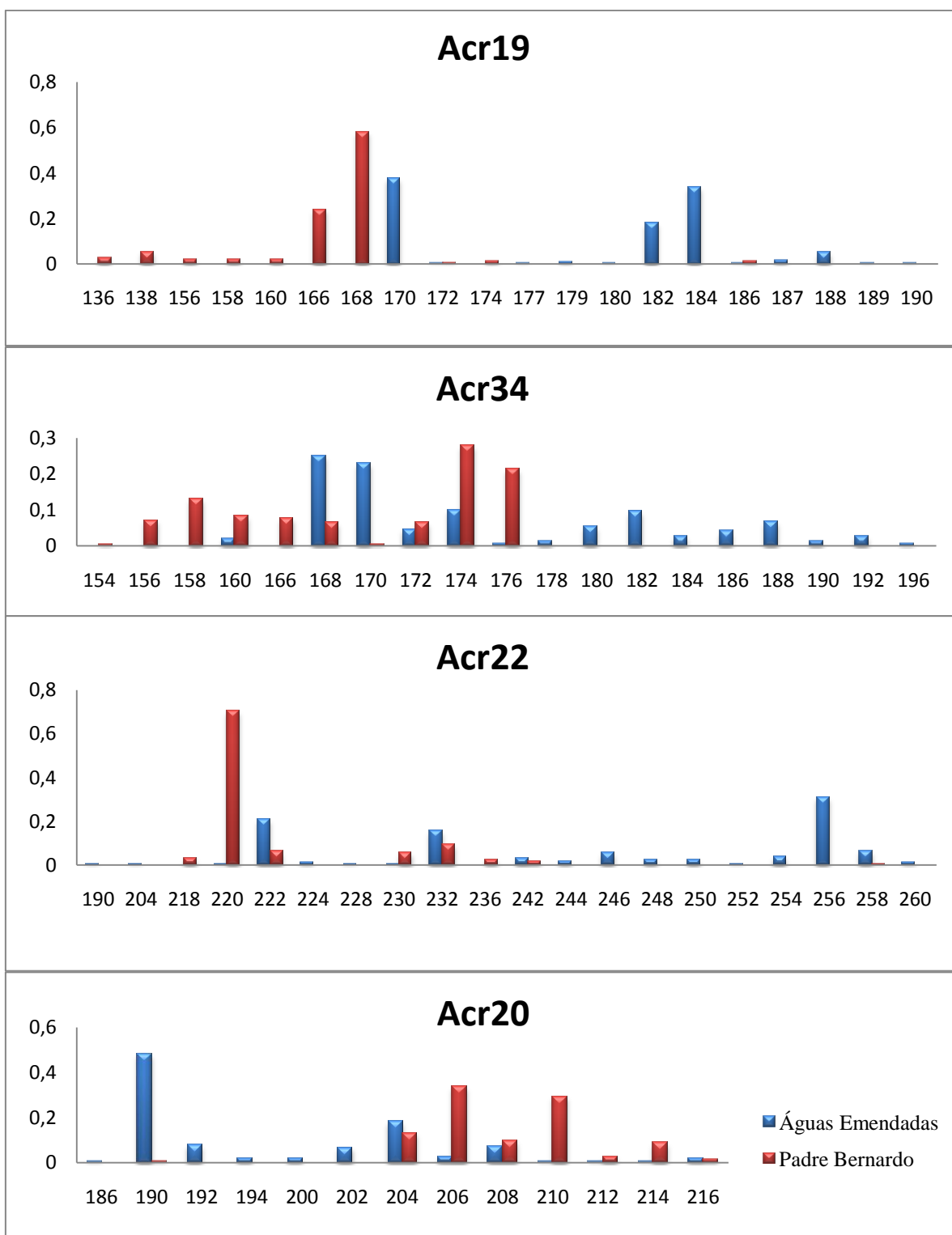


Figura 6. Distribuição da frequência alélica para quatro locos microssatélites. (Acr19, 34, 22, 20) analisados em duas populações naturais de *Annona crassiflora*. No eixo *x* encontra-se o tamanho dos alelos em pares de base e no eixo *y* a frequência dos alelos.

Tabela 5. Variabilidade genética nas duas populações de *Annona crassiflora*, baseada em oito marcadores microssatélites. (N) número de indivíduos; (NA) número médio de alelos; riqueza alélica (R_A) heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e índice de fixação (f).

População	N	N_A	R_A	H_e	H_o	f
Águas Emendadas	97	13,25	12,09	0,746±0,134	0,723±0,173	0,030
Padre Bernardo	87	8,37	8,00	0,614±0,145	0,499±0,181	0,187*

*Valor significativo.

As distribuições de distâncias par a par entre os indivíduos diferiram entre as duas populações (Kolmogorov-Smirnov $P < 0,001$). A distância média entre árvores adultas da população de ESECAE foi 94,73 m, a maioria (95%) dos indivíduos apresentou uma distância menor de 200m umas das outras, o que pode ser visualizado na Figura 7. A população de PBE apresentou distância média de 123,21 m, além disso, a maioria dos indivíduos (57,5%) estava em distâncias inferiores a 250m (Figura 7 e 8).

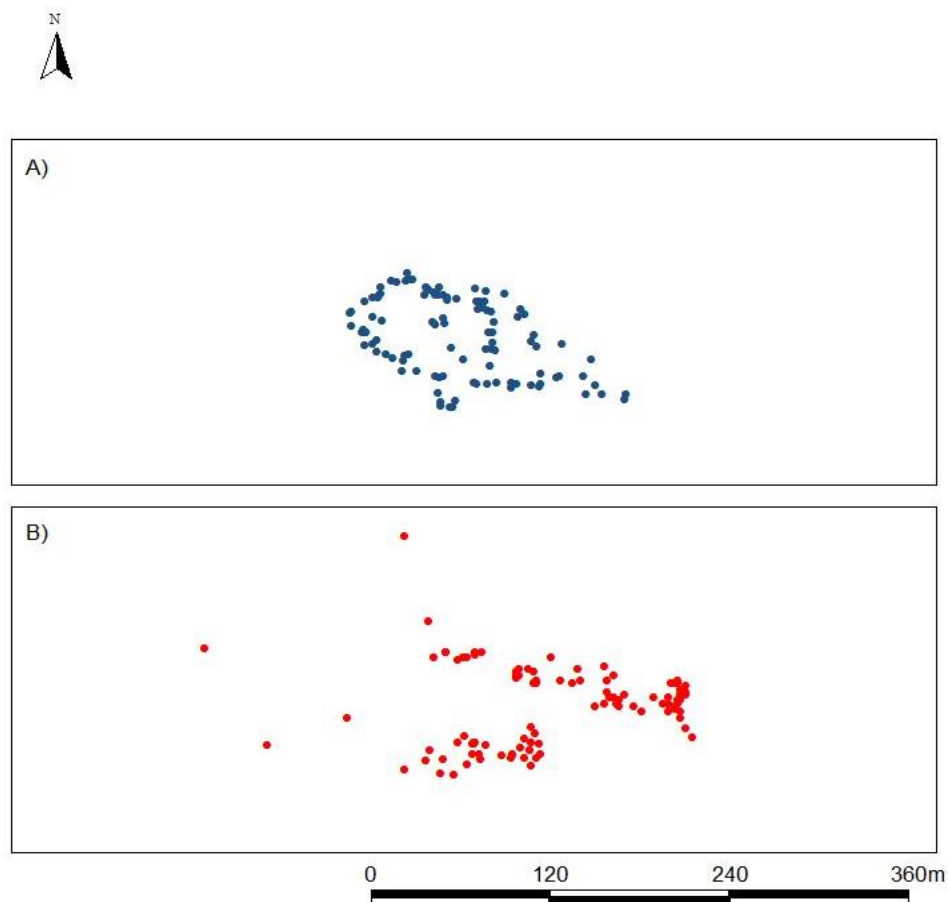


Figura 7. Distribuição espacial dos indivíduos de *Annona crassiflora* nas regiões de Águas Emendadas (A) e Padre Bernardo (B).

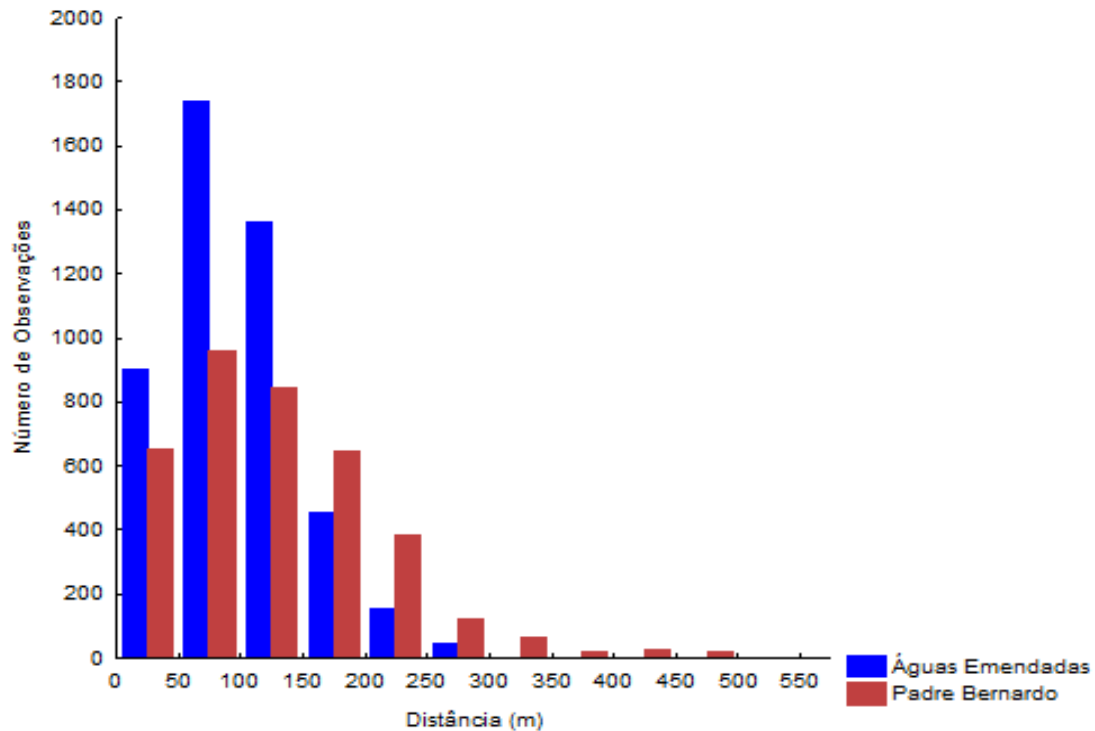


Figura 8. Distribuições das distâncias par a par (em metros) entre indivíduos de *Annona crassiflora* das populações de Águas Emendadas e Padre Bernardo.

A análise de estrutura genética espacial na população de ESECAE revelou uma estruturação genética de pequena magnitude entre a correlação do parentesco com o logaritmo da distância ($b=-0,00478$; $R^2=0,001$; $p=0,0257$) (Figura 9). Os valores de F_{ij} foram não significativos para todas as classes de distância, exceto a penúltima classe (200 m) que apresentou valor significativo, porém negativo. O grupo de vizinhança genética (Nb) nesta população foi igual á 208,33 (Tabela 7).

A análise de estrutura genética espacial na população de PBE revelou um alto valor de parentesco entre os indivíduos na primeira classe de distância, aparentando um modelo de fluxo gênico de isolamento por distância (Figura 10), ($b=-0,01958$; $R^2 = 0,001$; $p < 0,0001$). O valor do grupo de vizinhança genética (Nb) foi igual á 48,78 (Tabela 7).

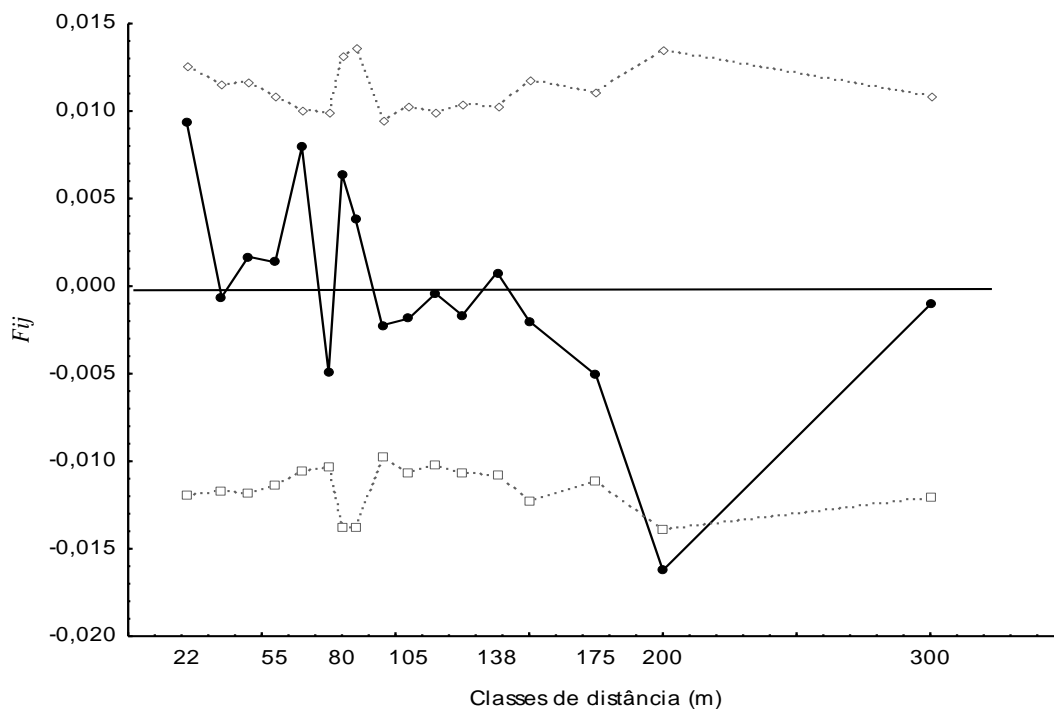


Figura 9. Correlograma entre coeficiente de parentesco (F_{ij}) e classe de distância de indivíduos de Águas Emendadas com base em oito marcadores microsatélites. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de aceitação de H_0 (95%; 10.000 permutações) e a linha contínua representa o valor observado do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle *et al.*, 1995.

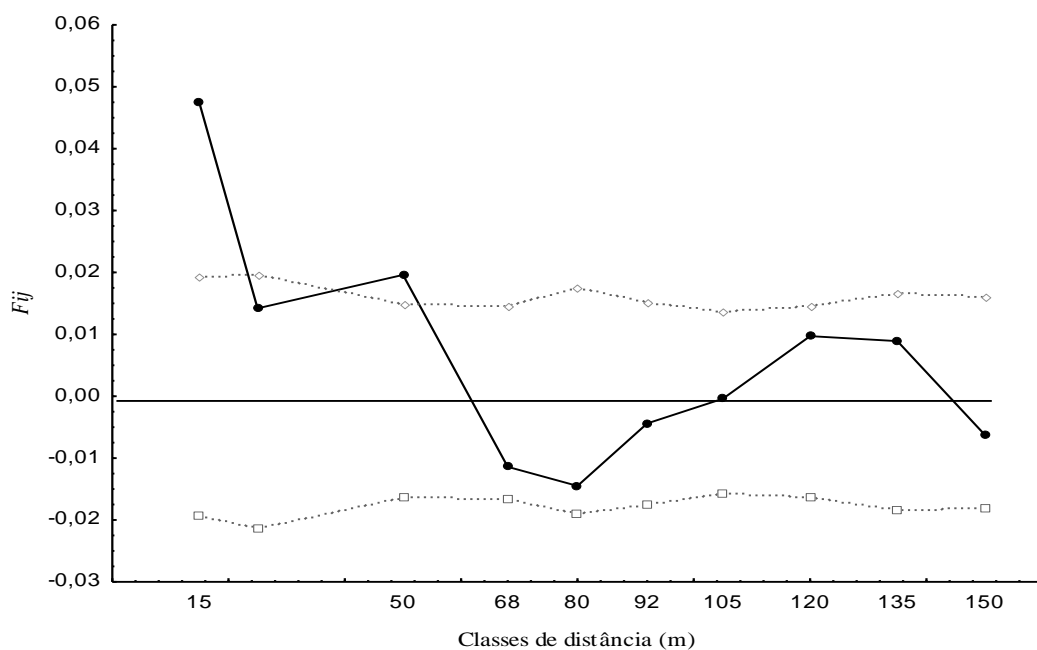


Figura 10. Correlograma entre coeficiente de parentesco (F_{ij}) e classe de distância de indivíduos de Padre Bernardo com base em oito marcadores microsatélites. As linhas

pontilhadas indicam o intervalo de aceitação de H_0 (95%; 10.000 permutações) e a linha continua representa o valor observado do coeficiente de coancestria, segundo Loiselle *et al.*, 1995.

A estrutura genética espacial intrapopulacional apresentou-se fraca para as duas populações, com baixos níveis de S_p . A análise da população de PBE revelou o maior valor de S_p (0,0205) em relação a população de ESECAE (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros de estrutura genética espacial intrapopulacional e vizinhança genética entre as duas populações de *Annona crassiflora* com base em oito marcadores microssatélites. F_1 – valor de F_{ij} para a primeira classe de distância; b – inclinação da regressão; S_p – parâmetro de força da estrutura genética espacial; N_b – vizinhança genética.

População	F_1	b	S_p	N_b
Águas Emendadas	0,0093	-0,00478	0,0048	208,33
Padre Bernardo	0,0479	-0,01958	0,0205	48,78

O valor global de F foi significativo e igual a 0,309. O valor de θ apresentou-se alto e significativo (0,239) (Tabela 7). Sobre o teste de diferenciação entre θ e R_{st} o valor encontrado foi 0,064 indicando um valor significativo muito baixo. O número de migrantes por geração (Nm), estimado a partir do valor de θ , foi igual a 0,796.

Tabela 7. Estrutura genética populacional de duas populações de *Annona crassiflora*, baseada na análise de variância das freqüências alélicas e análise de variância do tamanho dos alelos para os oito marcadores microssatélites.

Loco	F	θ	f	R_{st}
Acr1	0,521	0,389	0,217	0,396
Acr26	0,266	0,274	-0,011	0,439
Acr44	0,266	0,274	-0,011	-0,007
Acr10	0,007	0,030	-0,023	0,129
Ac19	0,409	0,338	0,107	0,607
Acr34	0,365	0,104	0,291	0,247
Acr20	0,220	0,220	0,000	0,627
Acr22	0,325	0,317	0,012	0,577
Global	0,309*±0,048	0,239*±0,042	0,092*±0,044	0,483*±0,084

*valor significativo

Sob os modelos mutação por passos (SMM) e duas fases (TPM) não foram observados gargalo genético nas populações. Para o modelo de mutação infinitos alelos (IAM) foi detectado gargalo genético nas duas populações como evidenciado pelo teste de Wilcoxon igual a 0,004 indicando uma redução no tamanho populacional, (Tabela 8 e 9). As frequências alélicas geradas pelo teste Mode-Shift dentro de cada população mantiveram o padrão de distribuição esperado pelo equilíbrio mutação deriva, com a maioria dos alelos apresentando em baixa frequência e poucos alelos apresentando-se em alta frequência (Figura 10).

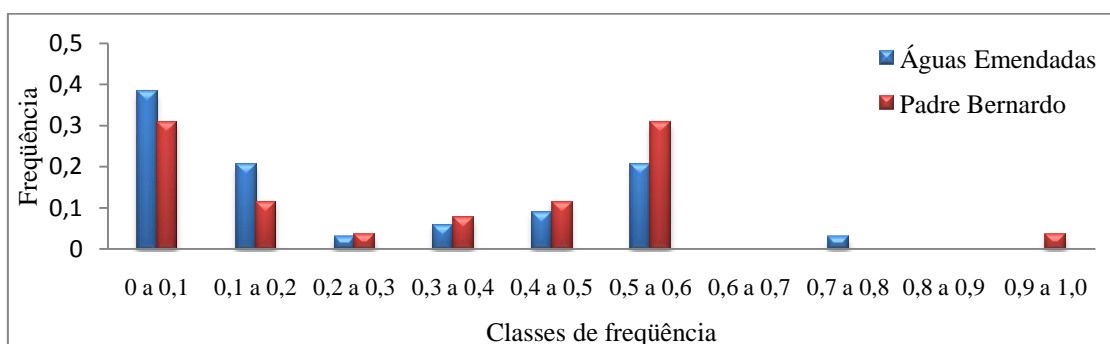


Figura 11. Distribuição em classes das frequências alélicas (Mode-Shift) utilizando oito locos microssatélites para as duas populações de *Annona crassiflora* segundo o programa Bottleneck. O eixo x encontra-se as classes da frequência e no eixo y a frequência dos alelos

Tabela 8. Teste de Wilcoxon para avaliar gargalo genético sob diferentes modelos de mutação: modelo de mutação de infinitos alelos (IAM), modelo de mutação por passo (SMM) e modelo duas fases (TPM) para a população de Águas Emendadas utilizando oito marcadores microssatélites.

Locus	He	IAM			SMM			TPM		
		Heq	SD	Prob	Heq	SD	Prob	Heq	SD	Prob
Acr1	0,615	0,476	0,178	0,265	0,661	0,081	0,226	0,569	0,140	0,447
Acr26	0,503	0,184	0,171	0,026	0,213	0,171	0,017	0,203	0,170	0,023
Acr44	0,636	0,479	0,177	0,226	0,666	0,082	0,292	0,572	0,130	0,370
Acr10	0,527	0,279	0,187	0,105	0,433	0,145	0,274	0,350	0,179	0,167
Ac19	0,617	0,293	0,188	0,035	0,434	0,146	0,081	0,358	0,178	0,064
Acr34	0,674	0,487	0,171	0,128	0,664	0,083	0,453	0,573	0,133	0,237
Acr20	0,616	0,476	0,174	0,233	0,658	0,086	0,252	0,559	0,133	0,407
Acr22	0,448	0,542	0,163	0,256	0,720	0,069	0,006	0,634	0,111	0,081
Wilcoxon			0,004*			0,472			0,037	

*Valor significativo

Tabela 9. Teste de Wilcoxon para avaliar gargalo genético sob diferentes modelos de mutação: modelo de mutação de infinitos alelos (IAM), modelo de mutação por passo (SMM) e modelo duas fases (TPM) para a população de Padre Bernardo utilizando oito marcadores microssatélites.

Locus	He	IAM			SMM			TPM		
		Heq	SD	Prob	Heq	SD	Prob	Heq	SD	Prob
Acr1	0,536	0,303	0,182	0,117	0,448	0,143	0,302	0,373	0,174	0,186
Acr26	0,504	0,175	0,167	0,017	0,221	0,172	0,02	0,192	0,163	0,013
Acr44	0,597	0,386	0,184	0,132	0,572	0,114	0,495	0,476	0,154	0,23
Acr10	0,503	0,169	0,167	0,012	0,211	0,166	0,012	0,186	0,167	0,014
Ac19	0,574	0,409	0,181	0,211	0,580	0,104	0,398	0,485	0,155	0,327
Acr34	0,660	0,403	0,176	0,044	0,573	0,112	0,234	0,483	0,154	0,089
Acr20	0,602	0,417	0,180	0,166	0,581	0,106	0,495	0,491	0,156	0,281
Acr22	0,143	0,295	0,189	0,312	0,447	0,143	0,049	0,366	0,171	0,153
Wilcoxon			0,004*			0,125			0,273	

*Valor significativo

DISCUSSÃO

Os resultados apontaram para um elevado nível de informação associados aos marcadores microssatélites o que os torna extremamente úteis em estudos de genética de populações naturais de araticum. A probabilidade de exclusão de paternidade (Q), apresentou valor combinado igual 0,999 que pode ser considerado alto e ideal para marcadores microssatélites, pois trata-se de um valor que mede o poder de exclusão do sistema, por exemplo, um teste de paternidade. A vantagem em alcançar um nível bom de probabilidade de exclusão com menos locos é a possibilidade de redução de custo da análise, sem prejuízo para a conclusão do teste. Segundo Paetkau *et al.* (1998) um bom microssatélite para análise de vínculo genético é aquele que apresenta altos valores de probabilidade de exclusão (Q). Níveis reduzidos de polimorfismo ou fixação de alelos para alguns marcadores causam baixos valores de Q. É preciso ressaltar que o valor de Q é dependente do número de alelos e a distribuição de frequências desses alelos na população (Paetkau *et al.*, 1998).

Outra medida importante em análises de vínculo genético é a probabilidade de identidade (I), que é a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso em uma população possuir genótipos idênticos. A probabilidade de identidade combinada estimada neste estudo foi igual a $1,2 \times 10^{-4}$, valor considerado bom, isso porque este índice deve ser praticamente nulo para demonstrar que a bateria de locos utilizada é adequada para discriminar os indivíduos (Paetkau *et al.*, 1998).

Os valores ideais de exclusão de paternidade e probabilidade de identidade juntamente com o resultado do teste de desequilíbrio de ligação, permitem inferir que a quantidade e a qualidade dos marcadores microssatélites são ideais para estudos de estrutura genética espacial e fluxo gênico em populações de *Annona crassiflora*.

As duas populações de *Annona crassiflora*, tanto da área conservada quanto da fragmentada, ainda preservam altos índices de diversidade genética. Valores similares foram observados por Pereira e colaboradores (2007) ao estudarem 13 populações de araticum no Estado de Goiás utilizando os mesmos marcadores microssatélites deste estudo. Estes valores também foram similares ou superiores aos observados para outras espécies nativas. Em cherimoya, uma frutífera cultivada do mesmo gênero do araticum, a heterozigosidade observada variou entre 0,17 e 0,61 e a heterozigosidade esperada variou de 0,12 a 0,76 (Escribano *et al.*, 2004). Em populações naturais de *Eugenia dysenterica*, uma frutífera de Cerrado, a heterozigosidade média esperada e observada

foram iguais a 0,44 e 0,46, respectivamente, com uma média de 10,43 alelos por loco (Zucchi *et al.*, 2003). Collevatti e colaboradores (2001) encontraram estimativas para H_e e H_o iguais a 0,856 e 0,765, respectivamente, utilizando 10 locos microssatélites em dez populações naturais de *Caryocar brasiliense*.

Trabalhos com outros marcadores também foram interpretados como indicativos de presença de altos níveis de diversidade genética em populações naturais de araticum. Telles e colaboradores (2003), utilizando quatro locos isoenzimáticos e seis populações de araticum, obtiveram um valor para H_e igual a 0,357. Bandeira (2003) utilizando marcadores RAPD, analisou as mesmas populações e obteve um $H_e = 0,350$, admitindo panmixia.

A ampla distribuição geográfica de *Annona crassiflora*, seu ciclo de vida e o sistema de reprodução com predominância de cruzamentos, são características que explicam sua alta diversidade genética intrapopulacional (Pereira, 2007). Vale salientar, que além da riqueza alélica detectada, um considerável número de alelos exclusivos foi encontrado nas duas populações. Tanto a riqueza alélica quanto a presença de alelos raros ou exclusivos em populações naturais de espécies arbóreas são importantes na tomada de decisões conservacionistas (Kalinowski, 2004).

A população de ESECAE apresentou valores altos para heterozigosidades esperada e observada e um valor não significativo para f , indicando que as frequências alélicas estão seguindo as proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro dessa população. Collevatti e colaboradores (2001b) estudaram uma população de *Caryocar brasiliense* nesta mesma área. Seus resultados mostraram uma alta variabilidade genética e um baixo índice de acasalamentos de indivíduos aparentados assim como neste estudo. Isto indica que a ESECAE tem papel extremamente importante na conservação de suas espécies, possuindo uma grande representatividade da variabilidade genética em relação às populações com alta influência antrópica. Neste sentido, os indivíduos de *A. crassiflora* da população de ESECAE apresentam uma boa interação com seus dispersores e polinizadores, o que aumenta a sua probabilidade de persistência evolutiva.

Para a população de PBE foi encontrado valores significativos para f . Isto indica que as frequências alélicas na população não estão seguindo as proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, existe endogamia dentro dessa população. Este fato mostra que a fragmentação pode ter afetado negativamente a reprodução das plantas ao reduzir as atividades de polinização, formação de frutos e

sementes. O aumento da endogamia pode ocasionar redução dos valores adaptativos (*fitness*) individuais e adaptabilidade populacional, causando redução nas taxas de reprodução e aumento nas taxas de mortalidade (Frankham *et al.*, 2008) e, conseqüentemente, podem levar esta população à extinção. Estudos de estrutura genética indicam que progênies de populações fragmentadas são propensas a terem sido geradas por autofecundação ou polinizadas por poucos indivíduos (Fuchs *et al.*, 2003).

A análise de autocorrelação espacial revelou que a população de ESECAE possui uma tendência a estar estruturada espacialmente. Esta estruturação de baixa magnitude pode ser atribuída à eficiência de seus polinizadores em propagar pólen e pelo fato das sementes de araticum serem dispersas por mamíferos. A distribuição espacial de espécies vegetais tem sido considerada um importante componente da determinação de interação planta-animal, esperando-se que muitos padrões observados nestes sistemas resultem de variações na distribuição de recursos vegetais (Hunter, 1992). Segundo Kalisz e colaboradores (2001) quando a dispersão do pólen é localizada, mas a semente é dispersa a longa distância, espera-se que não existirá estrutura genética espacial. Isso acontece com *A. crassiflora*, apesar do fluxo de pólen não ser amplo por ser realizado por besouros que possuem uma baixa capacidade de vôos longos, o fluxo gênico via semente é muito maior, pois é realizado por mamíferos de grande porte como a anta (*Tapirus terrestris*) que atua diminuindo a estruturação espacial devido a sua capacidade de forragear a longas distâncias (Fragoso, 1997).

A população de PBE apresentou padrão espacial na distribuição da variabilidade genética que se associa ao modelo de fluxo gênico de isolamento por distância. Ou seja, os indivíduos que estão mais próximos espacialmente são mais parecidos geneticamente, ficando mais diferentes geneticamente à medida que a distância geográfica aumenta (Wright, 1943b). Este modelo de fluxo gênico de isolamento por distância tem sido observado em diferentes estudos de fluxo gênico em escala local (Degen *et al.*, 2004; Moraes *et al.*, 2005). Este resultado mostra que devido à fragmentação do Cerrado, os cruzamentos podem estar ocorrendo a pequenas distâncias o que poderia levar uma depressão endogâmica (perda do valor adaptativo devido a manifestação de alelos deletérios), com perda de variabilidade genética e, em longo prazo, pode levar a uma extinção local das populações (Kageyama, 1987). Isso pode ser agravado pela falta de dispersores do araticum, que estão restritos. Assim as sementes que permanecem em torno da árvore-mãe tendem a aumentar o nível de parentesco entre os indivíduos de uma população. Esse fato é confirmado quando se

observa o valor de f significativo da população de PBE, afetando mais intensamente a taxa de crescimento e o sucesso reprodutivo dos indivíduos, contribuindo também para um baixo recrutamento e, portanto, para uma maior probabilidade de extinção local (Ellstrand & Elam, 1993).

Para a população em questão, o entendimento da estruturação genética pode ser de fundamental importância para o estabelecimento de estratégias de amostragem, visando à conservação. Assim, a amostragem de indivíduos distanciados a partir de 25 metros entre si promoveria, por exemplo, uma maior probabilidade de aquisição de sementes de diferentes árvores matrizes que não são parentes, o que por sua vez, aumenta o tamanho efetivo da amostra. Caso exista a intenção de coletar amostras para compor coleções de germoplasma ou implantação de programas de recuperação de áreas degradadas, essa informação otimiza a amostragem com o intuito de obter maior representatividade da variabilidade genética da espécie com o menor número de indivíduos. Segundo Diniz-Filho & Telles (2002) é recomendado utilizar o intercepto do correlograma para definir o tamanho do intervalo de distância como critério de amostragem, evitando a coleta de indivíduos pertencentes à mesma área de vizinhança genética.

A estrutura genética espacial das populações de *A. crassiflora*, medida pela estatística S_p (ESECAE = 0,0048 e PBE = 0,0205), está entre os valores que têm sido observados para espécies de plantas do cerrado, valores esses que variaram entre $S_p = 0,0085$ para a espécie *Tibouchina papyrus* e $S_p = 0,0172$ para a espécie *Dipteryx alata* (Collevatti *et al.*, 2010). Os valores de S_p e N_b são inversamente proporcionais ($N_b = 1/S_p$), pois quanto maior a força da estrutura genética espacial, menor a vizinhança genética, ou seja, menor o número de indivíduos que estão se cruzando ao acaso (Vekmans & Hardy, 2004). Essa informação corrobora com o alto valor de S_p e baixo N_b para a população de Padre Bernardo, sua vizinhança genética foi bem menor que para a área conservada, sugerindo o cruzamento de indivíduos aparentados. O valor de S_p para ESECAE foi de baixa magnitude indicando que a dispersão ocorre a longas distâncias, com o valor de vizinhança genética bem mais alto que na área fragmentada (Vekmans & Hardy, 2004). A inclinação da reta de regressão foi maior para a população de PBE (-0,01958) indicando um maior decaimento do coeficiente de parentesco com o aumento da distância sendo consistente com o modelo de isolamento por distância Wright (1943b).

De acordo com a análise de estrutura genética, as populações de *A. crassiflora* podem ser consideradas como fortemente estruturadas, com uma alta diferenciação genética entre as duas populações ($\theta = 0,239$), isso significa que aproximadamente 76% da variação genética encontra-se dentro das populações e, conseqüentemente, 24% desta variação encontra-se entre as populações.

Ao observar a distribuição das frequências alélicas percebe-se que os indivíduos de ESECAE apresentaram um maior número de alelos em relação ao PBE e o comportamento do gráfico evidencia uma disjunção das populações compartilhando poucos alelos. Este deslocamento de frequência provavelmente é devido à subdivisão alta entre as populações visto que são plantas polinizadas por besouros com baixa capacidade de vôos longos. Seoane, Kageyama e Sebbenn (2000) citam presença de alelos exclusivos em algumas populações como sendo indicativo de fluxo gênico restrito, o que pode levar a um aumento da divergência genética entre as populações.

Pereira (2007) encontrou um valor de θ igual a 0,091 ou seja, uma significativa parte da variabilidade genética encontra-se entre populações (9,1%). O valor encontrado por Pereira (2007) foi menor que o valor encontrado no presente estudo e mesmo assim foi considerado como alto, sendo um indicativo de que as populações de *Annona crassiflora* encontram-se em diferenciação em decorrência de deriva genética. Além disso, um aumento de divergência genética entre populações de mesma espécie pode ter acentuado a partir da fragmentação dessas populações que sob forte restrição do fluxo gênico, ficam a mercê da deriva genética. A deriva genética por sua vez acentua a divergência entre as populações podendo aumentar a similaridade entre indivíduos das populações por gerar endogamia. Bandeira (2003) encontrou um valor significativo para a variância entre as populações de *Annona crassiflora*, cerca de 8% da variabilidade total. De acordo com essa autora, isso é resultado da restrição do fluxo gênico ocasionado por processos de fragmentação.

Quanto às estimativas de θ e R_{ST} , verificou-se que houve pequena diferença bastante próxima do valor não significativo. Valores semelhantes também foram encontrados para outras espécies de plantas tropicais (Loveless *et al.*, 1998; Lemes *et al.*, 2003; Zucchi *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2009). Segundo Hardy *et al.* (2003b) quando os valores de θ e R_{ST} não se diferem ($\theta = R_{ST}$) indica que o tamanho dos alelos não contribui com informações sobre a diferenciação entre populações.

O número de migrantes por geração (Nm) foi baixo e igual a 0,796, sugerindo a hipótese de baixo fluxo gênico atual entre as populações. Este resultado era predito,

dado que a distância entre as populações (ESECAE e PBE) é de aproximadamente 100 km, sendo pouco provável a existência de trocas gênicas entre populações tão distantes. Sendo assim, como o valor de Nm foi menor que um, espera-se que os efeitos da migração (fluxo gênico) não sejam suficientes para contrapor os efeitos da deriva genética (Wright, 1951), favorecendo, assim, um aumento na divergência genética entre as populações.

Populações em equilíbrio de mutação-deriva apresentam igual probabilidade de que um loco apresente um excesso ou um déficit de heterozigosidade, considerando um tamanho efetivo populacional que se manteve constante em um passado recente. Já em populações que sofreram deriva recentemente, a maioria dos locos exibirá um excesso de heterozigosidade sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Cornuet & Luikart, 1996).

Pelo teste de adequação ao modelo de mutação de infinitos alelos (Cornuet & Luikart, 1996 nenhuma das populações mostraram-se em equilíbrio, indicando ocorrência de gargalos populacionais (bottlenecks) recentes exibindo um número significativo de locos com excesso de heterozigosidade. Lee *et al.* (2002) discutem que a detecção de populações que experimentaram gargalos populacionais recentes é importante, principalmente por permitir inferir sobre os riscos de extinção local, em consequência do tamanho populacional reduzido. Neste contexto, considerando o gargalo genético recente detectado, o baixo fluxo gênico entre as populações e sua baixa taxa de germinação são pontos importantes que reforçam a idéia de necessidade de conservação desta espécie. Van Rossum & Prentice (2004) avaliaram um total de quatro a 13 locos polimórficos e 59 alelos pertencentes às populações de *Silene nutans* (Caryophyllaceae) na Suécia e norte da Finlândia e encontraram gargalos genéticos recentes em várias populações, sendo interpretados como consequência da fragmentação das populações como resultado de perturbação de humana. Embora situada em uma área de conservação, os resultados do teste de bottleneck indica que a população de ESECAE passou por um gargalo genético. Este resultado pode ser consequência do histórico da área de estudo. A referida área está situada na borda da Estação Ecológica (antiga fazenda de Monteiro) que, segundo informações de funcionários da ESECAE, a área foi parcialmente desmatada e sofreu vários episódios de incêndio. Estes distúrbios podem ter provocado uma redução do número de indivíduos no passado, assim a população pode ser originária dos indivíduos remanescentes. A população de PBE também evidenciou um gargalo genético recente que poderia ser explicada pelo seu histórico de intensa perturbação humana motivada principalmente pela implantação da capital

Brasília, que levou uma intensa migração para as regiões ao redor em buscas de terras a custos mais baixo (Macedo, 1995). Uma alternativa para avaliar mais diretamente os efeitos da perturbação humana seria avaliar as progênies nas duas regiões ESECAE e PBE.

Portanto, verificar o comportamento demográfico das populações naturais permite que sejam definidas, estratégias de conservação em tempo hábil para evitar o aumento dos riscos de extinção.

CONCLUSÃO

Existe um alto nível de variabilidade genética em populações naturais de *A. crassiflora*.

Há endogamia significativa na população de PBE, sugerindo que a fragmentação está influenciando negativamente a dinâmica reprodutiva da espécie;

As duas populações estudadas se encontram fortemente estruturadas geneticamente;

A área de conservação (ESECAE) apresentou baixa estruturação genética espacial demonstrando uma boa eficiência de polinizadores e dispersores, aumentando assim o alcance do fluxo gênico;

A população na área de fragmentada (PBE) apresentou forte padrão espacial da variabilidade genética, o que pode ser consequência do processo de fragmentação ambiental;

O grupo de vizinhança foi pequeno em PBE (48,8), o que indica baixo alcance do fluxo gênico;

Pelos testes de adequação ao modelo de mutação de infinitos alelos, foi detectado gargalo genético nas duas populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, T. C.; Maguago, A. A.; Barrucho, R. C. N. O entorno do Distrito Federal: no espaço e desordem ambiental. In: Anais do IX Encontro, v.2. p.131-141,1994.
- Bandeira, L. F. Caracterização genética de populações naturais de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). 2003. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. 2003.
- Bawa, K.S.; Perry, D.R.; Beach, J.H. "Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *American journal of botany*, v. 72, p. 331-45, 1985
- Brondani, R. P. V.; Brondani, C.; Grattapaglia, D. Manual Prático para o Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites em Plantas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. 111p.
- Carvalho, J. A. Marolo: O doce aroma do cerrado. Minas Gerais: Gráfica Editora Folha Machadense, 2002.
- Cockerham, C. C. Variance of gene frequencies. *Evolution*, v.23, p.72-84, 1969.
- Cockerham, C. C.; Weir, B. S. Estimation of gene flow from *F-statistics*. *Evolution*, v. 47, n. 3, p. 855-863, 1993
- Collevatti, R. G.; Grattapaglia, D.; Hay, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity*, v.86, n.Pt 1, Jan, p.60-67. 2001a.
- Collevatti, R. G.; Grattapaglia, D.; Hay, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol Ecol*, v.10, n.2, Feb, p.349-356. 2001b.
- Collevatti, R. G.; Lima, J. S.; Soares, T. N.; Telles, M. P. C. Spatial Genetic Structure and Life History Traits in Cerrado Tree Species: Inferences for Conservation. *Natureza & Conservação*, v. 8, n.1, p. 54-59, 2010.
- Corlett, R. T.; Turner, L. M. Long-term survival in tropical forest remnants in Singapore and Hong Kong. In: *Tropical forest remnants: ecology, management and conservation in fragmented communities* (eds. W. F. Laurance),1997.
- Cornuet, J. M.; Luikart, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, Baltimore, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, Dec. 1996.

- Degen, B.; Bandou, E.; Caron, H. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity*, v. 93, p. 585-591, 2004.
- Diniz-Filho, J. A. F.; Carvalho, A. R.; M. P. Pinto; Anacleto, T. C. Métodos para seleção de reservas e estabelecimento de áreas prioritárias para conservação no Cerrado. *In: Recursos Genéticos e Conservação de Plantas Medicinais do Cerrado*. Pereira AMS (Ed). Editora Legis Summa. Ribeirão Preto. FAPESP, p. 75-107, 2007.
- Diniz-Filho, J. A. F.; Telles, M. P. C., Bonatto, S. L.; Eizirik, E.; Freitas, T. R. O.; Marco, P.; Santos, F. R.; Solé-Cava, A.; Soares, T. N. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography*, v. 35, p. 753-763, 2008.
- 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, 2002.
- Di Rienzo, A. D. P., Garza, A. C., Valdes, J. C.; Slatkin, A. M.; Freimer, M.; Mutational process of simple-Sequence Repeat loci in human population. *Academy of Science*, v.191, p.3166-3170. 1994.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, v. 19, p.11-15, 1987.
- Ellegren, H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, v. 16, n. 12, p. 551-558, 2000.
- Ellegren, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, v. 5, p. 435-445, 2004.
- Ellstrand, N. C. & Elam, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Palo Alto, v. 24, p. 217-242, 1993.
- Epperson B.K. Multilocus estimation of genetic structure within populations. *Theoretical Population Biology*, v.65, 227–237 2004.
- Epperson, B. K. Gene Dispersal and Spatial Genetic Structure. *Evolution*, v. 51, n. 3, p. 672-681, 1997.
- Epperson, B.K. *Geographical Genetics*. New Jersey; Princeton University Press (Monographs in Population Biology, 38), 2003
- Erickson, D. L.; Hamrick, J. L. Genetic and clonal diversity for *Myrica cerifera* along a spatiotemporal island chronosequence. *Heredity*, London, v.90, n. 1, p. 25-32, 2003.

- Escribano, P.; Viruel, M.A., Hormaza, J.I. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., *Annonaceae*). *Molecular Ecology Notes* 4. 746-748, 2004.
- Evett, IW & Weir, BS. *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. Sinauer Associates Ed, Sunderland, MA, US, 1998.
- Felfili, J. M. Determinação de padrões de distribuição de espécies em uma mata de galeria no Brasil Central com a utilização de análise multivariada. *Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer*, v.2, p.35-48. 1998.
- Ferreira, M. E. Grattapaglia, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3^a ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p. 1998.
- Fragoso, J. M. V. Tapir-generated seed shadows: scale-dependent patchiness in the Amazon rain forest. *Journal of Ecology*, Cambridge, v. 85, p. 519-529. 1997.
- Frankham, R.; Ballou, J. D.; Briscoe, D. A. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto, SP: SBG – Sociedade Brasileira de Genética, p. 280, 2008.
- Fuchs, E. J.; Lobo, J. A., Quesada, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the tropical dry Forest tree *Pachira quinata*. *Conservation Biology*, p.149-157. 2003.
- Goldstein, D., Schlotterer, C. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- Gottsberger, G. Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona* sp. (*Annonaceae*) in Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, Vienna, v. 167, n. 3/4, p. 165-187, 1989.
- Gottsberger, G. Pollination and evolution in neotropical *Annonaceae*. *Plant Species Biology*. v14, 143-152. 1999.
- Goudet, J.; Raymond, M. Testing differentiation in diploid population. *Genetics*, v.144, p.1933-1940, 1996.
- Goudet, J. FSTAT, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices: Version 2.9.3.2. 2002. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>> Acesso em: maio de 2010.
- Hamrick, J. L.; Lovelless, M. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, A.; FLEMING, T. H. (Eds.). *Frugivores and Seed Dispersal*. Dordrecht: Junk Publishers, cap. 17, p. 211-223, 1986.
- Hardesty, B. D.; Hubbell, S. P.; Bermingham, E. Genetic evidence of frequent long-distance recruitment in a vertebrate-dispersed tree. *Ecology Letters* 9:516–525. 2006.

- Hardy, O. J.; Charbonnel, N.; Fréville, H.; Heuertz, M. Microsatellite Allele Sizes: A Simple Test to Assess Their Significance on Genetic Differentiation. *Genetics*, v. 163, p. 1467-1482, 2003b.
- Hardy, O.J.; Maggia, L.; Bandou, E.; Breyne, P.; Caron, J.; Chevallier, M.H.; Doligez, A.; Dutech, C.; Kremer, A.; Latouche-Hallé, C.; Troispoux, V.; Veron, V.; Degen, B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. *Molecular Ecology*, Oxford, v.15, p.559-571, 2006.
- 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, p. 618-620. 2002.
- Heithaus, E. R. The role of plant-pollinator interactions in determining community structure. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 61: 675-691. 1974.
- Hunter, M.D.; Price, P.W. Natural variability in plants and animals. In: Hunter, M.D.; Ohgushi, T.; Price, P.W. (Eds.). *Effects of resource distribution on animal-plant interactions*. San Diego: Academic Press, Inc., p.1-12, 1992.
- Joly, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.
- Kageyama, P.Y.; Gandara, F.B.; Souza, L.M.I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *SÉRIE TÉCNICA IPEF*, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.
- Kageyama, P. Y. Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas. *IPEF*, n.35, p.7-37, 1987.
- Kalinowski, S. T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sample design. *Conservation Genetics*. Arlington, v.5, p.539-543, 2004.
- Kalisz, S.; Nason, J. D.; Hanzawa, F. M.; Tonsor, S. T. Spatial Population Genetic Structure In *Trillium Grandiflorum*: The Roles Of Dispersal, Mating, History, and Selection. *Evolution*, v. 55, n. 8, p. 1560–1568, 2001.
- Kimura, M.; Crow, J. F. The number of alleles that can be maintained in an infinite population. *Genetics*, v. 49, p. 725-738, 1964.
- Klink, C. A.; Machado, R. B. A Conservação do Cerrado Brasileiro. *Belo Horizonte, Megadiversidade*, v. 1, n. 1, jul. 2005, p. 148-155, 2005.
- Lee, S. L.; Ng, K. K. S.; Saw, L. G.; Norwati, A.; Salwana, M. H. S.; Lee, C. T.; Norwati, M. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic

conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. *American Journal of Botany*, Columbus, v. 89, n. 3, p. 447-459, Mar. 2002.

Legendre, P. Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm? *Ecology*, v. 74, n. 6, p. 1659-1673. 1993.

Lemes, M. R.; Gribel, R.; Proctor, J.; Grattapaglia, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: Implications for conservation. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 2875-2883, 2003.

Loiselle, B. A.; Sork, V. L.; Nason, J. Graham, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82: 1420-1425. 1995

Loveless, M. D.; Hamrick, J. L.; Foster, R. B. Population Structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. *Heredity*, v. 81, p. 134-143, 1998.

Loveless, M.D. & Hamrick, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.15, p.65-95, 1984.

Luikart, G.; Cornuet, J. -M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, Malden, v.12, n. 1, p. 228- 237, Feb. 1998.

Maas, P. J. M., Kamer, H. M.-Van De, Junikka, L., Mello-Silva, R. De, Rainer, H. *Annonaceae* from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia* 52(80): 65-98. 2001.

Macedo, J. Cerrados brasileiros: alternative para a produção de alimentos no limiar do século XXI. *Revista de Política Agrícola*, IV (2): 11-18, 1995.

Machado, R.B., Ramos Neto M.B., Pereira P.G.P., Caldas E.F., Gonçalves D.A., Santos N.S., Tabor K.; Steininger M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. *Conservação Internacional*, Brasília, DF, 2004a.

Manica, I. Taxonomia, Morfologia e Anatomia In: São José, R.; Souza, I.V.B.; Morais, O.M. e Rebolças, T.N.H. *Anonáceas: Produção e Mercado* (Pinha, Graviola, Atemóia e Cherimóia). Vitória da Conquista-BA: DFZ/UESB, p. 20-31, 1997.

Maury, C. M.; Rmaos, A. E.; Oliveira, P. E.; Levantamento florístico de estação Ecológica de Águas Emendadas. *Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer*, v.1, p.46-67. 1994.

- Meirelles, M. L.; Impactos sobre o estrato herbáceo de áreas úmidas do Cerrado. In: Aguiar, L. M. de S.; Camargo, A. J. A. (Ed) Cerrado: ecologia e caracterização. Planaltina, Embrapa Cerrados, p.41-68. 2004.
- Melo, J. T. de; Salviano, A.; Silva, J. A. da. Produção de mudas e plantio de araticum. Planaltina: Embrapa Cerrados, (Embrapa Cerrados. Recomendações Técnicas, 21), 2002
- Missiaglia, A. Grattapaglia, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. Genetics and Molecular Research, V. 5, p. 72-78, 2006.
- Moraes, M. L. T.; Kageyama, P. Y.; Sebbenn, A. M.; Diversidade e genética espacial em duas Populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Sob diferentes condições antrópicas. Revista Árvore, v.29, n.2, p.281-289, 2005.
- Murcia C. Edge effects in fragmented forests: implication for preservation. Tree, Victoria, v. 10, n. 1, p. 58-62, 1995.
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.da; Kents, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, Londres, v. 403, p. 853-858, fev. 2000.
- Ohta, T.; Kimura, M. A model of mutation appropriate to estimate the numbers of electrophoretically detectable alleles in a finite population. Genetical Research Cambridge, V.22, p.201-204, 1973
- Paetkau, D., Waits, L. P.; Clarkson, P.L.Variation in genetic diversity across the range of north american brown bears. Conservation Biology, v.12, n.2, 418-429, 1998.
- Pereira, M. F. Desenvolvimento de Marcadores Moleculares SSR e caracterização Genética de Populações Naturais de *Annona crassiflora* Mart. do Estado de Goiás. Tese de doutorado, UFG, 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 8, 1329–1331, 2008.
- Ratter, J.A; Bridgewater,S.;Ribeiro,J.F.; Analysis of floristic composition of the brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. Endinburgh journal of botany, V.60, N.1, P.57 -109, 2003.
- Ribeiro, J. F.; Walter, B. M. T. As principais fitofisionomias do Cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P.; Ribeiro, J. F. Cerrado: ecologia e flora. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. v. 2, p. 153-199, 2008.

- Rizzini, C. T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado. In: Simposio sobre o Cerrado, 3., São Paulo. Anais... São Paulo: E. Blucher, EDUSP, 1971. p. 61-64, 1971.
- Rousset, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F -statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145, 1219–1228, 1997.
- Schupp, E.W.. Quantity, quality and the effectiveness of seed dispersal. In: Fleming, T. 1993.
- 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 Florestalis*, Piracicaba, v.57, p.123-139, jun. 2000.
- Shapcott, A. The spatial genetics structure in natural population of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum*. *Heredity* v.74, n.1, p.28-38. 1995.
- Silva, L. L. o papel do Estado no processo de ocupação de áreas de Cerrado entre as décadas de 60 a 80. *Caminhos de Geografia*, v.1, n.2, p.24-36, 2000.
- Silva-Junior, M. C.; Felfili, J. M.; A vegetação da estação Ecologicas de Águas Emendadas. Brasília, DF : Instituto de Ecologia e Meio Ambiente de Distrito Federal, 43p. 1996.
- Slatkin, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v.139, p. 457-462, 1995.
- Slatkin, M. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, v. 16., p. 393-430, 1985b.
- Slatkin, M. Estimating level of gene flow in natural populations. *Genetics*, Baltimv. 99, n. 2, p. 323-335. 1981.
- Slatkin, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *American Association for the Advancement of Science*, Philadelphia, v. 236, n. 4803, p. 787-792, 1987.
- Soares, T. N. Estrutura genética populacional e fluxo gênico em *Dipteryx alata* vogel (Fabaceae) no cerrado. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.
- Soulé, M. E. & Wilcox, B. A. An evolutionary-ecological perspective. *Conservation biology*. Sunderland: Sinauer Associates, p.395, 1980.
- Soulé, M. E. The Science of Acarcity and diversity. *Conservation Biology*. Sunderland: Sinauer Associates, p.584, 1986.

- Tautz, D. Hipervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, v.17, n.16, p.6463-6471. 1989
- Tautz, D.; Renz, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 12, n.10, p. 4127-4138, 1984
- Telles MPC, Valva FD, Bandeira LF, Coelho ASG. Genetic characterization of natural populations of "araticunzeiro" (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) collected in the State of Goiás, Brazil. *Rev. bras. Bot.*, 26, 123-129. 2003.
- Tófoli CF Frugivoria e dispersão de sementes por *Tapirus terrestris* (Linnaeus, 1758) na paisagem fragmentada do Pontal do Paranapanema São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – USP, 2006.
- Tóth G.; Gáspari, Z.; Jurka, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, v. 10, p. 967-981, 2000.
- Van der Pijl, L. 1982. Principles of dispersal in higher plants. 2. ed. New York: Springer, 161p.
- Van Rossum, F.; Prentice, H. C. Structure of allozyme variation in Nordic *Silene nutans* (Caryophyllaceae): population size, geographical position and immigration history. *Biological Journal of the Linnean Society*, Oxford, v. 81, n. 3, p. 357-371, Mar. 2004.
- Vekemans, X.; Hardy, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, v. 13, p. 921–935. 2004.
- Vieira, M. H. P. & Irber, M. de V. Emergência e taxa de germinação em *Annona coriacea*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo. Resumos. Nova Friburgo: Sociedade Botânica do Brasil, 1996.
- Wagner, H. W.; Sefc K. M. Identity 1.0. Vienna: Centre for Applied Genetics. University of Agricultural Sciences, 1999.
- Wang, T.; Hagqvist, R.; Tigerstedt, P. M. A. Inbreeding depression in three generations of selfed families of silver birch (*Betula pendula*). *Canadian Journal of Forest Research*, v. 29, p. 662–668, 1999.
- Weber, J. L.; May, P. E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum genet*, v.44, n.3, p.388-396, 1989
- Weber, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT) polymorphisms. *Genomics*, v. 7, p. 524-530, 1990.
- Weber, J. L.; Wong, C. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, v. 2, n. 8, p. 1123-1128, 1993.

- Weir, B. S.; Cockerham C. C. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution Resources*, v. 38, p.1358–1370, 1984.
- Weir, B. S.; Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland, Massachussets: Sinauer Associates Inc, 192 p. 1996.
- Wright, S. Systems of mating. *Genetics*, v. 6, p. 111-178. 1921.
- Wright, S. Evolution in Mendelin population. *Genetics*, Baltimore, v. 16, n. 2, p. 97-159. 1931.
- Wright, S. Isolation by distance. *Genetics*, v. 28, p. 114-138, 1943b.
- Wright, S. The genetical structure of population. *Annals of Eugenics*, v. 15, p. 395-420, 1951.
- Wright, S. Evolution and the genetics of population. Vol.4 Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago. 1978
- Wunderlee Jr., J.M. 1997. The role of animal seed dispersal in accelerating native forest regeneration on degraded tropical lands. *Forest Ecology and Management* 99: 223-235.
- Zane, L.; Bargelloni, L.; Pantarnello, T.; Strategies for microsatellite isolation; a review. *Molecular Ecology*, v. 6, n. 11, p. 1-11, 2002.
- Zucchi, M.I.; Brondani, R.V.; Pinheiro, J.B.; Coelho, A.S.G.; Chaves, L.J.; Vencovsky, R. Genetic Structure And gene flow in *Eugenia dysenterica* DC. in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 449-458. 2003.

