

ANGEL JOSÉ VIEIRA BLANCO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES
NATURAIS DE ARATICUNZEIRO (*Annona crassiflora* Mart.)
PELA ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE cpDNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

**Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes
Coelho**

Goiânia, GO – Brasil
2005

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Blanco, Angel José Vieira.
B641c Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro
(*Annona Crassiflora* Mart.) pela análise de seqüências de cpDNA
[manuscrito] / Angel José Vieira Blanco. – 2005.
93 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2005.

Bibliografia f. 64-78.

Inclui lista de tabelas, figuras, símbolos e siglas.
Anexos.

1. araticunzeiro –Cerrados – Goiás (Estado) 2. Árvores frutíferas
– Cerrados – Goiás (Estado) 3. Marcadores moleculares – Cloro-
plastos 4. Genética de populações I. Coelho, Alexandre Siqueira
Guedes II. Universidade Federal de Goiás, **Escola de Agronomia e
Engenharia de Alimentos**. III. Título.

CDU: 634.41(817.3:251.3)

Página com assinaturas da banca

*Aos meus amados pais Angel e Ivanilde, pelos
incríveis exemplos de força, coragem e trabalho; pelos
grandiosos gestos de solidariedade e amor ao
próximo; pela confiança, amor e incentivo
incondicionais em mim depositados e que sempre
fizeram a diferença; e por me ensinarem sempre,
mesmo de maneira não verbalizada, que “Dinheiro e
Sucesso só vem antes do Trabalho nos dicionários”;*

Dedico

*Às minhas tias Ilza, Ilda, Idália e Ildete, por serem
mais do que simplesmente tias; por serem extensões
de minha mãe; pelo apoio, carinho e incentivo, além
de todo o amor...;*

*À meu irmão, amigo, e companheiro em tantas
histórias incríveis, Francisco Blanco, pela
amizade, apoio e total disposição em colaborar
para que mais essa etapa de minha vida fosse
concluída...;*

*À Simone por todo amor, confiança, e
companheirismo...;*

Ofereço

Agradecimentos

À minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio e incentivo constantes.

A minha amiga Mônica (Moc), por toda amizade e carinho e por me incentivar desde o início – mesmo quando eu ainda estava distante – a realizar esta jornada.

Ao professor Alberto Jorge, por me apresentar à Biologia e assim contribuir de maneira significativa para que eu pudesse escolher minha "opção de vida".

Aos amigos Professores Ivomar Carvalhal, Sérgio Luís e Jorge Rabelo, pela amizade sincera, pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositada ao assinarem cartas de recomendação para minha inscrição no Mestrado.

Ao Professor Drº Alexandre Coelho, pela disponibilidade em me orientar, pelos ensinamentos técnicos e teóricos e por ser responsável pela maior parte do conteúdo aprendido por mim durante o Mestrado.

Ao Professor Fabrício Valva, pelos ensinamentos, pelos ricos debates e pelas preciosas dicas no transcorrer de suas aulas.

Ao professor Lázaro Chaves, pelas dicas e pela contribuição nos esforços de coleta.

À Drª Ana Ciampi da EMBRAPA – CENARGEN, pelas dicas e pelo apoio material para a conclusão dessa pesquisa.

Ao Secretário da Pós-Graduação e amigo particular Welinton Mota, pela presteza, amizade e por toda ajuda dispensada, desde o começo do curso.

A todos os colegas do Laboratório de Genética Vegetal da UFG que colaboraram nos experimentos, em especial a amiga Marlei, pela amizade, pelo auxílio, por todas as dicas e por todos os momentos de ótimo convívio, durante os trabalhos experimentais, as aulas e as coletas.

À Família Santiago (Tia Ivanilde, Srº Francisco, Rosana, Silvana e Mônica), pelo carinho, amizade e principalmente pelo acolhimento de sempre.

Aos amigos Roberto Silva, Cinthia, Valdirene, Fausto, Ulisses, Marina, Aloísio, Roberto Mattoso, Francisco (Chiquinho) e Carlos Eduardo, pela amizade e apoio nas horas necessárias.

Aos “Camaradas Republicanos” Cláudio Karia (Japa) e Robélio Leandro (Ursão), pelo bom convívio, amizade, confiança e principalmente pelos incontáveis momentos divertidos, vividos dentro e fora da UFG.

Às amigas Robertha Garcia e Fabiana Reis pelo carinho e especial atenção, consideração e amizade, dentro e fora da UFG.

Aos colegas de pós-graduação: Tereza, Hélio, Ana Carolina, Maria Mônica, Sivany, Iron (quem éééééé???!!!!), Ananda, Marlei, Gustavo, Ricardo, Simone, Keyla, Robélío, Cláudio Takao, Luciene, Luciana, Juracy, Wesley, Waldir, José Weseli, Anísio, Márcio, Luís, Sandra, Elias, Tarcísio e tantos outros aqui esquecidos, por compartilharem comigo, momentos de diversão e aprendizado, durante os mais de dois anos de curso.

Aos amigos especiais Luís Rocha e Edvan Ferreira, pela amizade particular, confiança e companheirismo constante, desde os tempos de infância.

Aos amigos: Chico Blanco, Alan e Alex Pimentel, Wilden, Nei Paulo, Fábio, Paulo Tadeu, Eduardo da Silva, Soane, George Abreu, Mônica Carvalho e Núbia, pelos muitos momentos de alegria, vividos e compartilhados e pelas diversas manifestações de apoio e encorajamento durante a realização do mestrado.

A UFG pela oportunidade de realização do curso e dos experimentos em suas instalações.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

“Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço.”

Dave Weinbaum

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 O CERRADO	14
2.1.1 Caracterização geral, localização e distribuição.....	14
2.1.2 Fitofisionomia e Solos.....	15
2.1.3 Clima.....	15
2.1.4 Biodiversidade.....	16
2.1.5 História Evolutiva.....	17
2.2 A FAMÍLIA ANNONACEAE.....	18
2.2.1 Características gerais	18
2.2.2 Importância medicinal e farmacológica	19
2.3 O ARATICUNZEIRO	20
2.3.1 Considerações sobre a espécie	20
2.3.2 Características gerais e distribuição geográfica	20
2.3.3 Fenologia	21
2.3.4 Interações ecológicas	22
2.3.5 Importância culinária	24
2.3.6 Importância médica e farmacológica.....	24
2.4 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS	24
2.5 ANÁLISE GENÉTICA DE POPULAÇÕES COM MARCADORES MOLECULARES.....	27
2.6 DIVERSIDADE GENÉTICA DO ARATICUNZEIRO	29
2.7 GENOMA DE CLOROPLASTOS	32
2.8 A TEORIA DA COALESCÊNCIA	36
2.9 EVOLUÇÃO MOLECULAR	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 MATERIAL VEGETAL	42
3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	43
3.2.1 Extração de DNA	43
3.2.2 Amplificação das amostras de DNA	45
3.2.3 Sequenciamento dos fragmentos	46
3.2.4 Seleção das seqüências	46
3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS	47
3.3.1 Análise de diversidade genética.....	47
3.3.2 Teste de neutralidade	47
3.3.3 Análise da estrutura genética das populações.....	47
3.3.4 Análise filogenética dos haplótipos	48
3.3.5 Estimativa do tempo de divergência entre populações	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 DIVERSIDADE GENÉTICA	49

4.2	ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA.....	54
4.3	TEMPO DE DIVERGÊNCIA DAS POPULAÇÕES	59
5	CONCLUSÃO.....	63
6	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXO.....	79

RESUMO

BLANCO, A. J. V. **Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) pela análise de cpDNA.** 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.¹

O araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) é uma espécie de árvore frutífera nativa do bioma Cerrado com elevado potencial de utilização econômica. A forte degradação desse bioma, aliada ao extrativismo predatório a que a espécie vem sendo submetida, justifica a necessidade de desenvolvimento de pesquisas que subsidiem a sua conservação. Objetivando obter informações que indiquem o *status* genético dessa espécie e orientem futuras estratégias de conservação, 82 indivíduos provenientes de 11 populações naturais foram analisados geneticamente. A análise do polimorfismo presente em seqüências da região *trn-L* do genoma cloroplastidial e posterior aplicação dos modelos associados à teoria da coalescência permitiram a detecção de elevados níveis de diversidade genética para a espécie. Os resultados obtidos indicam que, embora as populações amostradas tenham demonstrando elevada similaridade genética entre si, há uma incipiente, mas significativa, diferenciação genética entre elas, que tende a aumentar progressivamente devido ao efeito do isolamento geográfico e à força da deriva. O coeficiente de diferenciação genética entre as populações analisadas foi de 7,3%. A análise de divergência entre as populações amostradas não evidenciou a existência de associação significativa dos padrões de diferenciação genética com a distância geográfica entre elas. As informações obtidas pela análise baseada no modelo de coalescência permitiram a identificação de diferentes cenários evolutivos para as populações estudadas. Dentre as populações amostradas, foram identificadas desde populações em bom estado de conservação até populações com baixíssimos níveis de diversidade genética. Os resultados obtidos pela utilização do modelo coalescente para se inferir o tempo de divergência entre as populações sugeriram que as populações de *A. crassiflora* até há muito pouco tempo se constituíam em um grande contínuo populacional, sendo a baixa diversidade encontrada entre as populações atribuída ao pequeno tempo de divergência entre elas.

Palavras-chave: cerrado, araticunzeiro, marcadores moleculares, cpDNA, genética de populações, diversidade genética.

¹ Orientador: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho. EA/ICB-UFG

ABSTRACT

BLANCO, A. J. V. **Genetic characterization of natural populations of araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) by cpDNA sequence analysis.** 2005. 93 f. Dissertation (Master in Agronomy: Genetic and Plant Breeding) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.²

The “araticunzeiro” (*Annona crassiflora* Mart.) is a tropical fruit tree species from the Cerrado (Brazilian Savannah) with high economic potential. The strong degradation of the Cerrado, allied to the predatory extractivism that threatens the species, points out to the necessity of development of research to support future conservation programs. With the aim to furnish information about the genetic status of this species and to guide future conservation strategies, 82 individuals from 11 natural populations were submitted to genetic analysis. The coalescent based analysis of the polymorphism present in the *trn-L* cpDNA allowed the detection of high levels of genetic diversity in the species. In spite of the high level of genetic similarity among different populations the results produced suggested that, , there is an incipient, but statistically significant, increasing differentiation process taking place due to current status of geographical isolation and genetic drift. The genetic differentiation coefficient estimated was equal to 7.3%. The spatial genetic divergence analyses suggested that the genetic distances are not associated to geographical distances between populations, evidencing the absence of current gene flow between adjacent populations. The coalescent based approach allowed the identification of different evolutionary scenes to the investigated populations. Among sampled populations cases from well conserved status to dangerous low levels of genetic diversity were detected. Results obtained by the use of coalescent models to infer the divergence time between populations suggested that natural populations of *A. crassiflora* were, until recently, part of a great regional continuum. These findings suggest that the low levels of genetic diversity among different populations must be due to the small time since isolation.

Key words: cerrado, araticunzeiro, molecular markers, cpDNA, populations genetics, gene diversity.

² Adviser: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho. EA/ICB-UFG.

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é um extenso bioma brasileiro que abriga milhares de espécies de aves, mamíferos, plantas e outros organismos. A maior parte do cerrado brasileiro está localizada no Planalto Central e apenas a Floresta Amazônica o supera em tamanho. Com exceção da região Sul, todas as outras regiões do Brasil possuem áreas deste importante *hotspot* de biodiversidade.

Características particulares da região dos Cerrados conduziram as plantas, ao longo de seus processos evolutivos, a mudanças que lhes permitissem adquirir melhores condições adaptativas. O que se vê hoje é uma rica composição de espécies, muitas das quais típicas ou endêmicas, altamente adaptadas aos ambientes deste Bioma. A elevada acidez de seus solos é responsável pela carência de alguns nutrientes importantes para o metabolismo das plantas. Esse perfil característico de solos e o regime sazonal das chuvas podem estar entre os principais fatores responsáveis pela especificidade fenotípica encontrada nas plantas do Cerrado.

Em meio à sua rica diversidade encontram-se plantas que guardam muitas propriedades interessantes, algumas particularmente importantes para o homem quer seja como alimento, fármaco ou ainda como cosmético, sem falar em outras utilizações. A obtenção de novas informações sobre o *status* genético e comportamento reprodutivo e ecológico de populações naturais de plantas do Cerrado pode então permitir que estratégias adequadas de conservação e melhoramento sejam adotadas, a fim de que o vasto potencial das espécies desse Bioma seja melhor utilizado.

Entre as muitas espécies de plantas com características especiais existentes no Cerrado encontra-se *Annona crassiflora*, comumente conhecida como araticunzeiro. Dentro do conjunto de interessantes propriedades farmacológicas dessa espécie, destaca-se a sua utilização por populações regionais no tratamento de picadas de cobras (Santos et al., 1996) e em afecções parasitárias no couro cabeludo (Almeida et al., 1998). Substâncias extraídas do Araticum já foram também testadas no combate a células tumorais (Santos et al., 1996) e micoses sistêmicas (Ribeiro et al., 2000). Seus frutos são ainda utilizados como

fonte de matéria prima na confecção de uma ampla diversidade de produtos alimentícios como sorvetes, geléias, cremes e licores (Ribeiro et al., 2000).

O araticunzeiro é apenas uma das espécies da grande e diversificada família Annonaceae, encontrada em sua maior parte, em ambientes tropicais e subtropicais. Aproximadamente 2500 espécies são conhecidas nessa família, cuja utilização diversificada e importância ecológica movimentam o interesse da comunidade científica específica (Gottsberger, 1999).

Durante milhares de anos o araticunzeiro ficou sujeito às forças evolutivas que, de certo modo, “forçaram” suas populações a apresentarem suas características genéticas atuais. Nesse sentido, Carlini-Garcia et al. (2001), atribuem à Genética de Populações um papel fundamental, tanto no entendimento desses processos evolutivos como no desenvolvimento do melhoramento genético de plantas. É importante saber como a variabilidade genética de populações naturais de plantas está representada e também distribuída, uma vez que, devido a sua falta de flexibilidade de deslocamento, espécies de plantas podem apresentar variações entre e dentro de suas populações, ao longo do tempo ou entre regiões geograficamente separadas.

Para obtenção de dados a respeito da magnitude e distribuição da variabilidade genética em populações naturais, atualmente são utilizadas técnicas que objetivam avaliar o polimorfismo presente no material genético de cada espécie. Comumente chamada de marcadores moleculares, esse conjunto de técnicas representam uma importante ferramenta, capaz de avaliar a constituição genética dos indivíduos, permitindo se estabelecer o grau de similaridade entre eles (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os marcadores moleculares são também utilizados em análises de mapeamento genético e ainda em estudos de sistemática (Lopes et al., 2002).

A partir da evolução das tecnologias de manipulação e análise de DNA, hoje cada vez mais refinadas, um grande avanço foi dado no campo da genética molecular de plantas. Atualmente, uma gama de informações sobre os fenômenos genéticos e os processos evolutivos em populações de plantas pode ser obtida através da análise de seqüências de DNA de cloroplasto (cpDNA).

Dentre as muitas características que diferenciam o cpDNA está a sua condição haplóide: uma particularidade que aumenta a sua utilidade na detecção de mudanças ocorridas na constituição genética das populações ao longo das gerações, tornando-o mais sensível para elucidar caminhos evolutivos percorridos por populações de plantas

(McCauley, 1994; Ennos et al., 1999).

O progresso das técnicas moleculares de análise genética foi acompanhado por melhorias nos fundamentos da teoria da genética de populações, anteriormente desenvolvida apenas através da aplicação dos modelos matemáticos existentes aos dados de frequências alélicas, obtidas por meio de caracteres morfológicos ou isoenzimas. A união da teoria da coalescência de Kingman (1982) à teoria neutralista de evolução molecular de Kimura (1968) permitiu então a obtenção de uma série de informações sobre os processos históricos e demográficos que governaram o passado das espécies e de suas populações.

Com a ampliação da teoria da genética de populações tornou-se possível não só se estabelecer genealogias de genes, mas também, voltar no tempo através dessas genealogias e detectar a introgressão de genes de uma espécie em outra. Além disso, o progresso dessas teorias e o surgimento de novos e complexos modelos permitiram inferir de maneira mais realística o tempo de divergência entre espécies e entre populações de uma mesma espécie, bem como traçar rotas migratórias que muitas espécies utilizaram para se estabelecer, depois do último período glacial.

Foi justamente com um propósito de se utilizar estas inovações na caracterização genética de uma espécie nativa de Cerrado que esse trabalho foi desenvolvido. Os resultados aqui apresentados para o araticunzeiro, obtidos através da união da técnica de seqüenciamento com a teoria dos coalescentes, representam uma contribuição para uma melhor compreensão sobre a história evolutiva desta espécie e de seu *status* genético atual. Espera-se que estas informações possam contribuir efetivamente para a orientação adequada dos esforços para a sua conservação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CERRADO

2.1.1 Caracterização geral, localização e distribuição

Árvores pequenas, de troncos retorcidos e recurvados e de folhas grossas, esparsas em meio a uma vegetação rala e rasteira, misturando-se, às vezes, com campos limpos ou matas de árvores não muito altas – essas são as principais características do Bioma Cerrado, uma extensa área de cerca de 200 milhões de hectares (Embrapa, 1996), o que corresponde a aproximadamente 23% do território brasileiro (Ab’Saber, 1983; Lopes, 1984), e ao tamanho de toda Europa Ocidental (Embrapa, 1996).

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro em área, ficando atrás apenas da Floresta Amazônica. Suas características guardam relações fisionômicas e ecológicas com as Savanas tropicais da África, da Austrália (Beard, 1953; Cole, 1958; Eiten 1972, 1994; Allem & Valls, 1987) e da América: Bolívia, Paraguai, Colômbia, Suriname e Venezuela. Nesses países da América Latina, o Cerrado por vezes recebe outras denominações como Llanos, por exemplo (Ribeiro & Walter, 1998).

Ocorrendo em altitudes que variam de 300m a mais de 1600m (Ab’Saber, 1983; Lopes, 1984), o Cerrado está localizado entre 5° a 20° de latitude Sul e 45° a 60° de longitude Oeste, distribuindo-se principalmente nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e Distrito Federal (Silva et al., 2001). Apesar de algumas áreas de Cerrado se localizarem periféricamente formando regiões de transição (ecótonos) com os biomas Amazônia, Mata Atlântica e Caatinga, a área nuclear ou *core* do Cerrado está localizada principalmente no Planalto Central (Arruda, 2001). Assim, o território brasileiro é marcado pela existência de ilhas de Cerrado dentro de outros ecossistemas: Floresta Amazônica (ao Norte nos Estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima), Floresta Atlântica (ao Sul em pequenas “ilhas” no Paraná), Caatinga (Eiten, 1994) e no Pantanal (Adámoli, 1982; Allem & Valls, 1987).

2.1.2 Fitofisionomia e solos

As fitofisionomias do Cerrado, seguindo conceitos e definições de Ribeiro & Walter (1998) são classificadas em onze típicas formações do domínio Cerrado. Algumas delas apresentam subtipos e foram agrupadas por esses autores em: formações florestais (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão), savânicas (Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda) e campestres (Campo Sujo, Campo Rupestre e Campo Limpo).

Os solos sob Cerrado são profundos, ácidos e com elevado teor de alumínio e ferro, situando-se entre os mais antigos do mundo (Kozovits, 1977). A alta deficiência de nutrientes - especialmente N, P, K, Ca, Mg, B, S, Cu e Zn - provocada pelo alto nível de intemperização e a baixa capacidade de troca de cátions - o que facilita a lixiviação dos cátions do solo e necessidade generalizada de fósforo para as plantas - são outras características desses solos, que têm o fósforo, na maior parte das vezes, como seu elemento mais escasso (Naves, 1999).

As principais unidades e solos que ocorrem na região do Cerrado são os Latossolos, ocupando cerca de 56% do total, seguindo-se cerca de 20% de Areias Quartzosas, 10% de Lateritas hidromórficas, 9% de Litossolos e menores porcentagens de Podzólicos. A textura é, possivelmente, a característica física mais importante dos solos do Cerrado, dada sua estreita relação com a fixação de fósforo, capacidade de retenção de água e de troca de cátions (Lopes, 1984).

2.1.3 Clima

Na região de domínio do Cerrado, o clima é bastante heterogêneo, sendo subdividido por Azevedo & Caser (1979) em cinco sub-regiões: i. Sub-região com influência amazônica, mais quente e úmida (Norte de Goiás e Mato Grosso e Oeste do Maranhão); ii. Sub-região com influência do trópico semi-árido, mais quente e seca (Leste de Goiás, Norte de Minas Gerais, Bahia e Piauí); iii. Sub-região de Cerrado em clímax, constituída pela área nuclear da região; iv. Sub-região com influência austral continental, mais fria e seca (Mato Grosso do Sul, Sul de Goiás e Norte de São Paulo); e 5. Sub-região com influência austral atlântica, mais fria e úmida (Sul e Sudoeste de Minas Gerais).

A maior parte da região do Cerrado, entretanto, é classificada como clima de ar

quente e úmido, com uma longa estação seca (Lopes, 1984). A temperatura média anual é 20-26°C (Eiten, 1972), mas na parte sul do Estado de São Paulo, pode chegar à média de 18°C. A pluviosidade anual varia de 750–800 mm na parte mais seca dessa região (lado Nordeste), até 2000mm no Oeste (Reis, 1971).

2.1.4 Biodiversidade

A vegetação arbórea e arbustiva do Cerrado é bem conhecida (Ratter et al., 1997). Rizzini (1963) divulgou uma lista básica de plantas do Cerrado a qual foi posteriormente ampliada por Heringer et al. (1977). Nesses trabalhos foram registradas 774 espécies (336 endêmicas), pertencentes a 261 gêneros. As matas de galeria e florestas mesofíticas não foram consideradas nessa lista. Ao todo, são mais de oitocentas espécies de árvores e de grandes arbustos, além de um número muito grande de espécies rasteiras como subarbustos e ervas. Ervas, subarbustos e de arbustos menores apresentam uma diversidade maior do que as plantas de maior porte. A quantidade de espécies é tão grande que apenas em poucas localidades existem listas bem detalhadas disponíveis (Ratter & Ribeiro, 1996).

No trabalho de Rizzini (1963) foram listados mais de quinhentos gêneros de plantas pequenas e aproximadamente duzentos gêneros de plantas lenhosas. No trabalho de Heringer et al. (1977), aproximadamente sessenta gêneros foram acrescentados à lista de plantas lenhosas. A diversidade de árvores e de grandes arbustos pode alcançar 120 espécies por hectare, entretanto um número menor de espécies por área é geralmente considerado. Em locais como o isolado Cerrado amazônico, entretanto, a magnitude da diversidade é menor, podendo ocorrer até menos que dez espécies por hectare (Ratter et al., 1996).

De acordo com Heringer et al. (1977), as famílias mais importantes em número de espécies são: Leguminosae (153 spp.), Malpighiaceae (46 spp.), Myrtaceae (43 spp.), Melastomataceae (32 spp.) e Rubiaceae (30 spp.). Ainda de acordo com o estudo desse autor, depois que as afinidades geográficas dos 261 gêneros encontrados no Cerrado foram analisadas, verificou-se que: em 205 gêneros existem espécies comuns à Mata Atlântica brasileira; duzentas comuns à Floresta Amazônica e, trinta comuns à Floresta Mesofítica.

A diversidade do Cerrado não está restrita às plantas. Segundo estimativas de Dias (1992), existem noventa mil espécies de insetos, quarenta mil espécies de fungos, 150

de mamíferos e 550 de aves, algumas das quais endêmicas.

2.1.5 História evolutiva

A história evolutiva do Cerrado, assim como a riqueza da vegetação neotropical - tanto das savanas quanto das florestas – possui uma estreita relação com as histórias geológica e climática pré-pleistocênicas do Continente Sul Americano (Van der Hammen, 1974; 1991; Ratter & Dargie, 1992).

A expansão da vegetação típica do Cerrado se deu durante o pleistoceno, provavelmente incluindo florestas mesofíticas decíduas como um elemento dominante (Prado & Gibbs, 1993; Ratter et al., 1996), ao mesmo tempo em que ocorria a contração da Floresta Amazônica nos períodos glaciais, e vice-versa nos períodos interglaciais (Prance, 1973). Esses processos produziram complicados padrões em ambos, flora e fauna, e a fragmentação de populações provavelmente levou à exuberante especiação que existe atualmente (Ratter et al., 1997). Embora não haja evidências fósseis da história do Cerrado, existem sugestões de que antes da separação dos continentes da África e América do Sul, ainda no Cretáceo, teria existido um protótipo de Cerrado (Ratter & Ribeiro, 1996).

A rica biodiversidade do Cerrado, estimada por Dias (1992) em aproximadamente 160.000 espécies de plantas, fungos e animais, surgiu provavelmente como resultado da longa existência desse bioma associada à dinâmica formação dos padrões de distribuição de espécies, durante o pleistoceno. A longa história evolutiva do Cerrado tem possibilitado o surgimento de complexos padrões co-evolutivos (Ratter et al., 1997) como o que existe entre o araticunzeiro e o seu polinizador. A fragmentação de populações pode estar entre as principais causas da evolução de muitas espécies endêmicas e do isolamento de *pools* gênicos (Ratter et al., 1997). A ocupação do Cerrado e a expansão da fronteira agrícola, iniciados há mais ou menos setenta anos, podem estar entre os principais processos de fragmentação.

Embora diversos autores tentem explicar a existência da biodiversidade como resultado dos muitos processos de contração-expansão entre o Cerrado e a Floresta Amazônica no pleistoceno, existem controvérsias sobre a fragmentação da floresta úmida e sobre a possibilidade de ter ocorrido regiões de abrigo de fauna e flora (Teoria dos Refúgios). Barberi (2001) faz uma longa discussão sobre a evolução do Cerrado, cita algumas teorias e os muitos fatores que estão relacionadas com a origem e a manutenção

da biodiversidade nessa região.

Contrariando a Teoria dos Refúgios, Colinvaux et al. (2000) afirmam que durante o pleistoceno, a floresta úmida tropical, em nenhum momento sofreu fragmentação. Segundo esses autores, dados de pólen revelam persistência da vegetação amazônica frente às alterações climáticas dos ciclos glaciais. Na realidade, mudanças na composição da vegetação estariam relacionadas à queda de temperatura, que assim teria permitido a entrada de elementos de vegetação andina, na Floresta Amazônica (Colinvaux et al., 1996).

2.2 A FAMÍLIA ANNONACEAE

2.2.1 Características gerais

As Annonaceae se constituem em uma das famílias mais prósperas e primitivas da ordem Magnoliales. Altamente diversificada, foi estimada por Gottsberger (1989b), em aproximadamente 2.300 espécies. Em dez anos, novos estudos e descobertas redimensionaram o tamanho dessa família, aproximando para 2500 o seu número de espécies (Gottsberger, 1999). As Annonaceae possuem cerca de 120 gêneros e espécies descritas na América, na África e também na Ásia (Barroso, 1978). A maioria de suas espécies é nativa das regiões tropicais e subtropicais (Donadio, 1997). Nos trópicos do velho continente, geralmente, são plantas escandentes e ocorrem em matas pouco densas, mas na América tropical são arbustivas ou arbóreas e crescem em campos ou lugares abertos. No Brasil, existem 29 gêneros com cerca de 260 espécies (Barroso, 1978).

A uniformidade anatômica e estrutural, de hábito e de habitat é uma das principais características das Annonaceae. Trata-se de uma família muito distinta das demais por apresentar uma combinação de caracteres marcantes (Barroso, 1978). A maioria de seus representantes é polinizada por diferentes grupos de coleópteros - cantarofilia - (Gottsberger 1970; 1989b). Além de se alimentarem dos grãos de pólen e dos tecidos nutritivos das pétalas, esses insetos utilizam as flores para se reproduzir e para se proteger da luz do dia e de predadores (Gottsberger, 1989b).

2.2.2 Importância medicinal e farmacológica

Muitos trabalhos publicados têm relacionado as Annonaceae com patologias, indicando sua elevada importância medicinal. Seus compostos bioativos têm ampla aplicabilidade farmacológica em doenças de pele, especialmente queimaduras (Kan, 1979), contra o vírus do herpes simplex (Padma et al., 1998), na inibição da proliferação de células cancerígenas e indução a apoptose (Chih et al., 2001), na atividade moluscicida: contra o vetor da esquistossomose (Bezerra et al., 2002) e na atividade antiparasítica: contra a Leshimaniose (Fournet et al., 1993), contra o *Trypanosoma cruzi* e contra *Plasmodium sp.* (Likhitwitayawuid et al., 1993). Na Bolívia, as Annonaceae são utilizadas tradicionalmente em casos de febres e contra vermes que acometem a população humana (Mahiou et al., 2000). No Cerrado brasileiro, sementes de araticunzeiro são usadas para remediar picadas de cobras (Correia, 1926).

Segundo Rupprecht (1990) e Fang (1993), de maneira geral a família Annonaceae apresenta constituintes alcalóides e não alcalóides farmacologicamente importantes, como por exemplo: as flavononas benziladas, com propriedades citotóxicas e antimicrobianas; os diterpenos, com atividade antitumoral; a oliverolina, com propriedades antiparkinsoniana; e a liriodenina, com atividades antitumorais, bactericida e antifúngica. Ainda de acordo com esses autores, *Annona crassiflora* e algumas outras Annonaceae possuem uma substância com propriedades herbicidas. Conhecida pelo nome de acetoginina, essa substância exibe também atividade contra afídios e piolhos. Populações tradicionais de Doverlândia-GO utilizam essa propriedade da acetoginina para tratar de afecções parasitárias do couro cabeludo utilizando extrato de sementes do Araticum (Almeida et al., 1998). A acetoginina forma um amplo grupo de mais de 320 produtos naturais somente encontrados em plantas da família Annonaceae, alguns dos quais oferecem um grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais e inseticidas, principalmente por que possuem habilidade de interferir no processo de transporte de elétrons nas mitocôndrias, inibindo a fosforilação oxidativa, levando à ocorrência de apoptose celular (Chavez et al., 2001).

O gênero *Annona* está entre os mais estudados da família Annonaceae. Parece ter surgido e se diversificado na Floresta Amazônica e áreas próximas. O Cerrado brasileiro e o oeste da Índia são, provavelmente, centros secundários de diversificação (Fries, citado por Gottsberger, 1989b).

2.3 O ARATICUNZEIRO

2.3.1 Considerações sobre a espécie

O araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) é uma espécie com grande potencial agrícola no Cerrado, destacando-se entre outras tantas. Popularmente, também é conhecido como Bruto, Cabeça-de-Negro, Pinha-do-Cerrado, Cascudo e Marolo. Assim como a Cherimóia, Pinha e Graviola, o araticunzeiro é uma espécie frutífera, pertencente à família Annonaceae (Ribeiro et al., 2000). Possui elevado potencial de utilização econômica, tanto pelo valor dos seus frutos e dos produtos deles derivados, quanto pelas possíveis interações com as outras Annonaceae em termos de propagação e melhoramento. Apesar disso, poucos estudos foram feitos nesse sentido, sendo necessárias mais pesquisas para que essa frutífera tenha potencial competitivo e se torne mais propícia a atender à demanda dos processos produtivos (Naves et al., 1994).

Encontrado amplamente sob sua forma natural no Cerrado, o araticunzeiro é nativo do Planalto Central brasileiro. Pesquisas nas fitofisionomias do Cerrado têm elucidado a distribuição da ocorrência natural dessa espécie. O araticunzeiro foi encontrado em 104 das 316 localidades pesquisadas por Ratter et al. (2000). Esses resultados ratificam os achados de Naves (1999). Segundo esse autor, o araticunzeiro é uma árvore frutífera relativamente comum no Cerrado. Em cinquenta localidades amostradas por ele, o araticunzeiro foi encontrado em 37 delas. Em algumas dessas áreas, verificou-se a presença de até 94 indivíduos por hectare, o que pode ser interpretado como uma alta densidade de plantas por área.

2.3.2 Características gerais e distribuição geográfica

Árvore preferencialmente alógama, o araticunzeiro possui flores, folhas e ramos jovens com densa pilosidade marrom-avermelhada e órgãos vegetativos glabrescentes com a idade (Ribeiro et al., 2000). Apresenta folhas alternas, simples, pecioladas, sem estípulas; limbo com 5,5 cm a 13 cm x 3,5 cm a 10 cm, largamente obavado a oblongo, cartáceo e coriáceo; ápice arredondado a obtuso; base arredondada, obtusa ou subcordada; pecíolo com 2 mm a 6 mm de comprimento (Almeida et al., 1998). As flores apresentam-se isoladas, axilares, com 2,0cm a 3,5cm de comprimento,

actinomórficas, internamente creme amareladas, crassas; com três sépalas livres; seis pétalas livres; numerosos estames; anteras subsésseis, oblongas, de conectivo espessado; ovário dialicarpelar, súpero, com muitos carpelos uniovulados e estigma sésil (Almeida et al., 1998). O fruto é sincárpico com até 15 cm de diâmetro e 2 kg de peso, oval a arredondado, externamente marrom-claro, cremoso, internamente creme amarelado, com polpa firme; sementes numerosas e elípticas (Almeida et al., 1998). Em condições naturais a frutificação ocorre entre fevereiro e março (Silva et al., 1997).

O araticunzeiro pode ser encontrado em várias fitofisionomias do Cerrado: Cerrado sentido restrito (Cerrado denso, Cerrado ralo, Cerrado típico), Cerradão e Campo rupestre. Sua distribuição é ampla, ocorrendo em vários Estados brasileiros: Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Distrito Federal, Tocantins, Maranhão, Pará, Bahia e Piauí, além do Paraná (Ratter et al., 2000) e São Paulo (Durigan et al., 1999).

2.3.3 Fenologia

As diversas estratégias fenológicas das espécies do Cerrado e sua importância funcional na composição desse importante ecossistema podem ser explicadas pelo ajustamento das fenofases subseqüentes à etapa inicial de estabelecimento das plantas, que dessa forma não seriam determinadas diretamente pelas condições ambientais (Oliveira, 1998). Assim, parece que apenas o sucesso no estabelecimento de uma planta nativa do Cerrado é rigidamente determinado pelas condições ambientais (Ribeiro et al., 2000).

Com referência ao estabelecimento de plantas como o araticunzeiro no cerrado, Ribeiro et al. (2000) relacionam o sucesso das mesmas com a maneira pela qual as sementes são dispersas. As espécies que utilizam o vento como meio de dispersão, começam a dispersar suas sementes entre o fim do período de seca e o início do período de chuvas. As espécies que utilizam os animais para a atividade de dispersão começam a dispersar suas sementes no período chuvoso, quando a atividade desses agentes dispersores é maior. As sementes do araticunzeiro são dispersas por animais – zoocoria (Rizzini, 1971). Dois exemplos de animais dispersores de sementes dessa espécie são: o Cachorro-do-Mato e o Lobo-Guará (Toledo & Lombardi, 1996). Segundo Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger (1983), apesar de *Annona crassiflora* apresentar modo de dispersão similar ao de *Annona coriaceae*, a densidade e a distribuição espacial de ambas

são diferentes. Isso indica que fatores como o potencial de competição, amplitudes ecológicas ou facilidade de germinação, são importantes para poder explicar melhor os diferentes padrões de dispersão observados (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 1983).

No Cerrado, a intensidade da zoocoria é diretamente proporcional ao grau de atividade em que tais animais se encontram. No período chuvoso essa atividade é maior, provavelmente devido a uma maior umidade e um melhor sombreamento, contrastando com o período de seca, em que a maior parte da vegetação apresenta caducifolia e a disponibilidade de alimentos diminui (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 1983).

Rizzini (1971) e Oliveira (1998) verificaram que sementes de araticunzeiro passam por um período de dormência. Este comportamento parece estar ligado ao período de dispersão e germinação da espécie no seu ambiente natural. Esse período de dormência coincide com o período de seca, que dura de cinco a seis meses no Cerrado. Durante este período as sementes ficam suscetíveis ao ataque de fungos e larvas de insetos. Assim, o estabelecimento dessa espécie torna-se um processo complicado. Segundo estes autores, problemas com a germinação de sementes do araticunzeiro acontecem devido à dureza da testa, a qual precisa ser escarificada, e também pela imaturidade do embrião, quando da maturação em condições de seca. Ainda de acordo com esses autores a taxa de germinação apresentada pelo araticunzeiro é de aproximadamente 60%, aos 250 dias. De acordo com Oliveira (1991), esse processo de dormência é muito importante para o sucesso no estabelecimento dessa espécie no Cerrado. Sob esse aspecto, conclui-se que um dos fatores mais importantes para o estabelecimento do araticunzeiro no Cerrado é a presença de uma maior umidade causada pela chegada das chuvas, uma vez que a germinação só ocorre nove meses depois, novamente com a chegada da estação chuvosa.

2.3.4 Interações ecológicas

O araticunzeiro, assim como outras espécies lenhosas do Cerrado, é adaptado a solos pouco férteis e ácidos. O solo apresenta baixa quantidade de água superficial no período seco, razão pela qual, as plantas do Cerrado apresentam raízes profundas que podem absorver água a mais de um metro de profundidade (Ribeiro et al., 2000).

Apesar de a água ser um fator limitante no estabelecimento das plantas do Cerrado, no crescimento destas, existe um fator ainda mais problemático: a escassez de sais minerais dos solos, que são classificados como pobres em relação ao atendimento das

necessidades das plantas (Alvim & Araújo, 1952). Nesse sentido, o sucesso de estabelecimento e distribuição espacial de uma espécie depende também das condições do solo local (Almeida et al., 1998). De acordo com o levantamento feito em Goiás por Naves (1999), o araticunzeiro apresenta tendência em não ocorrer em áreas associadas aos cascalhos ou às concreções, ocorrendo em maior densidade em Latossolos Vermelho-Amarelos, principalmente em ambientes com altitudes acima de 750m.

No período de florescimento, as flores de *Annona crassiflora* precisam de alguma forma atrair os seus agentes polinizadores – besouros – e conseguem isto através da emissão de um odor característico, produzido em decorrência da termogênese, um mecanismo de aquecimento interno da flor que começa geralmente ao anoitecer e pode fazer a temperatura da flor chegar a 10°C acima da temperatura do ar. A termogênese pode ser afetada em virtude de chuvas ou variações extremas de temperatura (Gottsberger, 1989b).

A elevação da temperatura da flor ocorre durante a sua fase feminina nas primeiras horas da noite. A emissão do odor atrai os besouros que pousam nas flores e entram na câmara de polinização. Durante a primeira parte da noite, o estigma normalmente é protegido e separado dos estames. Depois da fecundação, os estames entram em deiscência, se separam e juntamente com o pólen, caem na câmara de polinização. Na segunda etapa da mesma noite as pétalas também se separam do receptáculo floral. A corola da flor de *Annona crassiflora* é soldada e, portanto, as pétalas permanecem juntas como uma só unidade mesmo após a queda da flor. Ao deixar a flor na noite seguinte, os besouros estão cobertos com os grãos de pólen pegajosos, sendo atraídos pelo odor de outras flores na fase feminina, efetuando assim, a polinização (Gottsberger, 1999).

Os besouros polinizadores podem passar o dia inteiro no interior da flor, saindo somente no início da noite seguinte à noite da visita, coberto de pólen para visitar outras flores recém-abertas. Apesar de haver baixa sobreposição no período de florescimento, o cruzamento entre espécies diferentes de *Annona* não ocorre devido aos picos de floração das espécies serem diferentes. Além do mais, duas espécies de besouros alternam-se na visita das flores das espécies desse gênero, diminuindo mais ainda o fluxo de pólen entre essas espécies com floração em sobreposição (Gottsberger, 1989a).

2.3.5 Importância culinária

Uma das características mais importantes no araticunzeiro é o seu potencial frutífero. Seus grandes frutos são consumidos *in natura* pela população local, bem como vendidos em feiras e beiras de estradas. Várias receitas produzidas à base da polpa adocicada e aromática do Araticum são conhecidas popularmente e divulgadas pela literatura que explora o potencial das frutas nativas do Cerrado. Geléias, licores, bolos, bombons, cremes, gelatinas, pudins e iogurtes, são alguns dos produtos que podem ser produzidos através do Araticum (Ribeiro et al., 2000).

2.3.6 Importância médica e farmacológica

Diversos compostos já foram isolados de *Annona crassiflora* (Ribeiro et al., 2000). De suas folhas pode ser extraído o extrato bruto etanólico, cujo poder inibitório de crescimento do fungo *Cryptococcus neoformans* causador da criptococose, foi observado por Silva & Silva (1998). Esse fungo provoca micose sistêmica e é grande causador de mortalidade, principalmente em aidéticos. Tratamentos medicamentosos a partir desses extratos podem vir a substituir outros tratamentos contra esse fungo, uma vez que os tratamentos existentes apresentam elevada carga tóxica e nem sempre são efetivos (Ribeiro et al., 2000).

A araticulina, composto extraído de sementes de Araticum, exibe atividade significativa contra linhagens de células tumorais (Santos et al., 1996). A partir da pulverização de sementes e de folhas de Araticum, populações nativas preparam infusões para combater a diarreia, induzir a menstruação (Almeida et al., 1987) e inibir o efeito de picadas de cobra (Santos et al., 1996).

Além da utilidade medicinal e alimentícia, o araticunzeiro pode servir como fonte de matéria prima para outros produtos como: carvão vegetal, bóias e redes (Correia, 1926).

2.4 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS

As populações naturais são coleções de indivíduos de uma mesma espécie, que vivem temporariamente juntos em um mesmo habitat. Do ponto de vista genético, elas

podem ser definidas como grupos de indivíduos que, apesar de estarem próximos e serem intercruzantes, têm reduzido fluxo gênico com outros grupos mais distantes e da mesma espécie (Conner & Hartl, 2004). Do ponto de vista ecológico, elas são consideradas agrupamentos de indivíduos de uma mesma espécie que estabelecem relações ecológicas mútuas. Sob essa ótica, os alelos sofrem influência não só de outros alelos, mas também do ambiente onde os indivíduos vivem (Snaydon, 1987).

Embora pareçam existir em faixas contínuas, as populações naturais de plantas não se apresentam distribuídas de maneira aleatória no espaço, atribuindo-se à uma série de fatores, a sua disposição dentro de um contexto genético estrutural (Loveless & Hamrick, 1984). Nesse sentido, qualquer população torna-se um importante elemento do ponto de vista evolutivo, uma vez que, é dentro das populações onde os processos evolutivos ocorrem primeiramente, fazendo-as evoluir por meio de mudanças nas suas frequências gênicas (Conner & Hartl, 2004).

Os processos evolutivos, também chamados processos microevolutivos ou forças evolutivas, são representados pela mutação, seleção natural, migração (fluxo gênico) e deriva genética. Este último é tão mais significativo quanto menor for uma população e juntamente com a seleção natural atua diminuindo a variação genética existente dentro dela. Por outro lado, o fluxo gênico e as mutações aumentam a variabilidade genética, exercendo um efeito homogeneizador entre as populações de uma mesma espécie. (Mettler & Gregg, 1973; Mayr, 1977).

A interação das forças evolutivas pode provocar alterações no *pool* gênico de qualquer espécie e assim dinamizar constantemente a estrutura genética de suas populações. Concomitantemente, outros fatores podem se encontrar relacionados a esse processo de estruturação. Tais fatores incluem: a organização das alterações genéticas recém surgidas em novos genótipos, organização espacial desses novos genótipos, o controle da união de gametas pelo sistema reprodutivo durante a formação das progênies, a dispersão dessas progênies, além de fatores estocásticos e dos processos de crescimento, mortalidade e reposição de indivíduos (Clegg, 1980; Hamrick, 1983; Loveless & Hamrick, 1984; Hamrick, 1989).

Duas importantes peculiaridades comuns a todas as plantas são a sua mobilidade reduzida e a baixa capacidade de propagar seus genes. Essas características amplificam a magnitude da estrutura genética nas populações e condiciona o surgimento de uma estrutura espacial. A estrutura genética fica então, à mercê de fatores ecológicos que

podem afetar a reprodução dos indivíduos e a dispersão de seus pólenes e de suas sementes. Esses padrões de estruturação genética e espacial geralmente surgem como consequência do estabelecimento de indivíduos em diferentes ambientes, sob diferentes pressões seletivas (Loveless & Hamrick, 1984).

Espécies que apresentam algum modo de reprodução uniparental, que estejam agrupadas em pequenas populações e que possuam dispersão restrita de pólenes e sementes tendem a apresentar a maior parte de sua variação genética distribuída entre suas populações. Por outro lado, espécies de fecundação cruzada, cosmopolitas, polinizadas pelo vento, com ciclo de vida longo, com estágios sucessionais tardios e com elevada fecundidade ao longo de seu ciclo de vida, conseguem manter maiores proporções de sua variação genética, dentro de suas populações (Hamrick et al., 1979).

Os esforços voltados para a obtenção do conhecimento sobre a variabilidade genética existente tanto entre como dentro das populações se devem principalmente ao suporte que esses estudos podem dar à domesticação e melhoramento de espécies nativas e à conservação dos recursos genéticos como um todo. Existe a necessidade de se entender como essa variabilidade está distribuída e como essa distribuição é influenciada pelas características dos indivíduos e do ambiente (Hamrick, 1983). Isto por que, quase todas as populações de organismos vivos estão distribuídas em ambientes descontínuos. Essa ausência de conectividade entre populações pode ser causada não só pela fragmentação de habitats, como também por comportamentos diversos que levem a formação de grupos, tais como bandos, rebanhos ou colônias (Pickett & White 1985; Krebs & Davies 1997). Em tais casos, a taxa de homozigotos tenderá a crescer em virtude do fluxo gênico restrito e de eventos endogâmicos (autofecundação e cruzamentos entre parentes proximamente localizados) (Alves, 2003).

Atuando paralelamente contra os efeitos da endogamia, os eventos de migração (fluxo gênico), fazem com que as divergências entre populações ou sub-populações sejam eliminadas ou diminuídas através da introdução constante de novos alelos (Wright, 1931). O fluxo gênico é um dos principais componentes da estrutura genética de populações naturais, uma vez que define a extensão em que cada grupo local é uma unidade evolutiva independente (Slatkin, 1994), determinando assim o grau de isolamento genético entre populações de uma mesma espécie (Futuyma, 1993).

Durante o ciclo de vida de uma planta o fluxo gênico pode acontecer através da dispersão dos grãos de pólen ou através da disseminação das sementes (Wright, 1946). Em

espécies diplóides, sementes carregam dois alelos, enquanto grãos de pólen carregam apenas um alelo nuclear. Como resultado, são esperados diferentes efeitos no tamanho efetivo da população e no seu nível de estruturação (Crawford, 1984; Ennos, 1994). Apesar de independentes, a dispersão dos grãos de pólen e a disseminação de sementes contribuem de maneira aditiva para aumentar o grupo de vizinhança (Coelho & Valva, 2001).

Fatores como atividades de forrageamento do polinizador, densidade de plantas e direção dos ventos, estão diretamente relacionados com o movimento do pólen e das sementes. Quando se trata de espécies polinizadas pelo vento, há uma tendência de que a maioria das sementes caia e germine junto à planta-mãe. Em espécies em que os animais são agentes dispersores, pode ocorrer a formação de grupos de indivíduos geneticamente relacionados, uma vez que tais animais, às vezes, ingerem vários frutos de uma só vez, depositando muitas sementes junto com as fezes em locais muitas vezes distantes (Coelho & Valva, 2001).

O fluxo gênico pode ser representado por diversos modelos que correspondem à diferenças na estrutura da população, dentre os quais se destacam: o modelo continente-ilha, no qual o fluxo se dá de maneira unidirecional de uma população grande para uma menor e isolada; o modelo de ilhas, no qual pequenas populações são interconectadas por eventos migratórios; o modelo alpondras (*stepping-stone*), no qual somente populações vizinhas recebem migrantes; e o modelo de isolamento por distância que ocorre em populações contínuas, mas nas quais o fluxo é decrescente na medida em que a distância entre os indivíduos aumenta. Na maioria dos modelos, as taxas de fluxo gênico são consideradas aproximadamente constantes a cada geração (Futuyma, 1992).

2.5 ANÁLISE GENÉTICA DE POPULAÇÕES COM MARCADORES MOLECULARES

O termo marcador genético tem sido utilizado para designar características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas ou genéticas, que possam ser identificadas, permitindo comparações de genótipos e de suas progênes (Sakiyama, 1993). Até meados da década de 60, os marcadores utilizados nos estudos de genética de plantas eram genes associados a caracteres morfológicos, de fácil avaliação visual. Apesar de contribuírem significativamente para o desenvolvimento da genética, essa classe de marcadores apresentava limitações que iam desde a pequena representatividade deles numa mesma linhagem até a sua baixa disponibilidade, restrita apenas a espécies modelos como tomate e

ervilha, por exemplo, com a agravante de que na maioria dos casos, esses marcadores só poderiam ser identificados na planta adulta (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Nos últimos anos entretanto, a genômica de plantas tem sido intensamente estudada, fazendo surgir uma verdadeira revolução nessa área da pesquisa. Marcadores moleculares, definidos por Ferreira & Grattapaglia (1998) como pontos de referência nos cromossomos, são úteis em análises de genomas de plantas e tornaram-se importantes ferramentas dessa revolução. Após surgirem, os marcadores moleculares aumentaram significativamente o impacto da genética de populações no contexto biológico (Sunnucks, 2000). A riqueza de dados obtidos a partir dos marcadores moleculares tem revelado muitas informações sobre a diversidade genética de muitas populações de espécies, selvagens e cultivadas (Hayward & Hamilton, 1997). A variabilidade inter e intraespecífica, até então determinada por análises genéticas que compreendiam estratégias clássicas - anatomia comparada, fisiologia e embriologia - passou a ser revelada nas últimas décadas pelos marcadores moleculares, que rapidamente passaram a complementar as estratégias existentes (Weising et al., 1995).

Esse novo conjunto de técnicas passou então a permitir a detecção do polimorfismo diretamente no DNA, começando a mudar de vez a história dos estudos em genética com o surgimento dos marcadores isoenzimáticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). As isoenzimas, também referidas como aloenzimas, são enzimas solúveis e foram os primeiros marcadores moleculares utilizados na genética de populações, vindo a revolucionar rapidamente esse campo após sua inicial utilização por Lewontin e Hubby em 1966 (Conner & Hartl, 2004). A novidade bioquímica permitiu não só a inclusão de todas as espécies de plantas nos estudos de genética como também a ampliação do número de marcadores genéticos disponíveis para tais estudos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Nos anos 70, a aplicação de marcadores moleculares começou a se difundir principalmente devido ao surgimento de novas técnicas de detecção do polimorfismo presente no DNA (Westman & Kresovick, 1997). Em essência, essas técnicas representam formas de converter a variação genética em pedaços de DNA de diferentes tamanhos, os quais podem então ser separados em géis de eletroforese (Conner & Hartl, 2004). Através da utilização das enzimas de restrição, a variação genética pôde então ser detectada a partir de fragmentos de restrição e de seus respectivos comprimentos. Surgiam os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Grodzicker et al., 1974).

O desenvolvimento de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase - PCR (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) levou ainda à descrição de outras classes de marcadores moleculares tais como: os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), os marcadores baseados no polimorfismo de microssatélites – SSR (*Simple Sequence Repeats*) e os AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O último nível de resolução de análise da variação genética é representado pelo seqüenciamento de DNA. As seqüências são fornecidas por máquinas automatizadas e, atualmente, genomas inteiros de um grande número de organismos – incluindo humanos – estão sendo seqüenciados (Conner & Hartl, 2004). Com o advento dessa tecnologia de seqüenciamento automático de DNA, uma grande quantidade de dados em forma de seqüências já está disponível em bancos de dados, pronta para ser utilizada pela comunidade científica para estudos envolvendo os diversos níveis hierárquicos da organização biológica.

2.6 DIVERSIDADE GENÉTICA DO ARATICUNZEIRO

A falta de informações sobre os aspectos genéticos das espécies é um dos principais problemas na avaliação de recursos genéticos e decorre principalmente da carência de estudos de diversidade genética. Esse problema dificulta o estabelecimento de estratégias que assegurem tanto a conservação de populações naturais de plantas ecologicamente importantes, como a conservação dos recursos genéticos potencialmente úteis à população humana, em diversos segmentos.

A avaliação da variabilidade genética em populações de plantas é de grande interesse para estudos evolutivos, de conservação e para a produção de plantas cultiváveis. A magnitude e a distribuição da diversidade genética refletem a interação de vários processos evolucionários tais como fluxo gênico, mutação, deriva genética e seleção natural (Wu et al., 1999). Nesse sentido, o bioma Cerrado merece atenção especial, pois, foi recentemente considerado um dos *hotspots* mundiais da diversidade (Myers et al., 2000).

Apesar de ainda não existirem muitas informações sobre a variabilidade genética do araticunzeiro, a variação fenotípica encontrada nos frutos (peso, forma e volume) e qualidade da polpa (coloração, sabor, consistência e volume), permite inferir que

existe grande variabilidade genética em seu ambiente natural (Ribeiro et al., 2000).

Sabendo do potencial dessa espécie e também da sua grande importância, Telles et al. (2003) utilizaram marcadores isoenzimáticos para caracterizar populações naturais de araticunzeiro, objetivando avaliar a estrutura, magnitude e distribuição da variabilidade genética existente entre e dentro das populações, bem como estimar a taxa de fecundação cruzada aparente. Nesse trabalho foram identificados cinco locos isoenzimáticos, dentre os quais um mostrou-se monomórfico, enquanto os demais foram classificados como polimórficos devido à variação nas frequências dos dois alelos encontrados. Apesar da estimativa de porcentagem de locos polimórficos ter correspondido a 80%, os autores alertam para o reduzido tamanho amostral dos locos, devendo-se por isso considerar esse valor com certa reserva.

Em outro trabalho de caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro através da utilização de marcadores RAPD, Bandeira (2002) verificou a existência de grande variabilidade genética. As amostras analisadas foram coletadas em 14 diferentes áreas pouco antropizadas do interior do Estado de Goiás e que desde 1999 são acompanhadas por pesquisadores da Universidade Federal de Goiás. As análises genéticas mostraram polimorfismo em 97% dos locos amostrados, o que segundo essa autora, representa um nível de polimorfismo alto em relação ao descrito na literatura para espécies de florestas tropicais, que em geral apresentam polimorfismo médio de 65,6% e muito superior ao relatado para espécies do Cerrado. Para efeito comparativo dos estudos de diversidade genética de araticunzeiro realizados por esses autores, deve-se levar em consideração que as populações amostradas para obtenção de dados a partir de diferentes marcadores, não foram as mesmas para os dois casos.

Apesar de esses dois trabalhos demonstrarem a existência de uma grande variabilidade genética no araticunzeiro, eles apresentam certos resultados divergentes no que se refere à distribuição dessa diversidade nas populações. Os resultados obtidos por Telles et al. (2003) apontam para a existência de uma forte divergência genética entre as populações ($F_{ST}=0,16$). Quanto aos resultados obtidos por Bandeira (2002), a conclusão é de que existe um mesmo nível de variabilidade genética dentro de cada uma das populações amostradas e uma variação apenas razoável entre elas ($\phi_{ST}=0,08$). Apesar de se mostrar moderado, esse valor pode ser considerado significativo e representa 8% da variabilidade total.

No trabalho realizado por Telles et al. (2003) com isoenzimas, a comparação

entre as frequências genotípicas observadas em relação às esperadas na condição de equilíbrio de Hardy – Weinberg apontou para a existência de panmixia. Esses autores estimaram ainda, através desses marcadores isoenzimáticos, as taxas de fecundação cruzada aparente. A avaliação desse parâmetro indicou que a autofecundação praticamente não ocorre nessa espécie, pois os valores achados se aproximaram de 1,0, em concordância com a biologia floral dessa espécie, na qual não há sobreposição das fases masculina e feminina da flor, apesar do hermafroditismo existente. Telles et al. (2003) sugerem que as populações estudadas surgiram de poucos indivíduos já que o coeficiente de parentesco entre os indivíduos dentro das populações foi elevado. Desse modo, a similaridade entre indivíduos dentro de uma mesma população foi maior do que a similaridade encontrada entre dois indivíduos tomados ao acaso no grupo total de populações. Ainda de acordo com esses autores, isto pode estar relacionado ao modo de dispersão feita por animais, que ao se alimentarem do fruto acabam levando muitas sementes de um mesmo indivíduo, deixando-as muitas vezes, num só lugar.

Um aumento de divergência genética entre populações de uma mesma espécie pode ter início a partir da fragmentação dessas populações que sob forte restrição do fluxo gênico, ficam à mercê da deriva genética. A deriva genética por sua vez acentua a divergência entre populações e aumenta a similaridade entre indivíduos dentro das populações por gerar endogamia. Como dito anteriormente, Bandeira (2002) encontrou um valor significativo para a variância entre as populações estudadas em seu trabalho, cerca de 8% da variabilidade total. Ainda de acordo com essa autora, essa divergência significativa pode ser o resultado da restrição do fluxo gênico, por sua vez ocasionado por processos de fragmentação. Em relação à endogamia total, Telles et al. (2003) atribuem o alto valor encontrado ao pequeno tamanho das populações que sofrem forte pressão da deriva genética, já que nenhuma estruturação significativa em nível intrapopulacional ou de regiões foi encontrada.

A detecção dessa alta diversidade genética total existente em populações naturais de araticunzeiro revela o grande potencial dessa espécie para o melhoramento genético e sugere que a adoção de um bom plano de conservação pode salvaguardar grande parte da sua variabilidade genética, produzida ao longo de sua história evolutiva.

2.7 GENOMA DE CLOROPLASTOS

A natureza genética dos procariotos e o sistema de divisão dos cloroplastos contribuíram para a aceitação da idéia de que uma cianobactéria teria começado a residir dentro de uma célula ancestral das plantas e a partir daí começado a estabelecer uma relação mutualística, dando origem a essa organela celular (Gray, 1999). Essa idéia de simbiose, que se transformou em teoria e passou a ser denominada de teoria endossimbiótica tem sua base fundamentada em análise molecular e foi construída a partir da observação de homologias entre as seqüências nucleotídicas dos genes dos rRNA 5s e 16s de cloroplastos, que são altamente similares às do provável ancestral, uma cianobactéria (Dyer & Bowman, 1979; Tomioka & Sugiura, 1983).

Os cloroplastos são organelas celulares que possuem seu próprio genoma (cpDNA). Transmitido de maneira não mendeliana, o cpDNA ocorre em múltiplas cópias em cada cloroplasto, variando em tamanho entre 135 kb e 160 kb (Hartl & Clark, 1997). Além do cpDNA, as plantas apresentam ainda outros dois genomas; o genoma mitocondrial (mtDNA) e o genoma nuclear (nDNA). Esses três genomas, que interagem entre si de várias maneiras diferentes, vêm modificando-se em diferentes taxas e em diferentes direções ao longo da história evolutiva. Em termos gerais, quando se compara a estrutura dos três genomas verifica-se que genomas mitocondriais e cloroplastidiais apresentam menores taxas de recombinação, sendo por isso mais bem conservados do que a estrutura do genoma nuclear em diferentes espécies vegetais (Niklas, 1997).

O genoma de cloroplasto codifica aproximadamente 120 genes e cada célula contém até 10.000 cópias idênticas de cada um desses genes (Maliga, 2002). Esse número de genes pode sofrer variação de organismo para organismo. Plantas parasitas não fotossintetizantes, por exemplo, geralmente possuem um cpDNA muito reduzido (50kb a 73kb), devendo assim, ter perdido muitos de seus genes plastidiais durante sua evolução (Palmer, 1991; Wolfe et al., 1992).

A similaridade envolvendo o número e a organização dos genes do cpDNA de diferentes espécies pode ser marcante, até mesmo para espécies filéticamente distantes, como a avascular *Marchantia polymorpha* e a vascular *Nicotiana tabacum*. A despeito da enorme separação filética existente entre esses dois organismos, o genoma de cloroplasto de ambas as plantas carregam quase o mesmo complemento de genes, arranjados quase na mesma ordem (Niklas, 1997).

Uma das principais características do DNA de cloroplastos (cpDNA) é a presença de uma grande sequência de repetição invertida, que mede entre 5kb e 76kb de comprimento (Palmer, 1991). Essa configuração genômica resulta numa duplicação dos genes do rRNA, além de outros genes que estão incluídos nesta repetição. A maior parte da variação existente no tamanho do cpDNA de plantas terrestres se deve a mudanças no tamanho dessa sequência de repetição invertida (Palmer et al., 1987), a qual encolheu ou se expandiu para engolfar mais partes do cpDNA (Niklas, 1997).

Algumas leguminosas, coníferas e algas não apresentam repetições invertidas e podem ser consideradas exceções (Reith & Munholland, 1993). A alga *Cyanidioschyzon merolae* cepa 10D, por exemplo, não apresenta em seu genoma plastidial a sequência de repetição invertida. Esta sequência, provavelmente presente em seu ancestral simbiote, foi perdida durante sua evolução (Ohta & Kuroiwa, 2002). Igualmente provável foi a perda da região invertida repetida em algumas leguminosas e coníferas, que também deve ter acontecido ao longo de suas histórias evolutivas (Palmer, 1991). Essa hipótese é sustentada pelo menos em parte, pela observação em *Pinus niger*, de uma sequência bem conservada de 495pb, dentro de uma grande sequência de repetição invertida (Tsudzuki et al., 1992).

Vários cpDNAs de plantas já foram completamente seqüenciados. A caracterização completa do cpDNA de diversos grupos de plantas tem ajudado a entender a evolução dos genomas dessas organelas (Sugiura et al., 1998). Os 120 genes confirmados para a maioria de plantas terrestres que tiveram seu cpDNA seqüenciado mostraram uma natureza bastante conservada, podendo então ser divididos em três grupos. O primeiro grupo inclui seqüências requeridas para expressão gênica no próprio cloroplasto, com 50 genes codificando subunidades da RNA polimerase, rRNA ribossomal, RNA de transferência (tRNA), proteínas ribossomais e fatores adicionais como fator de iniciação e fator de alongamento, por exemplo. O segundo grupo inclui aproximadamente 40 genes, codificando componentes do aparato fotossintético, principalmente subunidades de tilacóides associados ao complexo fotossistema I (PSI), fotossistema II (PSII), citocromo b6, ATP sintetase e a grande subunidade da enzima rubisco, presente no estroma. Um terceiro grupo inclui genes hipotéticos de função ainda desconhecida (Rochaix, 1997).

Genes de cloroplastos que codificam componentes da maquinaria de tradução protéica foram inicialmente encontrados devido à existência de homologia entre suas seqüências e as seqüências de *Escherichia coli*. Essa homologia foi depois confirmada pela análise dos respectivos produtos gênicos. Em cloroplastos de plantas terrestres, um terço de

todas as proteínas presentes nos ribossomos cloroplastidiais é codificado pelo cpDNA e os remanescentes dois terços são codificados pelo genoma nuclear (Sugiura et al., 1998).

Desde o período em que deixaram de ser um organismo de vida livre, os cloroplastos têm renunciado ao controle de muitos aspectos do seu próprio metabolismo, incluindo a sua divisão, desenvolvimento e expressão gênica, e têm se tornado firmemente integrados à fisiologia de sua residência que é a célula (Gray, 1999). Embora o ancestral do cloroplasto tenha sido um procarioto de vida livre, a perda de informação genética para o núcleo e a habilidade adquirida pelo núcleo em controlar a expressão gênica nos cloroplastos, conduziram os cloroplastos a assumir um papel de receptor de sinais, na medida em que começaram a responder a sinais do núcleo. No entanto, o processo de sinalização inversa (cloroplasto $\rightarrow$ núcleo) também ocorre, demonstrando assim a interdependência e a necessidade de coordenação que há entre esses dois compartimentos celulares (Stern et al., 1997).

Genomas de cloroplastos e mitocôndrias exibem diferentes padrões de diferenciação genética quando comparados ao genoma nuclear devido ao seu modo de transmissão, uniparental (Birky, 1988). Assim, para um completo entendimento da diferenciação e evolução de populações de espécies vegetais, esses três genomas devem ser considerados. A análise do cloroplasto fornece informações sobre a dinâmica das populações de plantas, complementando assim, a informação obtida através do genoma nuclear (McCauley, 1994).

O genoma de cloroplasto possui uma taxa de substituição muito menor do que o genoma nuclear (Wolfe et al., 1987; Clegg et al., 1994). Essa baixa taxa de substituição nas seqüências de repetição invertida no genoma de cloroplastos tem causado importantes implicações nas pesquisas genéticas (Weising & Gardner, 1999). O conhecimento das taxas de substituição nesses *loci* é importante por que elas determinam os níveis de variabilidade genética dentro das populações e, conseqüentemente, influenciam as estimativas da estrutura populacional (Provan et al., 1999b).

O desenvolvimento de marcadores moleculares baseados no polimorfismo encontrado nos genomas de cloroplasto tem tido grande impacto no entendimento dos processos que determinam a estrutura genética e variação entre e dentro de populações naturais. Em plantas hermafroditas, de fecundação cruzada, devido a haploidia do cpDNA, o tamanho efetivo populacional medido a partir do genoma de cloroplastos, será, em geral, a metade do tamanho efetivo apresentado por genomas nucleares diplóides. Como

resultado, marcadores específicos de cloroplastos são mais úteis para indicar eventos demográficos, ocorridos no passado, tais como *bottlenecks* e efeito fundador, e genéticos como deriva genética (McCauley, 1994; Ennos et al., 1999).

Seqüências repetidas de microssatélites têm sido detectadas no genoma nuclear de várias espécies de plantas e sua utilidade tem recentemente sido demonstrada (Morgante & Olivieri, 1993). Do mesmo modo, os microssatélites de cloroplastos (cpSSR) são poderosas ferramentas que estão sendo utilizadas em estudos de genética de populações naturais, na compreensão da evolução e domesticação de plantas cultivadas, além de servir também para elucidar relações filogenéticas (Provan et al., 2001) e realizar estudos de sistemática em uma variedade de espécies (Powell et al., 1996; Provan et al., 1999a).

A ampla disponibilidade de *primers*, aliada à falta de heteroplasmia (presença de dois tipos diferentes de DNA organelar numa mesma célula) e recombinação, têm feito do genoma de cloroplastos uma ferramenta atrativa para estudos filogenéticos em plantas (Olmstead & Palmer, 1994). Além disso, seu modo de herança uniparental (usualmente maternal em angiospermas e paternal em gimnospermas) torna possível avaliar a contribuição relativa do fluxo gênico por sementes e pólenes para a estruturação genética de populações naturais, pela comparação dos dados obtidos por marcadores nucleares e cloroplastidiais (Ennos et al., 1999).

Os cpSSR têm sido utilizados com freqüência para quantificar a diversidade genética de cpDNA em plantas como Pinus (*Pinus contorta*) (Powell et al., 1995), Batata (*Solanum tuberosum*) (Bryan et al., 1999), Cevada (*Hordeum vulgare*) (Provan et al., 1999a), Arroz (*Oryza sativa*) (Provan et al., 1997; Ishii & McCouch, 2000), Soja (*Glycine max*) (Powell et al., 1996; Xu et al., 2002) e Kiwi (*Actinidia deliciosa*) (Weising & Gardner, 1999).

Variações nas seqüências de cpDNA também têm sido amplamente utilizadas para investigar relações interespecíficas entre angiospermas e outras plantas (Palmer et al., 1988), mas sua baixa taxa de substituição é uma forte limitação em nível intraespecífico (Taberlet et al., 1991). Análise das relações genéticas entre haplótipos pode fornecer importantes informações sobre a extensão das afinidades e fluxo gênico entre populações (Nei & Kumar, 2000). Nos últimos anos, muitos estudos envolvendo seqüências de cpDNA vêm sendo produzidos com o objetivo de analisar a estrutura genética e os aspectos filogenéticos e filogeográficos de populações de plantas. Tais informações têm sido obtidas utilizando-se *primers* universais que flanqueiam regiões polimórficas do DNA

plastidial. Dentre as regiões comumente utilizadas nesses estudos encontram-se a *trnL* (RNA transportador da Leucina) e a *trnF* (RNA transportador da Fenilalanina). Cada uma dessas regiões pode ser analisada individualmente ou de maneira conjunta, comparando-se as informações obtidas em cada região. A maior parte dos estudos atuais que envolvem o cpDNA, no entanto, têm utilizado uma região intergênica denominada *trnL-F*, justamente por se localizar entre as regiões *trnL* e *trnF*, como visto nos trabalhos de Grivet & Petit (2002), Larena et al. (2002), Trewick et al. (2002). Chiang et al. (2004) e Dobes et al. (2004).

2.8 A TEORIA DA COALESCÊNCIA

Até poucos anos atrás, a genética de populações tinha sua base teórica fundamentada na análise de frequências alélicas, a qual forneceu durante muito tempo uma estrutura sobre a qual foram construídos inúmeros modelos genético-evolutivos. Recentemente, novos métodos de análise do polimorfismo de DNA, originalmente usados para se realizar comparações entre diferentes espécies, vêm sendo utilizados para avaliação de polimorfismo dentro de uma mesma espécie para análise genética de populações (Slatkin, 1994). A utilização destes métodos tornou-se possível pela maior disponibilidade de dados de seqüenciamento de DNA, que fornecem informações bastante refinadas, com polimorfismo detectado ao nível de um único nucleotídeo (Futuyma, 1993).

A riqueza e distribuição do polimorfismo molecular existente dentro e entre espécies oferecem oportunidades de inferência sobre os mecanismos evolutivos que ocorreram no passado (Hartl, 2000). Com informações sobre seqüências de DNA é possível dizer não somente se dois genes são ou não diferentes, mas também o quão diferente eles são (Slatkin, 1994). A evolução dessas técnicas permitiu então a obtenção de muitas informações a respeito de sítios de restrição e de variações nas seqüências de DNA, as quais podem ajudar a construir árvores genealógicas intraespecíficas através da análise de diferentes haplótipos, que são nesse contexto as unidades taxonômicas operacionais (Castelloe & Templeton, 1994).

As árvores genealógicas de haplótipos (coalescentes) podem ser utilizadas para se examinar relações entre genótipo e fenótipo (Templeton et al., 1987; 1988), inferir sobre a ocorrência de seleção (Golding, 1987; Hudson & Kaplan, 1988; Golding & Felsenstein, 1990; Takahata & Nei, 1990; Kaplan et al., 1991), obter estimativas da magnitude do fluxo

gênico (Slatkin, 1989; Slatkin & Maddison, 1989; 1990) e para separar os diferentes efeitos resultantes tanto de processos demográficos, quanto de eventos históricos das populações (Templeton, 1993).

Embora dados de seqüências de DNA e genealogias de genes possam ser tipos diferentes de informação eles podem ser relacionados através da Teoria da Coalescência. Em um processo de retorno no tempo, linhagens evolutivas tornam-se uma só, ou sofrem coalescência, quando os alelos mostram ou compartilham um mesmo ancestral (Hartl & Clarck, 1997). Introduzida inicialmente por Kingman (1982), a teoria da coalescência vem sendo desenvolvida por matemáticos e estatísticos, sendo entretanto mais amplamente utilizada pela comunidade de biólogos. O conjunto de idéias que se tornou conhecido simplesmente como coalescência tornou-se uma ferramenta útil em uma variedade de problemas genéticos tanto na modelagem de fenômenos biológicos como no sentido estatístico, disponibilizando atualmente uma elevada riqueza de dados (Kingman, 2000).

A base da teoria da coalescência pode ser encontrada voltando-se aos trabalhos de Fisher (1930) e Wright (1931), mas foi o desenvolvimento da teoria neutralista de evolução molecular que conduziu ao completo desenvolvimento da teoria da coalescência (Emerson et al., 2001). A teoria da coalescência utiliza um modelo neutro de evolução molecular denominado “Fisher-Wright” - o qual assume que seqüências de DNA em uma população, numa geração qualquer, representam uma amostra aleatória (com reposição) daquelas existentes numa geração anterior e que as mutações existentes num loco em questão são seletivamente neutras - para descrever a relação genealógica entre genes, fornecendo uma descrição dinâmica da evolução de uma população idealizada e da transmissão de seus genes de uma geração para outra (Fu, 1999).

O modelo genético é uma importante consideração a ser feita, uma vez que para análise de eventos coalescentes, alguns pressupostos têm de ser assumidos, exatamente da mesma forma com que os tradicionais modelos genéticos assumiam que populações naturais supostamente se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Assim, modelos baseados na teoria da coalescência (Takahata et al., 1995; Kuhner et al., 1998; Beerli & Felsenstein, 1999; 2001; Bahlo & Griffiths, 2000; Nielsen & Slatkin, 2000; Wakeley, 2001) fornecem poderosas abordagens estatísticas para se estimar e testar hipóteses associadas a parâmetros genético-demográficos, tais como: tamanho efetivo da população, taxas de migração, tempos de divergência e taxas de crescimento ou declínio populacional.

Apesar das muitas características comuns à teoria de Fisher-Wright, a teoria da coalescência tem, segundo Fu (1999), três principais características que a tornam de grande interesse. A primeira delas está no fato de ser uma teoria baseada em amostras. Uma vez que em estudos populacionais usualmente se confia em uma amostra de indivíduos daquelas populações, uma teoria que descreve as propriedades de uma amostra é mais relevante que a teoria clássica de genética de populações que descreve as propriedades de populações inteiras. Outra singularidade da teoria da coalescência é a sua abordagem altamente eficiente. Um importante subproduto da teoria da coalescência é o desenvolvimento de algoritmos eficientes para simular amostras de populações sob vários modelos genéticos, permitindo que os vários aspectos de um modelo possam ser examinados numericamente. Por último, a teoria da coalescência é particularmente interessante para dados moleculares tais como amostras de DNA, pois seqüências de DNA contêm uma riqueza muito grande de informações sobre a relação ancestral entre os indivíduos amostrados.

A teoria da coalescência surgiu da necessidade de se inferir sobre o passado a partir de amostras tomadas no presente. A essência dessa idéia é iniciar com uma amostra e voltar no tempo para identificar eventos que ocorreram no passado desde o seu ancestral comum mais recente (Fu, 1999). Em outras palavras, a coalescência traça o caminho percorrido por alelos presentes numa amostra da geração atual, voltando às gerações anteriores. Quando as linhagens de dois alelos se encontram numa geração precedente, é dito que esses dois alelos coalesceram e assim têm um ancestral comum. O único ancestral de uma amostra inteira de alelos é chamado de Ancestral Comum Mais Recente (MRCA). O tempo necessário para ocorrer coalescência entre alelos é medido em unidade de gerações e chamado tempo de coalescência.

A história de genes em uma amostra pode ser descrita através de um cladograma, no qual cada nó indica que dois genes ou mais descenderam de um único ancestral naquela geração. Assim, cada nó num cladograma, algumas vezes chamado de árvore genealógica (*gene tree*), representa um evento de coalescência. Entretanto, essas árvores genealógicas (coalescentes) podem mostrar ainda o tempo ocorrido entre cada um desses eventos de coalescência, representado nesse caso, pelo comprimento das ramificações, os entre-nós (Slatkin, 1994).

Os trabalhos iniciais de Kingman no desenvolvimento da estrutura de coalescentes resultaram numa aproximação tão boa que poucos evolucionistas tentaram

investigar a exata estrutura de tais árvores. Os resultados de Kingman são na verdade generalizações de um resultado para duas cópias de genes, inicialmente obtido por Wright. Wright notou que em uma população finita, de tamanho N , monóica, admitindo-se autofecundação, a probabilidade de que duas cópias de um gene venham de uma mesma cópia na geração precedente é $1/(2N_e)$, em que N_e é o tamanho efetivo da população (Felsenstein, 2004).

O entendimento do processo coalescente pode ser facilitado analisando-se a Figura 1. Neste contexto, é conveniente analisar a consideração que Fu (1999) faz sobre a teoria da coalescência. Segundo ele, a teoria da coalescência consiste de dois componentes inter-relacionados: o primeiro é o processo estocástico conduzindo ao MRCA de uma amostra. O segundo são as propriedades estatísticas dos métodos de inferência baseados nas observações de uma amostra, as quais podem ser estatísticas simples ou padrões de polimorfismo mais detalhados.

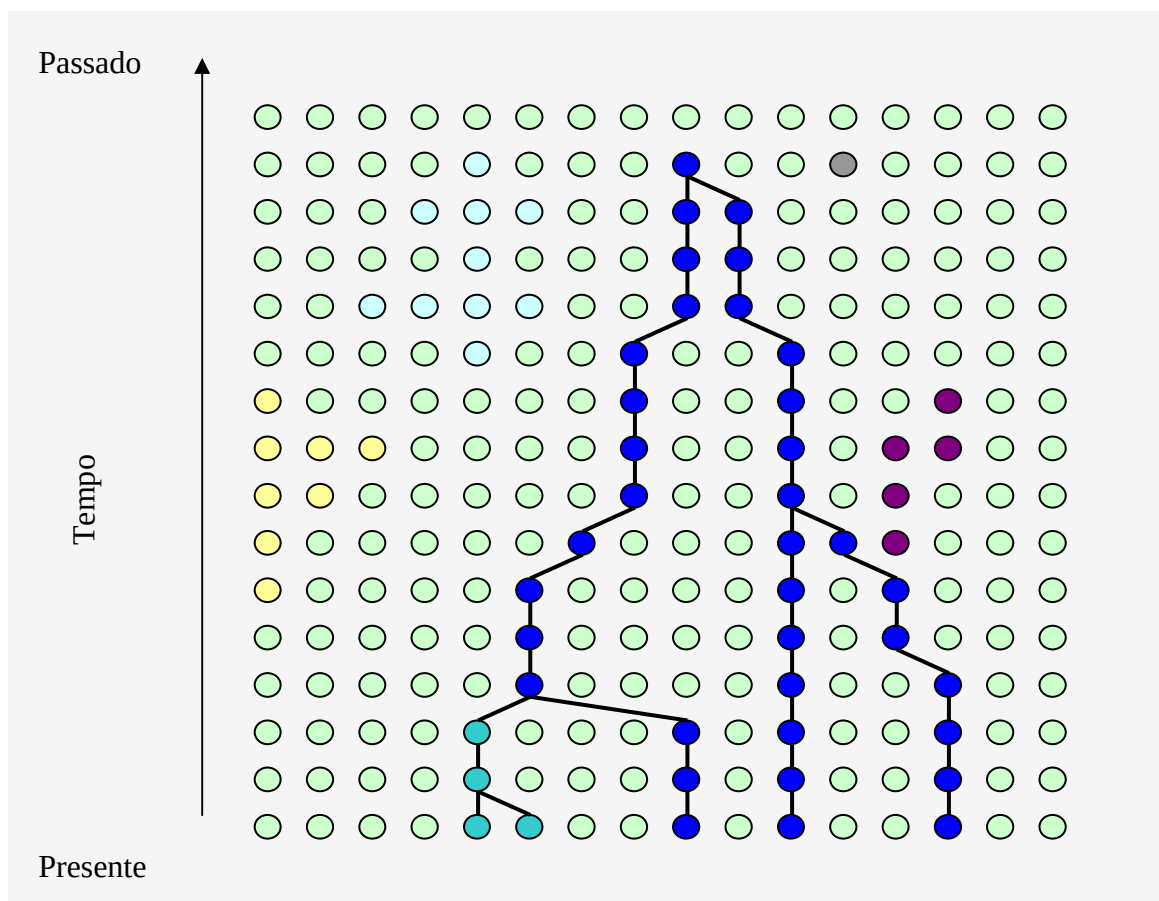


Figura 1. Processo coalescente envolvendo cinco alelos.

A Figura 1 mostra a relação genealógica entre cinco alelos tomados ao acaso

no presente, traçando o caminho percorrido por eles de volta ao seu ancestral comum mais recente. Nota-se que alelos novos podem surgir (círculos não envolvidos na trama), mas, podem extinguir-se na mesma geração em que surgem, simplesmente por força da deriva genética. Nesse caso, a relação ancestral entre tais alelos não pode ser verificada. A probabilidade de que dois alelos tomados ao acaso sofram coalescência numa geração precedente é, como dito anteriormente, $1/(2N_e)$, em que N_e é o tamanho efetivo da população. Assim, quanto maior o tamanho efetivo da população, maior o tempo para a coalescência de alelos.

Uma vez que a teoria da coalescência fornece um excelente suporte para análise de polimorfismo em dados obtidos, não é surpreendente a atenção dada nos últimos anos ao desenvolvimento de métodos estatísticos baseados no modelo de coalescentes para análise de seqüências de DNA. Dentre as estatísticas sumárias integradas no contexto do modelo coalescente, duas têm sido muito utilizadas para se quantificar a diversidade genética através da análise direta de seqüências: proporção de sítios polimórficos, representada por S e o número médio de diferenças de nucleotídeos entre pares de seqüências, representado por π (Fu, 1999). Hartl (2000) apresenta uma discussão pormenorizada sobre estes dois parâmetros.

2.9 EVOLUÇÃO MOLECULAR

A evolução molecular tornou-se uma das mais intrigantes áreas da biologia moderna, principalmente depois do surgimento da teoria neutralista, proposta pelo geneticista japonês Motoo Kimura, ainda nos anos 60. O evidente interesse da comunidade científica pela evolução molecular está relacionado ao entendimento dos fatores que causaram diferenças existentes no DNA de indivíduos de uma mesma espécie e também de espécies diferentes.

As similaridades encontradas entre seqüências de aminoácidos de proteínas homólogas podem ajudar a entender a relação entre espécies diferentes. De fato, muitas diferenças encontradas em seqüências homólogas de DNA, de diferentes espécies, não foram proporcionadas por diferentes pressões seletivas e sim por força do acaso. Na realidade, a seleção natural contribui menos do que se pensava anteriormente. Sabe-se atualmente, que a deriva, assim como a seleção, contribuiu para a estruturação dos atuais padrões de diversidade genética.

Embora o efeito da deriva genética em grandes populações seja pequeno a cada geração, seu efeito cumulativo pode ser substancial ao longo de muitas gerações. Do mesmo modo, o efeito cumulativo das mutações pode tornar-se importante com o passar de muitas gerações. Assim, os efeitos conjuntos da deriva genética e das mutações podem ser os reais determinantes da variabilidade genética ao nível molecular, considerando-se longos períodos de tempo (Weaver & Hedrick, 1997).

Essa teoria baseada no equilíbrio entre mutação e deriva genética, elaborada por Kimura, pode estabelecer a melhor perspectiva para o entendimento da evolução ao nível molecular (Weaver & Hedrick, 1997). Nela, Kimura sugere que grande parte do polimorfismo observado em nível molecular é seletivamente neutra, de forma que a dinâmica das frequências alélicas nas populações é determinada pela deriva genética (Kimura, 1983).

Os seguidores da teoria neutralista afirmam que as seqüências de proteína e DNA têm divergido entre espécies a uma taxa constante. Se isto ocorre, as macromoléculas fornecem uma espécie de relógio molecular (Futuyma, 1993). A noção da existência de um relógio molecular, que foi primeiramente observado por Zuckerkandl & Pauling no começo dos anos 60 (Hartl & Clark, 1997), surgiu como um produto de observações empíricas da aparente constância na taxa de evolução de certas proteínas. A idéia básica desse “relógio molecular” é que substituições ocorrem em uma taxa aproximadamente constante nas seqüências de DNA, podendo assim ser utilizadas para datar eventos evolutivos. A explicação teórica para essa observação foi fornecida pela teoria neutralista de Kimura, a qual diz que substituições ocorrem puramente como uma consequência resultante das mutações e da deriva genética. Assim, se mutações espontâneas ocorrem em uma taxa constante, substituições entre espécies também vão ocorrer em uma taxa constante (Nielsen, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado no Estado de Goiás, em áreas que há algum tempo já vêm sendo estudadas por pesquisadores da UFG. A amostra total consistiu de onze populações e 352 indivíduos. Em cada uma das onze localidades, foram coletadas folhas jovens de 32 indivíduos, as quais foram embaladas em sacos de papel, depois em sacos plásticos e acondicionadas em gelo a fim de conservar a sua integridade até a chegada ao freezer (-20°C) do Laboratório de Genética Vegetal da UFG.

As populações foram identificadas de acordo com a numeração pré-existente, estabelecida pelos pesquisadores em estudos anteriores. Assim, das quatorze populações descritas em estudos prévios (Bandeira 2002, Braga Filho 2003), apenas onze foram utilizadas (Tabela 1; Figura 2). As coletas foram realizadas entre os meses de setembro e novembro de 2004, período do ano em que as folhas jovens geralmente desabrocham. A estratégia de coleta para essa época do ano foi adotada levando-se em consideração o fato de que folhas adultas contêm uma quantidade muito grande de compostos secundários, o que dificulta sobremaneira a extração do DNA. Assim, procurou-se ao máximo coletar apenas brotos ou folhas ainda no início do seu desenvolvimento.

Tabela 1. Coordenadas geográficas das populações de *A.crassiflora*.

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

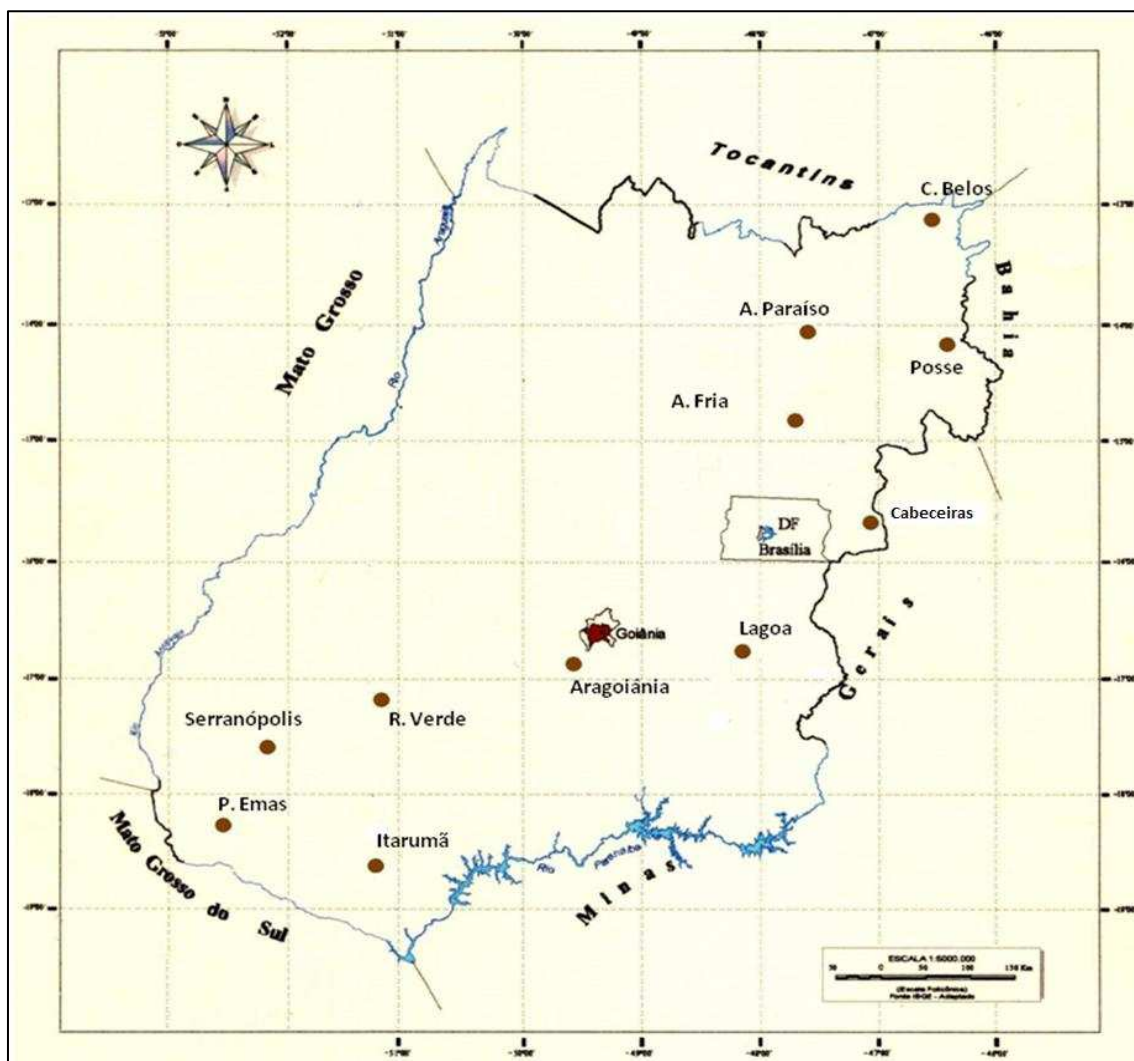


Figura 2. Distribuição das populações de *A. crassiflora* no Estado de Goiás.

3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.2.1 Extração de DNA

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

De cada indivíduo foram macerados cerca de 150 mg de tecido foliar na presença de nitrogênio líquido dentro de microtubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL. Em cada tubo foram adicionados 700 µL de tampão de extração (NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM pH 8,0; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; β-mercaptoetanol 1%) previamente aquecido em banho-maria a 65°C. Após a adição do tampão, os tubos foram levados ao vórtex para homogeneização do seu conteúdo e submetidos ao aquecimento a 65°C, por 40', em banho-maria. A cada 10' os tubos eram invertidos para que seus conteúdos ficassem cada vez mais homogeneizados.

Após a incubação, adicionou-se em cada tubo 600 µL de CIA (Clorofórmio:Álcool Iso-Amílico, 24:1). Uma nova homogeneização foi realizada após a adição do CIA, invertendo-se os tubos durante 5'. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm, por 10'. A parte sedimentada foi então descartada e aproximadamente 540 µL do produto sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

No novo tubo contendo somente o sobrenadante da primeira lavagem com CIA, foram novamente adicionados 600 µL de CIA para nova lavagem. Após a nova adição do CIA, os tubos foram submetidos a uma nova homogeneização e posterior centrifugação a 13.000 rpm por 10'. O sobrenadante foi novamente transferido e uma terceira e última lavagem com CIA foi realizada, nos mesmos moldes das anteriores.

Em cada tubo foram então adicionados 40 µL de CTAB (10%). Os tubos foram homogeneizados por inversão por 5' e levados novamente à centrifugação a 13.000rpm por 10'. O sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo, adicionando-se nessa fase, 400 µL de Etanol absoluto (P.A.), para precipitação do DNA.

Após 40' no freezer (-20°C), os tubos foram centrifugados a 11.000 rpm por 5'. Depois de centrifugados, os tubos apresentavam *pellets* ao fundo. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram lavados duas vezes em 1mL de Etanol (70%) e uma vez em 1mL de Etanol (95%). Em todas as lavagens os *pellets* ficaram submersos no Etanol por pelo menos 5' com o objetivo de se retirar o máximo possível de contaminantes e resíduos de compostos secundários, como proteínas e polissacarídeos, que normalmente estão presentes e que atrapalham as reações de amplificação de DNA. Após secagem do DNA em estufa a 40°C, foram adicionados 50 µL de TE em cada tubo contendo *pellet*.

O DNA extraído foi quantificado utilizando-se como referências, quantidades conhecidas (20, 50 e 100ng) de DNA do fago λ. Géis de agarose (1%) foram utilizados

como matriz para a eletroforese. Após a eletroforese, os géis foram visualizados pela utilização de Brometo de Etídeo em luz UV.

3.2.2 Amplificação das amostras de DNA

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

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

Para amplificar o cpDNA de *Annona crassiflora* foram utilizados os *primers* “c” e “d” (Tabela 2), desenvolvidos, testados inicialmente e descritos por Taberlet et al (1991). Esses *primers* correspondem à região do gene do RNA Transportador da Leucina (*trn-L*). Esse gene contém dois *éxons* (um na extremidade 5' e outro na extremidade 3') e um *íntron*. A sequência completa da região flanqueada por esses *primers* compreende todo o *íntron*, além do 3' *éxon* do gene (*trn-L*). Uma vez que podem ser utilizados em qualquer espécie de planta os primers utilizados nesse trabalho são considerados universais.

Tabela 2. Par de *primers* utilizados na amplificação e sequenciamento da região (*trn-L*) do cpDNA.

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

3.2.3 Seqüenciamento dos fragmentos

Os fragmentos amplificados foram submetidos à reação de seqüenciamento seguindo o método de Sanger et al. (1977), utilizando dideoxynucleotídeos marcados com fluorescência. Essa reação obedeceu aos seguintes passos: 31 ciclos de 45" a 92°C, 45" a 55°C e 4' a 72°C, além de um passo final de 10' a 72°C. As reações de seqüenciamento foram estabelecidas a partir de 2 µL do produto da PCR (fragmento de cpDNA de interesse), 1µL de pré-mix Dynamic (Amersham, Inc.), 2,5 pmoles do *primer* 1 (Tabela 2), 2 µL do tampão *save-money* (Tris-HCl 0,2 mM; MgCl₂ 5 mM), para uma quantidade final de 10 µL.

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

3.2.4 Seleção das seqüências

Do conjunto de indivíduos coletados em cada população, apenas uma pequena parcela (no máximo oito; no mínimo seis) foi selecionada para as análises. A seleção de indivíduos foi realizada levando-se em consideração: i) os custos (os pressupostos da teoria da coalescência afirmam que o aumento no tamanho da amostra não altera os resultados de maneira significativa); ii) a qualidade das seqüências (somente as seqüências de melhor qualidade foram utilizadas). Assim, na definição do tamanho amostral para realização das análises procurou-se utilizar uma estratégia que envolvesse uma metodologia normalmente adotada em trabalhos semelhantes, que permitisse um baixo custo final e que garantisse a obtenção de resultados satisfatórios

3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.3.1 Análise de diversidade genética

As seqüências obtidas foram caracterizadas em termos do número de haplótipos encontrados, diversidade de haplótipos e diversidade de nucleotídeos por sítio, dentro e entre populações, utilizando-se os programas MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versão 3.0 (Kumar et al., 2004) e Arlequin, versão 2.0 (Schneider et al., 1992). Os *gaps* (inserções/deleções) gerados no alinhamento das seqüências foram considerados e, portanto, assumidos como uma quinta base.

3.3.2 Teste de neutralidade

Para testar a hipótese de que todas as mutações encontradas nas seqüências de *Annona crassiflora* foram seletivamente neutras, utilizou-se o software DnaSP (DNA Sequence Polymorphism) versão 4.10. O modelo adotado para o teste de neutralidade – Teste *D* – foi proposto por Tajima (1989). O Teste *D* é baseado na diferença entre o número de sítios segregantes e o número médio de diferenças nucleotídicas. Para a realização do Teste *D*, o software exclui automaticamente todos os sítios que contenham *gaps* (inserções/deleções) gerados no alinhamento das seqüências. Assim, apenas sítios que não continham *gaps* foram utilizados no teste.

3.3.3 Análise da estrutura genética das populações

A estrutura genética de *Annona crassiflora* foi explorada através do coeficiente de variação genética – G_{ST} (Nei, 1973), análogo ao F_{ST} (Wright, 1951), que mede a proporção da variação genética total existente, que está distribuída entre as populações. Esse procedimento também foi conduzido utilizando-se o programa MEGA 3.0. Este software foi ainda utilizado para obtenção da matriz com as estimativas das distâncias genéticas entre as populações e na análise de agrupamento das populações utilizando-se o algoritmo de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987). O gráfico de dispersão entre distâncias genéticas e distâncias geográficas foi obtido através do programa NTSYSpc (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*), versão 2.1 (Rolf, 2000). A

distribuição dos haplótipos entre as populações de *Annona crassiflora* foi obtida também utilizando o software DnaSP 4.10.

3.3.4 Análise filogenética dos haplótipos

Para examinar a relação filogenética entre os haplótipos de cpDNA encontrados nas onze populações, foi estimada a *Minimum Spanning Tree* utilizando-se o programa TCS versão 1.21 (Clement et al., 2000) e construído um dendrograma através do algoritmo de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), utilizando-se para isso o programa MEGA (Kumar et al., 2004).

3.3.5 Estimativa do tempo de divergência entre populações

As estimativas dos tempos de divergência entre populações foram realizadas através da abordagem baseada na coalescência, utilizando o software MDIV (Nielsen & Wakeley, 2001). O software MDIV pode estimar simultaneamente uma variedade de parâmetros de interesse tais como o tempo de divergência entre as populações, expresso como t/N_e ; θ ($2N_e\mu$); e o tempo do ancestral comum mais recente (TMRCA), expresso como $t\mu$, do mesmo conjunto de dados em que: N_e é o tamanho efetivo da população, t representa o tempo de divergência (em gerações) e μ é a taxa de mutação por *locus*. Essa abordagem facilita a compreensão de atuais padrões de estruturação, distinguindo a similaridade genética causada por fluxo gênico contemporâneo, daquela que é retida nas populações devido à ancestralidade comum. Para se efetuar a estimação dos parâmetros de interesse, optou-se por admitir uma taxa de migração atual nula, uma vez que as populações se encontram isoladas em fragmentos na natureza. Para efeito de estimação dos tamanhos efetivos, admitiu-se uma taxa de substituição hipotética de 10^{-5} (substituições/*locus*/geração).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

A amplificação e o seqüenciamento da região *trn-L* de cpDNA gerou um alinhamento composto por 519 pares de base. Foram observados nesse fragmento 147 sítios polimórficos (28,3%) e 372 sítios conservados (71,7%). Do ponto de vista filogenético, 28 sítios (5,4%) foram informativos, por apresentarem pelo menos dois haplótipos em cada um dos diferentes estados encontrados. A análise das seqüências mostrou ainda que o conjunto total de populações apresentou as seguintes proporções médias de nucleotídeos: 24,5%, 18,7%, 36,3%, 20,5%, para timina (T), citosina (C), adenina (A) e guanina (G), respectivamente. As proporções encontradas para os nucleotídeos A e T foram maiores do que as proporções de C e G. Juntos, A e T somaram aproximadamente 61%. Essa proporção observada é semelhante à composição nucleotídica encontrada (64%) na maioria dos trabalhos com regiões não codificantes de cloroplastos (Li, 1997; Lu et al., 2002; Chiang, et al., 2001; Su et al., 2005).

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

Os resultados apresentados na Tabela 3 e na Figura 3 mostram que apesar da ocorrência de populações com a mesma diversidade de haplótipos (Serranópolis, Itarumã, Aragoiânia, Água Fria, Campos Belos e Posse), algumas diferenças importantes entre os

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

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

* Considerando gaps (inserções/deleções) como uma quinta base.

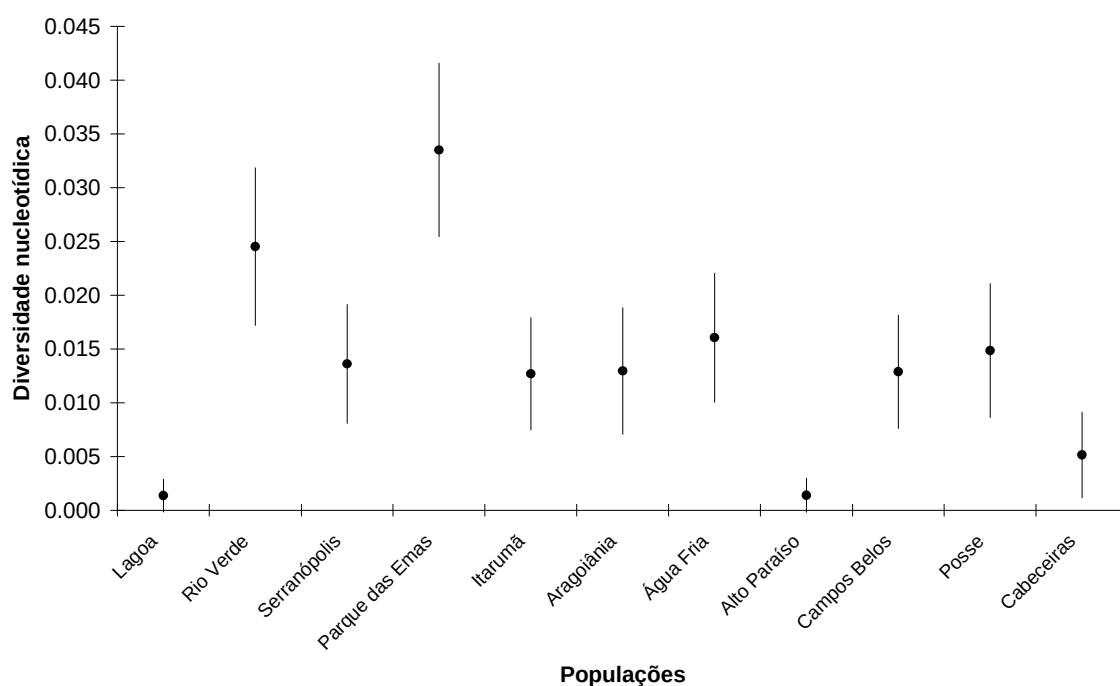


Figura 3. Gráfico ilustrativo dos valores observados de diversidade nucleotídica em onze populações naturais de *Annona crassiflora*. O comprimento das linhas verticais denota a magnitude do intervalo de confiança a 95%.

níveis de diversidade nucleotídica de diferentes populações foram encontradas. É importante ressaltar que, a princípio, não existe relação direta entre as estimativas de diversidades de haplótipos e de nucleotídeos. Com apenas um nucleotídeo de diferença em

cada par de seqüências, a diversidade de haplótipos de qualquer população já assumirá valores relativamente altos. O mesmo não se pode dizer da estimativa de diversidade nucleotídica, que para ser alta é necessário que haja muitas diferenças entre os sítios das seqüências comparadas e por isso se torna uma medida de diversidade genética mais robusta.

Quando comparadas às demais, as populações Parque das Emas e Rio Verde apresentaram níveis de diversidade nucleotídica muito superiores. A razão para a nificância da diferença entre os níveis de diversidade pode estar na presença de dois haplótipos (04.01 e 06.04) que parecem ter exercido uma grande influência sobre o parâmetro π . Uma análise posterior dos cromatogramas referentes a estes dois haplótipos revelou que os níveis de confiança associados à qualidade do seqüenciamento nestes casos é apenas razoável. A retirada destes dois haplótipos da análise torna os níveis de diversidade encontrados nestas duas populações similares às populações Serranópolis, Itarumã, Aragoiânia, Água Fria, Campos Belos e Posse. Como a presença destes dois haplótipos não exerceu influência detectável sobre os demais parâmetros analisados, optou-se pela manutenção dos mesmos no restante do trabalho. Digno de nota são os baixos níveis de diversidade nucleotídica encontrados nas populações Lagoa, Alto Paraíso e em menor escala Cabeceiras. Em tais populações, entretanto, não foi verificado qualquer sinal evidente de perturbação antrópica, sugerindo que os baixos índices de diversidade nucleotídica observados possam estar refletindo a ocorrência recente de gargalos demográficos (*bottlenecks*) associados a outros fatores.

O teste de neutralidade para o conjunto global de seqüências ($n=101$) não apresentou significância estatística segundo o teste de Tajima ($D = -0,0847$, $P > 0,10$), sugerindo que do ponto de vista evolutivo, o fragmento seqüenciado não sofre efeitos detectáveis da seleção natural. Neste contexto, os altos níveis de diversidade genética verificados podem ser resultado da ação conjunta das forças de mutação, fluxo gênico e deriva genética ao longo da história evolutiva da espécie.

Embora o teste de Tajima tenha sugerido a inexistência de pressões seletivas atuando sobre o conjunto total de seqüências obtidas, desvios estatisticamente significativos foram encontrados quando as populações foram analisadas separadamente (Tabela 4). A significância dos desvios avaliados pelo teste de Tajima, segundo Hartl (2000), pode estar associada a: i) seleção natural agindo contra genótipos que carregam alelos raros; ii) *bottlenecks* populacionais recentes que eliminam alelos menos freqüentes,

de modo que ainda não tenha ocorrido tempo suficiente para que as populações pudessem restaurar a condição de equilíbrio mutação-deriva.

Tabela 4. Resultados obtidos pelo teste de Tajima aplicado a dados de seqüenciamento da região *trn-L* do cpDNA obtido de indivíduos de 11 populações naturais de *Annona crassiflora*. (*n*: número de indivíduos; *D*: estatística de Tajima).

População	n	<i>D</i>	Nível de significância
Lagoa	8	-	-
Rio Verde	8	-1,3914	$p > 0,10$
Serranópolis	8	-1,5336	$0,05 < p < 0,10$
P. Emas	8	-1,6979	$0,01 < p < 0,05$
Itarumã	8	-1,2801	$p > 0,10$
Aragoiânia	7	-1,2284	$p > 0,10$
Água Fria	7	-1,1008	$p > 0,10$
Alto Paraíso	8	-1,0548	$p > 0,10$
Campos Belos	8	-1,5759	$0,05 < p < 0,10$
Posse	6	-1,4893	$0,01 < p < 0,05$
Cabeceiras	6	-1,8545	$p < 0,0001$

Por ser evolutivamente neutra a região estudada (*trn-L*) do cpDNA não sofre os efeitos restritivos da seleção natural. Assim, os desvios da neutralidade encontrados nas populações de *A. crassiflora*, são decorrentes de prováveis *bottlenecks* populacionais causados pela ampla fragmentação e ocupação que o Cerrado vem sofrendo há alguns anos. Assim exposto, parece que a diversidade genética encontrada nessas populações sofreu um estrangulamento, encontrando-se atualmente em níveis mais baixos do que normalmente seriam encontrados na ausência dessas restrições demográficas. É importante também observar que embora vários valores de *D* tenham sido considerados como não significativamente diferentes de 0,0, todos eles foram negativos, sugerindo que perdas de diversidade decorrentes de *bottlenecks* recentes podem estar ocorrendo em níveis estatisticamente não detectáveis, de forma generalizada, em todas as populações.

A comparação dos resultados das Tabelas 2 e 3 permitiu a identificação de populações com diferentes histórias evolutivas. A população de Lagoa, por exemplo, onde somente um único haplótipo foi detectado (Tabela 5), impossibilitando inclusive a realização do teste de Tajima, possui um nível de diversidade genética nitidamente inferior

às demais, provavelmente em decorrência de fortes efeitos de estrangulamento demográfico ocorrido no passado. Nas populações Rio Verde, Serranópolis, Itarumã, Água Fria e Campos Belos, onde foram encontrados níveis razoáveis de diversidade genética, não foram detectados desvios significativos da neutralidade, sugerindo um bom estado de conservação para estas populações. Para as populações Parque das Emas e Posse, que ainda apresentam um elevado nível de diversidade nucleotídica, foram detectados desvios significativos da neutralidade, sugerindo a ocorrência de *bottlenecks* extremamente recentes, cujos efeitos ainda estão por vir. Os resultados obtidos para a população de Cabeceiras, por outro lado, evidenciam certa perda de diversidade genética por estrangulamento demográfico relativamente recente. Diferentemente ainda, os resultados obtidos para a população Alto Paraíso sugerem a ocorrência de um estrangulamento populacional antigo, revelado pelo baixo nível de diversidade genética encontrado, embora os efeitos cumulativos da mutação aparentemente já tenham iniciado o processo de recuperação da diversidade nucleotídica.

Tabela 5. Distribuição dos haplótipos em cada população de *Annona crassiflora*.

Populações	Haplótipos						
	hap1	hap2	hap3	hap4	hap5	hap6	hap7
Lagoa	8	0	0	0	0	0	0
Rio Verde	7	1	0	0	0	0	0
Serranópolis	0	0	1	6	1	0	0
P. Emas	0	0	0	7	0	1	0
Itarumã	0	0	0	8	0	0	0
Aragoiânia	4	0	0	3	0	0	0
Água Fria	1	0	0	5	0	0	1
Alto Paraíso	1	0	0	7	0	0	0
Campos Belos	0	0	0	8	0	0	0
Posse	0	0	1	5	0	0	0
Cabeceiras	0	0	0	6	0	0	0

Os *bottlenecks* estão quase sempre associados a processos erosivos como deriva genética (Wright, 1931) e endogamia (Saccheri et al., 1999). Ao elevar as taxas de deriva genética e de endogamia, os *bottlenecks* submetem as populações à perda de variação genética, cuja magnitude, varia dependendo do tamanho da população e da duração e intensidade do próprio *bottleneck*. Com a perda de variação genética, as populações perdem potencial adaptativo (Woodworth et al., 2002), reduzem a resistência a parasitas e à doenças, e diminuem sua capacidade em responder a mudanças ambientais

(Lacy, 1997; Reed et al., 2002). Apesar de os *Bottlenecks* serem importantes do ponto de vista evolutivo, uma vez que podem contribuir de maneira decisiva para os eventos de especiação (Mayr, 1963; Slatkin, 1996), seus efeitos em *Annona crassiflora* estão muitos mais próximos da extinção das populações estudadas do que de um processo de transformação em uma nova espécie. Essa conclusão é corroborada pelo fato de que adicionalmente ao gargalo genético, algumas populações passaram por um forte estrangulamento demográfico, facilmente detectado durante o processo de coleta, onde chegou-se a observar uma população cujos indivíduos estavam restritos a apenas um transecto linear.

4.2 ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA

A análise da estrutura genética nas populações de *A. crassiflora* revelou muitas particularidades. Dos sete haplótipos encontrados, quatro se apresentaram de maneira exclusiva (hap02, hap05, hap06 e hap07, nas populações Rio Verde, Serranópolis, Parque das Emas e Água Fria, respectivamente). Os demais (hap01, hap03 e hap04), foram encontrados em pelo menos duas populações, com destaque para o haplótipo 4, que foi encontrado em nove das 11 populações amostradas (Tabela 5; Figura 4).

Os dados apresentados na Tabela 5 e na Figura 4 mostram respectivamente a frequência de ocorrência e a disposição dos haplótipos e sugerem que as populações analisadas apresentam um elevado grau de similaridade genética entre si. Essa alta similaridade, entretanto, não pressupõe necessariamente que esteja havendo intercâmbio genético atualmente entre populações. Analisando-se a Tabela 5, observa-se que algumas populações apresentaram apenas um haplótipo. Como o caráter da amostragem foi completamente aleatório dentro de cada população, a presença de um único haplótipo pode estar indicando que nessas populações, o haplótipo encontrado já tenha sido fixado. Assim, existe uma possibilidade muito grande que esse resultado não se altere, mesmo aumentando-se o tamanho da amostra.

A Figura 4 traz a representação gráfica da distribuição dos haplótipos nas populações de *A. crassiflora*. Nela, observa-se a existência de um padrão peculiar de estruturação para a diversidade genética encontrada nessa espécie. É interessante observar a prevalência dos haplótipos 1 e 4, dividindo inclusive as populações em dois grupos: i) populações onde predomina o haplótipo 1; ii) populações onde predomina o haplótipo 4.

Neste sentido, a população Aragoiânia aparece como intermediária, com praticamente a mesma prevalência dos haplótipos 1 e 4.

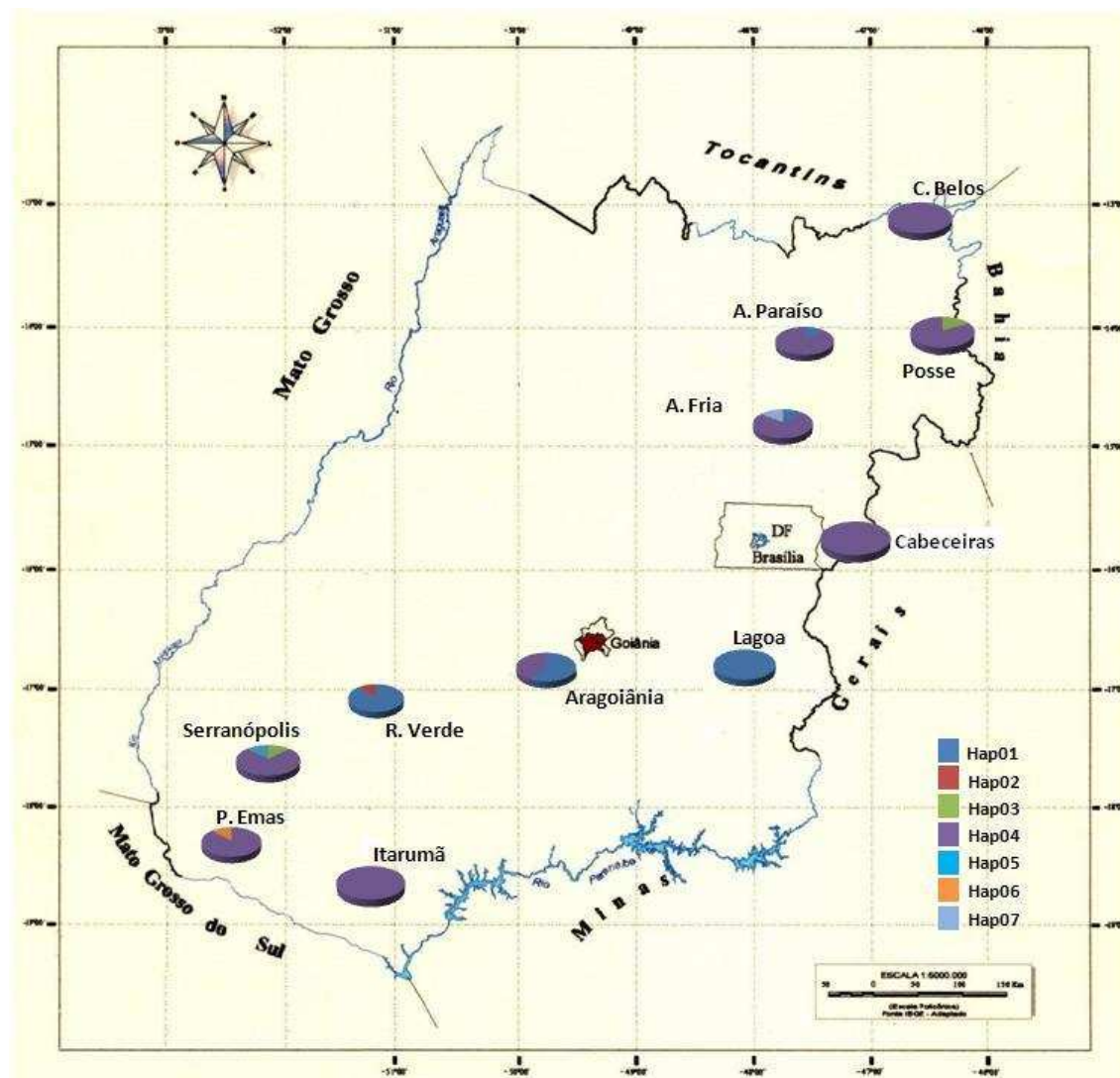


Figura 4. Representação gráfica da distribuição de haplótipos encontrados nas populações naturais de *Annona crassiflora* localizadas no estado de Goiás.

A partir da análise da *Minimum Spanning Tree* obtida para os sete haplótipos identificados nas 11 populações (Figura 5), observa-se que o haplótipo 4 é justamente o mais antigo dentre eles, o que explica a sua ampla distribuição geográfica. O haplótipo 1 seria então derivado do haplótipo 4, sugerindo uma colonização mais recente da região ocupada pelas populações Rio Verde e Lagoa.

Cumprir observar que estas análises foram realizadas utilizando-se somente os sítios polimórficos, em que o polimorfismo é decorrente de eventos de substituição nucleotídica. Sítios com *gaps* provenientes do alinhamento foram excluídos, o que explica

a aparente incongruência entre as Tabelas 3 e 5, que trazem respectivamente informações sobre a diversidade e ocorrência de haplótipos em cada população estudada. Quando se considera a diversidade de haplótipos da população lagoa (0,875), apresentada na Tabela 3, por exemplo, verifica-se que esse valor deve corresponder não somente à presença de um único haplótipo (hap 1), apresentado na Tabela 5. Entretanto, na Tabela 3, os valores encontrados incluíram todos os *gaps* nas seqüências, considerados nas estimativas de diversidade como uma quinta base, uma vez que qualquer *gap* representa uma inserção/deleção e portanto, uma diferença entre seqüências.

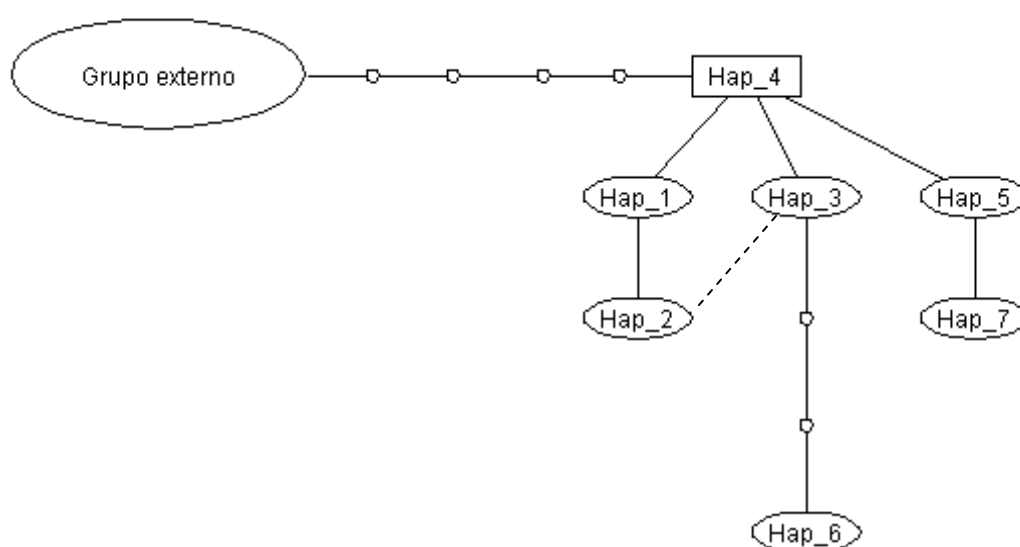


Figura 5. Minimum Spanning Tree representativa da relação filogenética entre os haplótipos, inferida por parcimônia. A linha mais fina entre os haplótipos 2 e 3 denota um caminho alternativo.

Se o mesmo critério fosse adotado na análise de distribuição de haplótipos, cada indivíduo apresentaria um haplótipo diferente, não sendo possível avaliar a estrutura genética das populações. Isso por que o *gap* representa um evento de mutação (inserção/deleção) cujo resultado não pode ser visualizado. Assim, qualquer seqüência que apresentasse um *gap* num sítio em que as demais seqüências possuem A, T, G ou C, já estaria representando um haplótipo diferente dos demais. Por outro lado, a retirada dos *gaps* não torna a análise menos realística em relação à dinâmica evolutiva das populações, pois a aplicação da Teoria da Coalescência permite diferenciar facilmente processos distintos como ancestralidade comum, fluxo gênico ou mutações, mesmo que a análise seja feita com poucos sítios (somente aqueles que se apresentaram polimórficos). Assim, é

muito mais verossímil que a relação encontrada entre as populações de Serranópolis e Posse, por exemplo, seja devido a uma ancestralidade comum ou a fluxo gênico ancestral entre essas populações (a atual situação do Cerrado dificulta conectividade entre populações), do que à ocorrência de uma ou mais mutações pontuais, originando um mesmo estado, nos mesmos sítios, em diferentes seqüências.

Apesar da grande similaridade, de modo geral, a relação entre os agrupamentos formados com a distância geográfica entre as populações é baixa. O dendrograma apresentado na Figura 6 mostra que populações próximas geograficamente não estão necessariamente agrupadas entre si. O gráfico de dispersão entre os valores de distância genética e distância geográfica reafirma o resultado do dendrograma e é apresentado na Figura 7 (ver também Tabela 6). Embora o padrão de dispersão encontrado apresente uma leve tendência de que o aumento da distância geográfica seja acompanhado por um aumento da divergência genética, este efeito não foi estatisticamente significativo ao nível de 5% de significância.

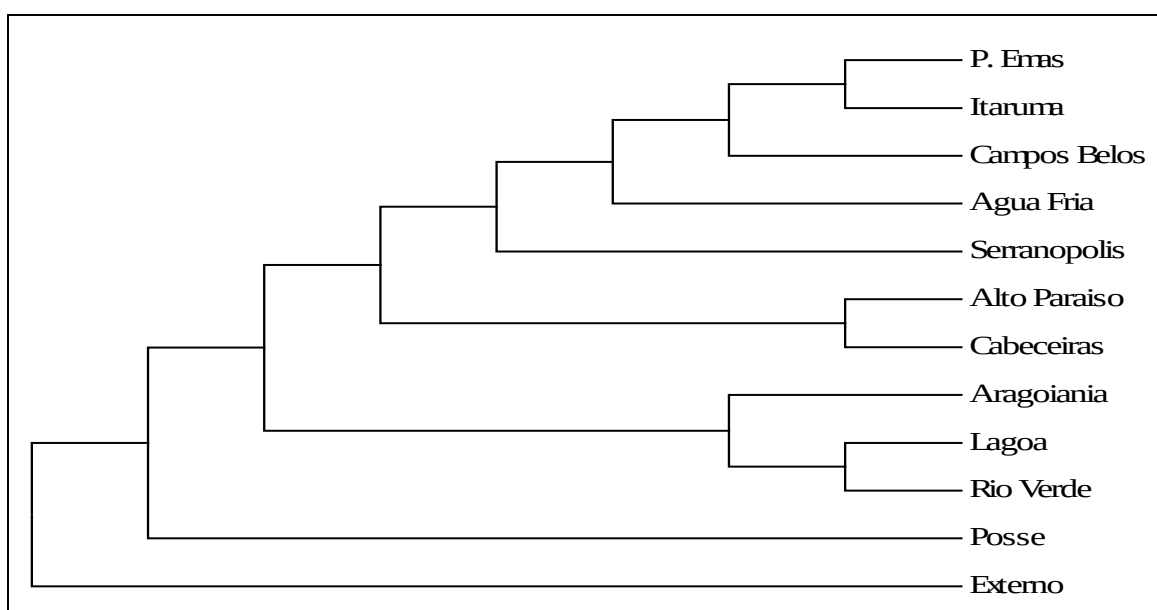


Figura 6. Dendrograma baseado na proporção média de diferenças entre pares de haplótipos encontrados em populações de *Annona crassiflora* localizadas no Estado de Goiás.

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

fecundação cruzada, em média 20% da variação genética está distribuída entre as populações.

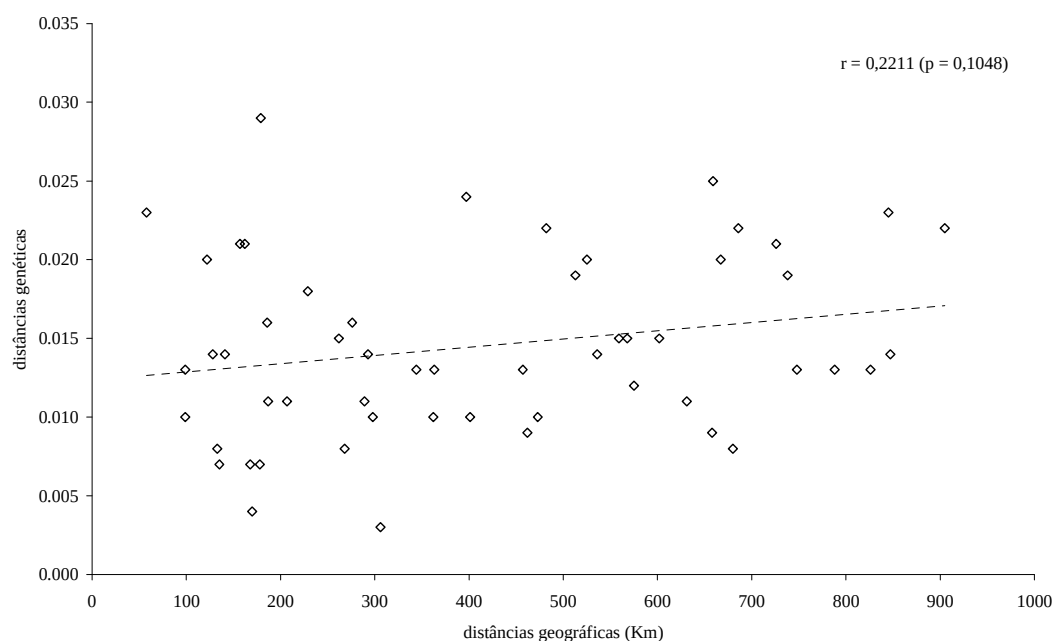


Figura 7. Gráfico de correlação entre distâncias genéticas e geográficas observadas entre diferentes populações de araticunzeiro localizadas no Estado de Goiás.

Tabela 6. Matriz de distâncias genéticas e geográficas entre onze populações de araticunzeiro no Estado de Goiás. A diagonal superior mostra a distância genética (proporção média de diferenças entre haplótipos de populações diferentes). A diagonal inferior mostra a distância geográfica entre populações (Km).

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

Tabela 7. Distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações de araticum, obtida através do coeficiente de variação genética G_{ST} .

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

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

4.3 TEMPO DE DIVERGÊNCIA DAS POPULAÇÕES

Tradicionalmente, estimativas de fluxo gênico (número de migrantes por geração – N_m) são obtidas utilizando-se o índice F_{ST} , pressupondo-se o equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico segundo o modelo de ilhas de Wright (1931). Como salientam diversos autores, no entanto, estimativas obtidas desta maneira são somente aparentes. No presente estudo, as populações de *A. crassiflora* se encontram sabidamente isoladas geograficamente, e estimativas de fluxo gênico obtidas utilizando-se a relação F_{ST} e N_m seriam de pouca utilidade, já que a baixa divergência genética encontrada entre as populações resulta de fluxo/colonização passada e, sobretudo de um pequeno período de divergência genética entre as populações, sabidamente isoladas. Neste contexto, optou-se pela metodologia estabelecida por Nielsen & Wakeley (2001). Os resultados estão apresentados na Tabela 7 (ver também Anexo A).

Para obtenção do conjunto de parâmetros estimados pela metodologia citada levou-se em consideração que o cenário em que as populações de *A. crassiflora* estão

atualmente inseridas é o de subdivisão com ausência de fluxo gênico. Assim, admitiu-se que a taxa de migração entre populações é nula. Procurou-se neste contexto se estabelecer o tempo de divergência entre as populações. É importante considerar que sob estas pressuposições, toda a divergência encontrada entre as populações resulta do tempo de isolamento geográfico entre elas, quando o fluxo gênico entre elas foi interrompido. Por outro lado, admite-se ainda que toda a similaridade genética existente entre as populações de *A. crassiflora* resulta de eventos históricos de fluxo gênico muito antigos, quando as populações ainda eram conectadas entre si.

A Figura 8 apresenta a relação ancestral dos haplótipos, evidenciando que num passado não muito distante, as populações trocavam genes intensamente. Com algumas exceções, a maioria dos haplótipos possui ramos curtos sugerindo a ocorrência de eventos coalescentes relativamente recentes. Em conformidade com essa hipótese está o fato de que vários haplótipos de diferentes populações coalesceram num mesmo ramo, indicando que eventos migratórios interconectavam as populações no passado. É importante dizer ainda que, neste caso, a árvore coalescente representada na Figura 8 foi produzida considerando-se todos os sítios polimórficos, incluindo-se os gaps presentes nas seqüências, diferentemente das análises anteriores, em que somente o polimorfismo decorrente de eventos de substituição fora considerado.

Na Tabela 8 é apresentada uma série de parâmetros cujos resultados sugerem um cenário de subdivisão recente entre todos os pares de populações. Os valores encontrados para o tempo de divergência entre populações (T) apontam para um tempo de divergência relativamente curto entre todas as possíveis combinações de populações. Os tempos de divergência não se mostraram correlacionados com a proximidade geográfica (Figura 9). O pequeno tempo de divergência entre as populações pode explicar a elevada similaridade genética existente entre estas populações, mesmo quando geograficamente distantes.

Utilizando-se uma taxa hipotética de mutação da ordem de 10^{-5} foram também estimados os tamanhos efetivos médios operantes para os pares de populações durante o período de diferenciação entre elas. Estas estimativas sugerem que, a médio prazo (em termos de número de gerações) é possível se antever um forte efeito de diferenciação entre as populações, com tamanhos efetivos da ordem de poucas centenas de indivíduos. Com aumento da divergência, as populações tendem a perder não só a diversidade genética como também a capacidade adaptativa, sem a qual a espécie dificilmente conseguirá

sobreviver às imprevisíveis mudanças ambientais futuras.

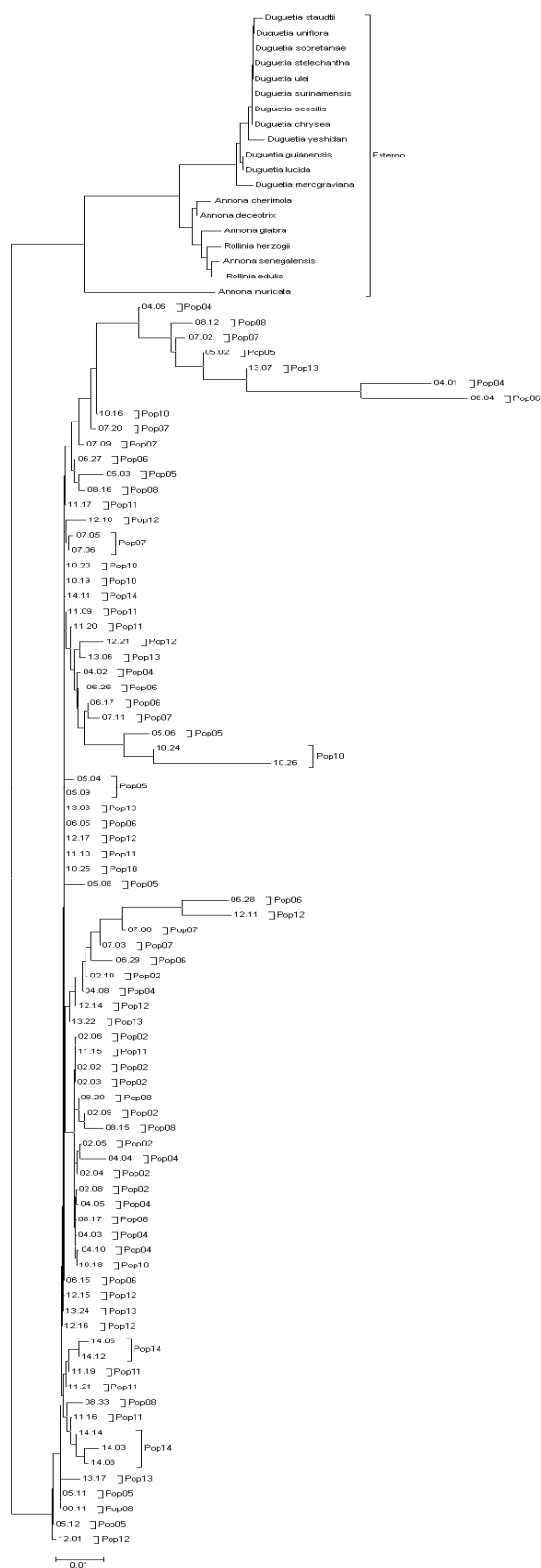


Figura 8. Dendrograma construído através do algoritmo Neighbor-joining, mostrando a coalescência entre haplótipos, baseado na sequência *trnL* de cpDNA de *A. crassiflora*.

Tabela 8. Estimativas dos parâmetros: tamanho efetivo da população ($\theta = N\mu$); tempo de divergência (T); tempo para o ancestral comum mais recente (TMRCA) baseadas na análise da região (*trnL*) do cpDNA, através do programa MDIV.

	Rio Verde	Serranópolis	Parque das Emas	Itarumã	Aragoiânia	Água Fria	Alto Paraíso	Campos Belos	Posse	Cabeceiras	
Lagoa	2.08	2.73	2.86	1.07	1.72	1.42	0.1	1.31	1.83	0.44	θ
	0.08	0.50	0.02	0.06	1.34	0.54	0.14	0.22	0.28	0.02	T
	8.96	2.54	7.7	2.63	3.65	5.75	4.43	4.24	5.19	3.98	TMRCA
	200	263	276	103	166	137	10	126	176	42	N_e
Rio Verde		4.77	4.85	2.51	3.1	3.57	2.57	4.23	4.88	3.56	θ
		0.48	0.42	0.78	0.16	0.40	0.30	0.60	0.44	0.46	T
		3.49	3.67	6.38	4.85	5.60	7.50	4.69	3.12	6.58	TMRCA
		460	467	242	299	344	248	408	470	343	N_e
Serranópolis			3.03	3.1	3.75	3.1	2.73	5.16	3.77	3.32	θ
			0.60	0.18	0.20	0.18	0.08	0.20	0.20	0.04	T
			4.57	2.15	1.96	2.15	2.75	1.70	2.27	2.71	TMRCA
			292	299	361	299	263	497	363	320	N_e
Parque das Emas				2.71	3.73	3.78	2.56	2.56	4.05	4.59	θ
				0.02	0.18	0.02	0.12	0.18	0.02	0.08	T
				5.07	5.09	5.69	8.59	8.59	3.95	6.67	TMRCA
				261	359	364	247	247	390	442	N_e
Itarumã					2.19	1.98	0.92	0.8	1.52	1.36	θ
					0.54	0.28	0.54	0.02	0.02	0.46	T
					1.97	3.41	2.80	2.93	2.64	2.61	TMRCA
					211	191	89	77	146	131	N_e
Aragoiânia						3.77	2.06	4.05	3.84	1.85	θ
						0.02	0.12	0.34	0.28	0.28	T
						2.75	4.66	3.02	3.43	4.76	TMRCA
						363	198	390	370	178	N_e
Água Fria							1.32	4.07	0.04	2.08	θ
							0.02	0.02	4.24	0.26	T
							4.85	2.87	3.05	3.95	TMRCA
							127	392	4	200	N_e
Alto Paraíso								1.57	1.34	0.08	θ
								0.04	0.20	0.28	T
								4.05	8.75	5.52	TMRCA
								151	129	8	N_e
Campos Belos									3.43	1.43	θ
									0.02	0.02	T
									4.30	4.13	TMRCA
									330	138	N_e
Posse										2.41	θ
										0.10	T
										6.15	TMRCA
										232	N_e

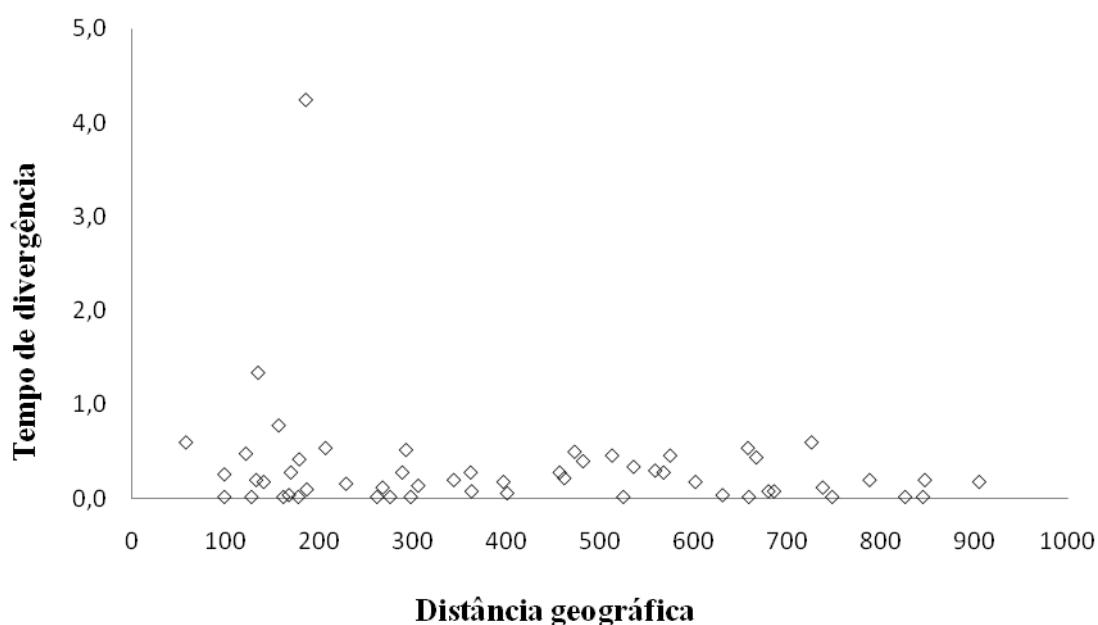


Figura 9. Gráfico de correlação entre distâncias geográficas e tempo de divergência de populações de *A. crassiflora*.

5 CONCLUSÃO

- i. Mesmo isoladas geograficamente as populações de *A. crassiflora* ainda apresentam grande similaridade genética entre si. Os resultados sugerem que essa similaridade é resultado do pequeno tempo transcorrido desde que estas populações passaram a se constituir em isolados geográficos.
- ii. Apesar da alta diversidade genética presente na espécie, as populações se encontram num iminente processo de diferenciação como resultado provável da ampla fragmentação pelo qual o Cerrado vem passando a mais ou menos 60 anos. A taxa de divergência entre as populações já se encontra em patamares significativos, a despeito da elevada similaridade existente entre elas.
- iii. O atual padrão de distribuição da diversidade genética de *A. crassiflora* sugere que futuros programas de conservação *ex-situ* amostram o maior número possível de populações a fim de se coletar a parte da variação genética presente entre populações. Aponta ainda para a necessidade de contenção da fragmentação, decorrente das práticas de extrativismo exagerado e expansão das fronteiras agrícolas, no intuito de impedir que a divergência genética interpopulacional atinja níveis críticos para a espécie.

6 REFERÊNCIAS

- AB´SABER, A. N. **O domínio dos cerrados: introdução ao conhecimento**. Fundação Centro de Formação do Servidor Público, Brasília, v. 3, n. 4, p. 41-55, 1983.
- ADÁMOLI, J. O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os Cerrados: discussão sobre o conceito de “Complexo do Pantanal”. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 32., 1981. Teresina. **Anais...** Teresina: Sociedade Botânica do Brasil, 1982. p. 109-119.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. Rio de Janeiro: USAID, 1971. 331 p.
- ALLEM, A. C.; VALLS, J. F. M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense**. Brasília, EMBRAPA - CENARGEN, 1987. 339 p.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA - CPAC. 1998. 464 p.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. 1. ed. Planaltina: EMBRAPA – CPAC. 1987. 83 p.
- ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos**. 2003. 146 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.
- ALVIM, P. T.; ARAÚJO, W. A. Soil as an ecological factor in the development of vegetation in the Central Plateau of Brazil. **Turrialba**, San José, v. 2, p. 153-160, 1952.
- ARRUDA, M. B. **Ecossistemas brasileiros**. Brasília: Edições IBAMA. 2001. 49 p.
- ATLAS DO MEIO AMBIENTE BRASIL**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – 2. ed., rev. aum. – Brasília: EMBRAPA – SPI : Terra Viva, 1996. 160 p.
- AZEVEDO, L. G.; CASER, R. L. 1980. Regionalização do Cerrado. In: **SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO**, 5. 1979, Brasília, DF. Cerrado: uso e manejo. Brasília: Editerra, 1980. p. 211-229.
- BAHLO, M.; GRIFFITHS, R. C. Inference from gene trees in a subdivided population. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 57, p. 79-95, 2000.

BANDEIRA, L. F. **Caracterização genética de populações naturais de araticum** (*Annona crassiflora* Mart.). 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2002.

BARBERI, M. **Mudanças paleoambientais na região dos Cerrados do Planalto Central durante o Quaternário Tardio: o estudo da Lagoa Bonita, DF.** 2001. 210 f. Tese (Doutorado em Geologia) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BARROSO, G. M. Subclasse I. Magnoliidae. In: BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** São Paulo: Edusp, 1978. p. 21-33.

BEARD, J. S. The savanna vegetation of northern tropical America. **Ecological Monographs**, Lawrence, v. 23, p. 149-215, 1953.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum Likelihood estimation of a migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent. **Genetics**, Austin, v. 152, p. 763-773, 1999.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum Likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 4563-4568, 2001.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal Plants. **Fitoterapia**, Milano, v. 73. p. 428-430, 2002.

BIRKY, C. W. In: GOTTLIEB, L. D.; JAIN, S. K. (Ed.). **Plant Evolutionary Biology.** London: Chapman and Hall, 1988. p. 23-53.

BROWN, A. H. D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 52, p. 145-57, 1978.

BRYAN, G. J.; McNICOLL, J.; RAMSAY, G.; MEYER, R. C.; JONG, W. S. D. Polimorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 859-867, 1999.

CARLINI – GARCIA, L. A.; VENCOSKY, R.; COELHO, A. S. G. Método Bootstrap aplicados em níveis de reamostragem na estimação de parâmetros genéticos populacionais. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n.4, p. 785-793, 2001.

CASTELLOE, J.; TEMPLETON, A. R. Root Probabilities for Intraspecific Gene Trees under Neutral Coalescent Theory. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 3, n. 2, p. 102-113, 1994.

- CHAVEZ, D.; MATA, R.; IGLESIAS-PRIETO, R.; LOTINA – HENNSSEN, B. Annonaceous acetogenins: Naturally occurring inhibitors of ATP synthesis and photosystem II in spinach chloroplasts. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 111, p. 262-268, 2001.
- CHIANG, Y.; CHIANG, Y. C.; CHEN, Y. J.; CHOU, C. H.; HAVANOND, S.; HONG, T. N.; HUANG, S. Phylogeography of *Kandelia candel* in east Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. **Molecular Ecology**, Oxford, v.10, p. 2697-2710, 2001.
- CHIANG, Y. C.; SCHAAL, B. A.; GE, X. J.; CHIANG, T. Y. Range expansion leading to departures from neutrality in the nonsymbiotic hemoglobin gene and the cpDNA *trnL* – *trnF* intergenic spacer in *Trema dielsiana* (Ulmaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 31, n. 3, p. 929-942, 2004.
- CHIH, H. W.; CHIU, H. F.; TANG, K. S.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cell line by apoptosis induction. **Life Sciences**, Elmsford, v. 69, p. 1321-1331, 2001.
- CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, Washington, v. 30, n.12, p. 814-818, 1980.
- CLEGG, M. T.; GAUT, B. S.; LEARN, G. H.; MORTON, B. R. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, p. 6795-6801, 1994.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657-1660, 2000.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, Lancaster, v. 23, p. 72-83, 1969.
- COELHO, A. S. G.; VALVA, F. D. O Processo evolutivo e o melhoramento de Plantas. In: NASS, L. L.; MELO, I. S.; VALADARES - INGLIS, M. C. (ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 58-78.
- COLE, M. M. A savana brasileira. **Boletim Carioca de Geografia**, Rio de Janeiro, v. 11. p. 5-52, 1958.
- COLINVAUX, P.A.; OLIVEIRA, P. E.; BUSH, M. B. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: The failure of the aridity and refuge hypothesis. **Quaternary Science Reviews**, Oxford, v. 19, p. 141-169, 2000.
- COLINVAUX, P. A.; OLIVEIRA, P. E.; MORENO, J. E.; MILLER, M. C.; BUSH, M. B. A long pollen record from Lowland Amazonia: Forest and cooling in glacial times. **Science**, Washington, v. 274, p. 85-88, 1996.
- CONNER, J. K.; HARTL, D. L. **A primer of Ecological Genetics**. ed. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, 2004. 304 p.

CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-1978, v. 1, 747 p.

CRAWFORD, T. J. The estimation of neighborhood parameters for plant populations. **Heredity**, London, v. 52, p. 273-283, 1984.

DIAS, B. F. S. Cerrados: Uma Caracterização. In: DIAS, B. F. S. (Org.). **Alternativas de Desenvolvimento dos Cerrados: Manejo e Conservação dos Recursos Naturais Renováveis**. Brasília, DF, Brasil: FUNATURA, 1992. p. 11-25.

DOBES, C. H.; MITCHELL-OLDS, T.; KOCH, M. A. Extensive chloroplast haplotype variation indicates Pleistocene hybridization and radiation of North American *Arabis drummondii*, *A. divaricarpa*, and *A. holboellii* (Brassicaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 349-370, 2004.

DONADIO, L. C. Situação Atual e Perspectivas das Anonáceas. In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; MORAIS, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H. **Anonáceas, Produção e Mercado**: Pinha, Graviola, Atemoia e Cherimólia. Vitória da conquista: DFZ/UESB, 1997. p. 1-4.

DURIGAN, G.; BACIC, M. C.; FRANCO, G. A. D. C.; SIQUEIRA, M. F. Inventário florístico na estação Ecológica de Assis, São Paulo. **Hoehnea**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 149-172, 1999.

DYER, T. A.; BOWMAN, C. M. Nucleotide sequences of chloroplast 5S ribosomal ribonucleic acid in flowering plants. **Biochemistry Journal**, London, v. 183, p. 595-604, 1979.

EITEN, G. The Cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review**, Bronx, v. 38, n. 2, p. 201-341, 1972.

EITEN, G. Vegetação do Cerrado In: PINTO, M. N. **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. 2. ed. Brasília: UNB/SEMANTEC, 1994. p. 9-65.

EMERSON, B. C.; PARADIS, E.; THÉBAUD, C. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 16, n. 12, p. 707-716, 2001.

ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, London, v. 72, p. 250-259, 1994.

ENNOS, R.A. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: HOLLINGSWORTH, P. M.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. (Ed.). **Molecular Systematics and Plant Evolution**. London: Taylor and Francis, 1999. p. 1-19.

EPPERSON, B.K. Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. **Genetics**, Austin, v. 124, p. 757-771, 1990.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 136, p. 343-359, 1992

FANG, X. P.; RIESER, M. J.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: an Updated Rewiew. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 4, p. 27-48, 1993.

FELSEINSTEIN, J. **Inferring Phylogenies**. University of Washington. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 2004. 665 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA – CENARGEN. 1998. 220 p.

FISHER, R. A. **The Genetical Theory of Natural Selection**. Clarendon, Oxford. 1930. 145 p.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American Leishmania sp. in BALB/c mice. **Phytotherapy Research**, London, v. 7, p. 281-284, 1993.

FU, Y. X. Coalescing into the 21st Century: An Overview and Prospects of Coalescent Theory. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 56, p. 1-10, 1999.

FUTUYMA, D. J. **Biología evolutiva**. 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1993. 631 p.

GOLDING, G. B. The detection of deleterious selection using ancestors inferred from a phylogenetic history. **Genetical Research**, London, v. 49, p. 71-82, 1987.

GOLDING, B.; FELSENSTEIN, J. A maximum likelihood approach to the detection of selection from a phylogeny. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 31, p. 511-523, 1990.

GOTTSBERGER, G. Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona* spp. (Annonaceae) in Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 167, p. 165-187, 1989b.

GOTTSBERGER, G. Beiträge zur Biologie von Annonaceenblüten. **Österreichische Botanisches Zeitschrift**, Wien, v. 118, p. 237-279, 1970.

GOTTSBERGER, G. Comments on flower evolution and beetle pollination in genero *Annona* and Rollinia (Annonaceae). **Plant Sistematics and Evolution**, New York, v. 167, p. 189-194, 1989a.

GOTTSBERGER, G. Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. **Plant species Biology**, Tokyo, v. 14, p. 143-152, 1999.

GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Dispersal and distribution in the Cerrado vegetation of Brazil. **Sonderbd. Naturwiss. Ver**, Hamburg, v. 7, p. 315-352, 1983.

GRAY, M.W. Evolution of organellar genomes. **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 9, p. 678-687, 1999.

GRIVET, D.; PETIT, R. J. Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 1351-1362, 2002.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v. 39, p. 439-446, 1974.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J. B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.10, p. 173-200, 1979.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.

HAMRICK, J. L. Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations. In: Soltis, D.E.; SOLTIS, P.S. (Eds.). **Isozymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1990. p. 87-105.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, L. (Ed.). **Genetics and conservation**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1983. p. 335-348.

HAMRICK, J. L. & GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D., CLEGG, M. T., KAHLER, A. L., WEIR, B. S. (eds). **Plant population genetics, breeding and germplasm resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1989. p. 43-63.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London — Series B: Biological Sciences**, London, v. 351, p. 1291-1298, 1996.

HARTL, D. L. **A primer of population genetics**. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2000. 220 p.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1997. 530 p.

HAYWARD, M. D.; HAMILTON, N. R. S. Genetic diversity, population structure and conservation. In: Callow, J. A.; Ford-Loyd, B. V.; Newbury, H. J. **Biotechnology and plant genetic resources – conservation and use**. Biotechnology in agriculture series, cab international, Wallingford, v. 19, 1997. p. 49-76.

HERINGER, E. P.; BARROSO, G. M.; RIZZO, J. A.; RIZZINI, C. T. A Flora do Cerrado. In: FERRI, M. G. (ed.). **IV Simpósio sobre o Cerrado**. Belo Horizonte, Brasil: Editora Universidade de São Paulo, 1977. p. 211-232.

HUDSON, R. R.; KAPLAN, N. L. The coalescent process in models with selection and recombination. **Genetics**, Austin, v. 120, p. 831-840, 1988.

ISHII, T.; MCCOUCH, S. R. Microsatellites and microsynteny in the chloroplast genomes of *Oriza* and eight other Gramineae species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 1257-1266, 2000.

KAN, W. S. **Manual of medicinal Plants in Taiwan**. National Research Institute of Chinese Medicine, Taipei, Taiwan, Republic of China. 1979, 246 p.

KIMURA, M. **The Neutral Theory of Molecular Evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 367 p.

KINGMAN, J. F. C. On the genealogy of large populations. **Journal of Applied Probability**, Sheffield, v. 19A, p. 27-43, 1982.

KINGMAN, J. F. C. Origins of the Coalescent: 1974-1982. **Genetics**, Austin, v. 156, p. 1461-1463, 2000.

KOSOVITS, A. R. **Assimilação de nitrogênio em espécies lenhosas de Cerrado**. 1977. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1977.

KREBS, J. R.; DAVIES, N. B. **Behavioural Ecology**. 4. ed. Blackwell Science: Oxford, 1997. 464 p.

KUHNER, M.; YAMATO, J.; FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. **Genetics**, Austin, v. 149, p. 429-434, 1998.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, v.5, p. 150-163, 2004.

KAPLAN, N.; HUDSON, R. R.; IIZUKA, M. The coalescent process in models with selection, recombination and geographic subdivision. **Genetical Research**, London, v. 57, p. 83-91, 1988.

LACY, R. C. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 78, n. 2, p. 320-335, 1997.

LARENA, B.G.; AGUILAR, J.F.; FELINER, G.N. Glacial-induced altitudinal migrations in *Armeria* (Plumbaginaceae) inferred from patterns of chloroplast DNA haplotype sharing. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 1965-1974, 2002.

LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 56, p. 30-38, 1993.

LOPES, A. S. **Solos sob cerrado: características, propriedades, manejo**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1984. 162 p.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; OLIVEIRA, A.V.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores Moleculares Dominantes (Rapid e Aflp). **Revista Biotecnologia**, Brasília, v. 29, p. 56-60, 2002.

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

LU, S. Y.; HONG, K. H.; LIU, S. L.; CHENG, Y. P.; WU, W. L.; CHIANG, T. Y. Genetic variation and population differentiation of *Michelia formosana* (Magnoliaceae) based on cpDNA variation and RAPD fingerprints: relevance to post-Pleistocene recolonization. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 115, p. 203-216, 2002.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetic analysis of Quantitative Traits**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 1998. 980 p.

MAHIOU, A. V.; ROBLOTB, F.; FOURNETC, A.; HOCQUEMILLERB R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). **Phytochemistry**, New York, n. 54, p. 709-716, 2000.

MALIGA, P. Engineering the plastid genome of higher plants. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v. 5, p. 164-172, 2002.

MAYR, E. **Animal Species and Evolution**. The Belknap Press of Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 1963. 797 p.

MAYR, E. **Populações, Espécies e Evolução**. São Paulo: Nacional/EDUSP, 1977. 485 p.

McCAULEY, D. E. Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: Implications for studies of gene flow in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, p. 8127-8131, 1994.

METTLER, L. E.; GREGG, T. **Genética de Populações e Evolução**. São Paulo: Polígono/EDUSP, 1973. 262 p.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR – amplified microsattelites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 175-182, 1993.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed Chain reaction. **Methods in Enzymology**, London, v. 55, p. 335-350, 1987.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, New York, v. 403, p. 853-858, 2000.

NAVES, R. V. Armazenamento e estratificação de sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). In: REUNIÃO ESPECIAL DA SBPC, 1., 1994. Uberlândia. **Anais...** UFU/SBPC, 1994. p. 11.

NAVES, R. V. **Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás: caracterização e influências do clima e dos solos**. 1999 . 206 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 1999

NIELSEN, R. **MDIV** software. Disponível em: <http://www.biom.cornell.edu/Homepages/Rasmus_Nielsen/files.html>. Acesso em 09 fev. 2005.

NIELSEN, R. The molecular clock is gone but not forgoteen. **Trends in Genetics**, London, v. 15, n. 11, p. 442-443, 1999.

NIELSEN, R.; SLATKIN, M. Likelihood analysis of ongoing gene flow and historical association. **Evolution**, Lancaster, v. 54, p. 44-50, 2000.

NIELSEN, R.; WAKELEY, J.W. Distinguishing migration from isolation: an MCMC approach. **Genetics**, Austin, v. 158, p. 885-896, 2001.

NIKLAS, K. J. **The evolutionary biology of plants**. The University of Chicago press, Chicago, 1997. p. 447.

OLIVEIRA, P. E.; Fenologia e biologia reprodutiva das espécies do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. ed. **Cerrado ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998, p. 169-192.

OLIVEIRA, P. E. **The pollination and reproductive biology of a Cerrado woody community in Brazil**. 1991. 138 f. Thesis – PhD. Scotland: University of St. Andrews, St. Andrews, 1991.

OLMSTEAD, R.G.; PALMER, J. D. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, p. 1205-1224, 1994.

OHTA, N.; SATO, N.; NOZAKI, H.; KUROIWA, T. Analysis of the cluster of ribosomal protein genes in the plastid genome of a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: translocation of the *str* cluster as an early event in the rhodophytechromophyte lineage of plastid evolution. **Journal of Molecular Evolution**, New, York, v. 45, p. 688-695, 1997.

PADMA, P.; PRAMO, N. P.; THYAGARAJAN, S. P.; KHOSA, R. L. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, n. 61, p. 81-83, 1998.

PALMER, J. D. Plastid chromosomes: structure and evolution. In: BOGORAD, L.; VASIL, I. K. (Ed.). **Cell Culture and Somatic Genetics of Plant**, Molecular Biology of Plastids. eds. San Diego: Academic Press, 1991. v. 7A, p. 5-53.: Academic..

PALMER, J.D; NUGENT, J.M; HERBON, L. A.Unusual structure of geranium chloroplast DNA: a triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions, and two repeat families. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 84, p. 769-773, 1987.

PALMER, J. D.; JANSEN, R. K.; MICHAELS, H. J.; CHASE, M. W.; MANHART, J. R. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 75, p. 1180-1206, 1988.

PEREIRA, M. F. **Estrutura genética de populações de espécies arbóreas nativas do Cerrado encontradas em terrenos serpentínicos**. 2003. 64 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2003.

PICKETT, S. T. A.; WHITE, P. S. **The Ecology of Natural Disturbance and Patch Dynamics**. San Diego: Academic Press, 1985.

POWELL, W.; MACHRAY, G.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Sciences**, Oxford, v. 1, p. 215-222, 1996a.

POWELL, W.; MORGANTE, M. DOYLE. J.J.; McNICOL, J. W.; TINGEY, S. V.; RAFALSKY. A. J. Genepool variation in genus *Glycine* subgenus Soja revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites. **Genetics**, Austin, v. 144, p. 793-803, 1996b.

POWELL. W.; MORGANTE, M.; McDEVITT, R.; VENDRAMIN, G. G.; RAFALSKI, J. A. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, p. 7759-7763, 1995.

PRADO, D. E; GIBBS, P. E. Patterns of species distribution in the dry seasonal forests of South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 80, p. 902-927, 1993.

PRANCE, G. T. Phytogeographic support for the theory of Pleistocene forest refuges in the Amazon basin, based on evidence from distribution patterns in Caryocaraceae, Dichapetalaceae and Lecythidaceae. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 3, p. 5-29, 1973.

PROVAN, J.; CORBERTT, G.; McNICOLL, J. W.; POWEEL, W. Chloroplast DNA variability in wild and cultivated rice (*Oryza spp.*) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats. **Genome**, Ottawa, v. 40, p. 104-110, 1997.

PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P. M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 16, p. 142-147, 2001.

PROVAN, J.; SORANZO, N.; WILSON, N. J.; GOLDSTEIN, D. B.; POWELL, W. A. Low Mutation Rate for Chloroplast Microsatellites. **Genetics**, Austin, v. 153, p. 943-947, 1999b.

PROVAN, J.; SORANZO, N.; WILSON, N. J.; MCNICOL, J. W.; MORGANTE, M.; POWELL, W. The use of uniparentally inherited simple sequence repeat markers in plant population studies and systematics. In: HOLLINGSWORTH, P. M.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. (Eds.): **Molecular Systematics and Plant Evolution**. London: Taylor and Francis Limited, 1999a. p. 35-50.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; ATKINSON, R.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation II : comparison of the woody vegetation of 98 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 53, p. 153-180, 1996.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, London, v. 80, p. 223-230, 1997.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F. Biodiversity of the flora of the Cerrado. In: PEREIRA, R. C.; NASSER, L. C. B. (ed.). Anais (Proceedings of the VIII Simpósio sobre o Cerrado). **1st Internat. Symposium on Tropical Savannas**: Planaltina, DF, Brazil: EMBRAPA – CPAC, 1996. p. 3-6.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F.; DIAS, T. A. B.; SILVA, M. M. R. Distribuição das espécies lenhosas da fitofisionomia Cerrado sentido restrito nos estados compreendidos pelo bioma Cerrado. **Boletim do herbário Ezechias Paulo Heringer**, Brasília, v. 5. p. 5-43, 2000.

RATTER, J. A.; DARGIE, T. C. D. An analysis of the floristic composition of 26 cerrado áreas in Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, n. 49, v. 2, p. 235-250, 1992.

REED, D. H.; BRISCOE, D. A. FRANKHAM, R. Inbreeding and extinction: the effect of environmental stress and lineage. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 3, n. 3, p. 301-307, 2002.

REIS, A. C. S. Climatologia dos Cerrados. In: M.G. FERRI (ed.). **Simpósio Sobre o Cerrado**. Ed. Edgard Blucher Ltda. São Paulo, 1971. p. 15-25.

REIS, S. R. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* Martius)**. 1996. 210f. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas) - Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

REITH, M.; MUNHOLLAND, J. A high-resolution gene map of the chloroplast genome of the red alga *Porphyra purpurea*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 465-75, 1993.

RHOLF, F. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 2.10. New York: [s.n.], 2000. 38 p.

RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A.; JUNIOR, E. J. S.; FONSECA, C. E. L. **Araticum** (Série Frutas Nativas, 12). Jaboticabal: FUNEP, 2000. 52 p.

RIBEIRO, J. F. R.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomia do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 90-152.

RIZZINI, C. T. A flora do Cerrado, análise florística das savanas Centrais. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 1., 1962. São Paulo. **Anais...** São Paulo: EDUSP, 1963. p. 125-177.

RIZZINI, C. T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 3., 1971, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Edgar Blücher/Edusp, 1971. p. 61-64.

ROCHAIX, J. D. Chloroplast reverse genetics: new insights into the function of plastid genes. **Trends in Plant Sciences**, Oxford, v. 2, n. 11, p. 419-425, 1997.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. **DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods**. Disponível em <http://www.ub.es/dnasp/> - Acesso em 25 de maio de 2005.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: A Review. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 53, n. 2, p. 237-278, 1990.

SACCHERI, I. J.; WILSON, I. J.; NICHOLS, R. A.; BRUFORD, M. W.; BRAKEFIELD, P. M. Inbreeding of bottlenecked butterfly populations: estimation using the likelihood of changes in marker allele frequencies. **Genetics**, Austin, v. 151, p. 1053-1063, 1999.

SAKIYAMA, N. S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 204-206, 1993.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUCHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAITOU, N; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, A. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. Volatile constituents of fruits of *Annona glabra* L. from Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 13, p. 148-150, 1998.

SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A.; SUN, N. J.; CASSADY, J. M.; OLIVEIRA, A. B. Araticulin, a bis – Tetrahydrofuran Polyketide From *Annona Crassiflora* Seeds. **Phytochemistry**, New York, v. 42, n. 3, p. 705-707, 1996.

SCHNEIDER, S.; ROESLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin - v2.0: Documentation and Program**. Disponível em: <http://lgb.unige.ch/arlequin/>. Acesso em 20 de março de 2005.

SILVA, J. A.; SILVA, D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Coleta de sementes, produção de mudas e plantio de espécies frutíferas nativas dos cerrados: informações exploratórias**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1997. 24 p.

SLATKIN, M. Detecting small amounts of gene flow from phylogenies of alleles. **Genetics**, Austin, v. 121, p. 609-612, 1989.

SLATKIN, M.; MADDISON, W. P. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. **Genetics**, Austin, v. 123, p. 603-613, 1989.

SLATKIN, M. Cladistic Analysis of DNA Sequence Data from Subdivided Populations. In: REAL, L. A. (Ed.). **Ecological Genetics**, Princeton, New Jersey, 1994. p. 18-34.

SLATKIN, M. In defense of founder-flush theories of speciation. **American Naturalist**, Chicago, v. 147, n. 4, p. 493-505, 1996.

SNAYDON, R.W. Population responses to environmental disturbance. In: VAN ANDEL, J.; BAKKER, J. P.; SNAYDON, R. W. (ed.) **Disturbance in grasslands: Causes, effects and processes**. Hingham Massachusetts: Dr. W. Junk Publishers, 1987. p. 15-19.

SOKAL, R. R.; JACQUEZ, G. M.; WOOTEN, M. C. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection. **Genetics**, Austin, v. 121, p. 845-855, 1989.

STERN, D. B.; HIGGS, D. C.; YANG, J. Transcription and translation in chloroplasts. **Trends in plant science**, Oxford, v. 2, n. 8, p. 308-315, 1997.

SUGIURA, M.; HIROSE, T.; SUGITA, M. Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 32, p. 437-59, 1998.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 199-203, 2000.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 17, p. 1105-1109, 1991.

TAKAHATA, N.; NEI, M. Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. **Genetics**, Austin, v. 124, p. 967-978, 1990.

TAKAHATA, N.; SATTA, Y.; KLEIN, J. Divergence time and population size in the lineage leading to modern humans. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 48, p. 198-221, 1995.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, Austin, v. 123, p. 585-595, 1989.

TELLES, M.P.C.; VALVA, F.D.; BANDEIRA, F.L.; COELHO, A.S.C. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. – Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

TEMPLETON, A. R. The "Eve" hypothesis: A genetic critique and reanalysis. **American Anthropologist**, Lancaster, v. 95, p. 51-72, 1993.

TEMPLETON, A. R.; BOERWINKLE, E.; SING, C. F. A Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic, Theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics**, Austin, v. 117, p. 343-351, 1987.

TEMPLETON, A. R.; SING, C. F.; KESSLING, A.; HUMPHRIES, S. A Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. II. The analysis of natural populations. **Genetics**, Austin, v. 120, p. 1145-1154, 1988.

TOLEDO, F. R. N.; LOMBARDI, J. A. Observações acerca da predação de flores, frutos e sementes em *Annona crassiflora* e *Annona tomentosa* (Annonaceae). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSSISTEMAS FLORESTAIS, 4., 1996, Belo horizonte, MG. Forest 96. **Resumos**. Belo Horizonte: BIOSFERA, 1996. p. 330-331.

TOMIOKA, N.; SUGIURA, M. The complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 191, p. 46-50, 1983.

TREWICK, S. A.; MORGAN-RICHARDS, M.; RUSSELL, S. J.; HENDERSON, S.; RUMSEY, F. J.; PINTER, I.; BARRETT, A.; GIBBY, M.; VOGEL, J. C. Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 2003-2012, 2002.

TSUDZUKI, J.; NAKASHIMA, K.; TSUDZUKI, T.; HIRATSUKA, J.; SHIBATA, M. Chloroplast DNA of black pine retains a residual inverted repeat lacking rRNA genes: nucleotide sequences of *trnQ*, *trnK*, *psbA*, *trnI* and *trnH* and the absence of *rps16*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 232, p. 206-214, 1992.

WAKELEY, J. The coalescent in an island model of population subdivision with variation among demes. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 59, n. 133-144, 2001.

WEAVER, R. F.; HEDRICK, P. W. **Genetics**. Third edition. Wm. C. Brown Publishers. 632 p. 1997.

WEISING, K.; GARDNER, R. C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 9-19, 1999.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. **Dna Fingerprinting in plants and fungi**. First Edition. Arbor A (ed.). Boca Raton: CRC Press. Inc. 1995. 332 p.

WESTMAN, A. L.; KRESOVICH, S. Use of molecular marker techniques for description of plant genetic variation. In: CALLOW, J. A.; FORD-LOYD, B.V.; NEWBURY, H. J. (eds). **Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use**. Biotechnology in agriculture series, Wallingford, UK: CAB International; 1997. p. 9-48.

WOLFE, K. H.; Li, W. – H.; SHARP, P. M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant, mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 84, p. 9054-9058, 1987.

WOLFE, K. H.; MORDEN, C. W.; PALMER, J. D. Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 89, p. 10648-10652, 1992.

WOODWORTH, L. M.; MONTGOMERY, M. E.; BRISCOE, D. A.; FRANKHAM, R. Rapid genetic deterioration in captive populations: causes and conservation implications, **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 3, n. 3, p. 277-288, 2002.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian population. **Genetics**, Austin, v. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. Isolation by distance under diverse systems of mating. **Genetics**, Austin, v. 31, p. 39 - 59, 1946.

WU, J.; KRUTOVSKII, K. V.; STRAUSS, S. H. Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 893-908, 1999.

VAN DER HAMMEN, T. The Pleistocene changes of vegetation and climatic in tropical South América. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 1, p. 3-26, 1974.

VAN DER HAMMEN, T. Palaeocology of the Neotropics: an overview of the state of affairs. **Boletim IG – USP**, Publicação Especial, São Paulo, v. 8, p. 35-55, 1991.

YING-JUAN, SU.; TING, WANG.; BO, ZHENG.; YU, JIANG.; GUO-PEI, CHEN.; PU-YUE, OUYANG.; YU-FEI, SUN. Genetic differentiation of relictual populations of *Alsophila spinulosa* in southern China inferred from cpDNA *trnL* noncoding sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 34, p. 323-333, 2005.

ANEXO

Anexo 1. Gráficos representativos dos níveis de credibilidade associados aos valores dos parâmetros θ e tempo de divergência, entre pares de populações naturais de *A. crassiflora*.

