

## ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL INTRAPOPULACIONAL EM *ANNONA CRASSIFLORA* MART. (ANNONACEAE)

**GOUVEIA**, Felipe Oliveira <sup>12</sup>; **COLLEVATTI**, Rosane Garcia <sup>12</sup>; **TELLES**, Mariana Pires de Campos <sup>12</sup>; **BORBA**, Tereza Cristina de Oliveira <sup>3</sup>; **SOARES**, Thannya Nascimento <sup>12</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética & Biodiversidade.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia & Evolução UFG

<sup>3</sup> Laboratório de Biotecnologia – Embrapa Arroz e Feijão

[lipegouveia@hotmail.com](mailto:lipegouveia@hotmail.com)

Apoio financeiro: CAPES, PRONEX/CNPq/FAPEG.

### INTRODUÇÃO

A documentação na literatura sobre dispersão espacialmente restrita, para um grande número de espécies vegetais, levou à predição de que populações de plantas estariam freqüentemente subdivididas geneticamente em uma escala local, como resultado da deriva genética local e do sistema reprodutivo (Wright 1943, Levin & Kerster 1974).

Assim, mesmo em grandes populações, formam-se padrões espaciais contínuos nas variáveis que respondem a esses processos. Esses processos associados ao componente histórico de diferenciação de linhagens no tempo e aos padrões de interação entre os indivíduos também tendem a produzir pequenas populações locais (Demes), parcialmente isoladas e que se diferenciam geneticamente ao longo do tempo (Diniz-Filho 1998).

*Annona crassiflora* (Annonaceae) é uma árvore hermafrodita e alógama (Manica et al., 2003). A polinização ineficiente é um fator que limita a frutificação da família das anonáceas, sendo realizada por besouros do gênero *Cyclocephala* (Scarabeidae: Dynastinae). A dispersão de sementes é do tipo zoocórica, realizada principalmente por mamíferos de grande porte como *Tapirus terrestris*, essa espécie é particularmente importante na estrutura ecológica de várias espécies de plantas, porque pode distribuir variedade e grande quantidade de sementes, portando-se muitas vezes como espécie-chave para a manutenção dessa estrutura ecológica do ecossistema (Bodmer, 1991).

A caracterização dos níveis de variabilidade e estruturação genética, bem como o entendimento da dinâmica de movimentação de alelos em populações

naturais de *A. crassiflora* fornecerá subsídios para a auxiliar nas estratégias de conservação e manejo da espécie. Sendo assim, um estudo de suma importância para plantas endêmicas do Cerrado, uma vez que o araticunzeiro apresenta problemas com a baixa taxa de frutificação necessitando ser melhor estudada.

O objetivo desse estudo foi estimar o nível de diversidade genética e a estrutura genética espacial dentro de uma população de *A. crassiflora*.

## METODOLOGIA

A coleta de 104 indivíduos de araticum (*A. crassiflora*) foi realizada na estação ecológica de Águas Emendadas situada ao noroeste do Distrito Federal. Essa estação é uma unidade de conservação de proteção integral destinada a proteção do ambiente natural e pelo seu excelente estado de conservação dos ecossistemas foi declarada em 1992 pela UNESCO como umas das áreas que compõe a área nuclear da Reserva da Biosfera do Cerrado. A coleta dos indivíduos foi do tipo varredura e a área escolhida é uma típica região de ocorrência de araticum (campo aberto).

A extração de DNA das plantas foi feita a partir de folhas utilizando o detergente CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) de acordo com o protocolo descrito em Ferreira & Grattapaglia (1998). A concentração de DNA das amostras dos indivíduos foi estimada pela comparação com uma amostra de DNA de concentração conhecida em gel de agarose 1%, em TBE 1X, estimando-se a concentração de DNA por  $\mu\text{L}$  DNA extraído. O DNA extraído de cada planta foi diluído à concentração de 2,5 ng/ $\mu\text{L}$ , para as reações de PCR utilizando locos microssatélites.

A análise preliminar e detecção de polimorfismo foi realizada em gel desnaturante de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. Nesta etapa foram utilizados três indivíduos para testar 10 marcadores microssatélites.

Após a verificação do padrão de amplificação dos locos, amostras com 16 indivíduos foram submetidas ao analisador de fragmentos ABI-3100 (Applied Biosystems) para a montagem de multiplexes e em seguida com o restante da população (Pereira et al.2008).

Os locos foram analisados no seqüenciador automático ABI-3100 (Applied Biosystems) constituindo de um volume final de 10  $\mu\text{L}$  contendo: 2 $\mu\text{L}$  do produto da reação de amplificação, 0,5  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (*ladder*) marcado

com fluorocromo ROX, e 7,5  $\mu$ L de formamida Hi-Di. Essa mistura foi submetida à desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida resfriamento imediato a 0°C e submetida à análise pelo equipamento ABI-3100.

A partir da matriz dos genótipos de locos microssatélites foram estimados os parâmetros genéticos com base no teorema do Equilíbrio de Hardy-Weinberg: Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) o índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ) e o teste de desequilíbrio de ligação utilizando o programa FSTAT. A análise de autocorrelação espacial foi realizada a partir do cálculo do coeficiente  $I$  de Moran por loco ao longo de 10 classes de distância geográfica com mesma dimensão (29 m). A significância dos parâmetros foi testada com a realização de 1000 permutações determinando-se um intervalo de confiança de 95%. Os valores obtidos foram representados graficamente em um correlograma.

Também foi estimado o índice de agregação ( $R$ ) intrapopulacional. Esse índice de agregação, baseado no índice  $R$  estimado para diferentes classes de distância permite a inferência do padrão espacial das árvores na população. Os valores de  $R$  indicam:  $<1$ , distribuição agregada;  $>1$ , distribuição regular. Estes parâmetros foram gerados no software SGS (Degen 2000)

## RESULTADOS

Até o presente momento foram padronizado 5 locos microssatélites e as temperaturas de anelamento variaram de 58°C a 60°C. Os locos apresentaram entre 6 e 18 alelos, considerando sua natureza multialélica este representa um resultado esperado para espécies arbóreas do Cerrado (Collevatti et al., 2001; Zucchi et al., 2003)

Os valores de heterozigosidade observada variaram de 0,5385 a 0,9756 e esperada de 0,5150 a 0,8243 indicando que a população não apresenta desvios significativos quanto às proporções genótípicas esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,01$ ). Conseqüentemente, nenhum valor de  $f$  apresentou-se significativo (Tabela 1).

O teste de desequilíbrio de ligação mostrou que os locos Acr10 e Acr19 apresentam-se ligados ( $p = 0,005$ ) e o restante dos locos avaliados segregam independentemente não fornecendo informações redundantes ( $p > 0,005$ ). O índice de agregação ( $R$ ) foi igual a 0,729 indicando que as plantas apresentam distribuição agregada na população.

A análise de autocorrelação espacial revelou que a variabilidade genética existente nesta população não está estruturada espacialmente, uma vez que não foi verificado valores significativos para as dez classes de distância do correlograma. Os resultados encontrados neste estudo são compatíveis com os esperados para populações preservadas, livres de fatores que possam limitar o fluxo gênico entre plantas (Figura 1).

É importante ressaltar que embora a amostragem de indivíduos tenha sido adequada para a realização deste estudo é necessário que se amplie a quantidade de locos avaliados. Além disso, é importante realizar o mesmo estudo em uma área não preservada para entender a dinâmica das populações nos fragmentos visto que a destruição de habitats e a conseqüente fragmentação de populações naturais podem acarretar resposta diferente da observada no presente estudo.

## CONCLUSÃO

A população estudada é proveniente de uma área de conservação que, pelo o que indica este estudo, preserva as características necessárias para uma boa interação entre *A. crassiflora* com seus dispersores e polinizadores, o que aumenta a sua probabilidade de persistência evolutiva. Este resultado é bastante otimista e coloca esta população como parâmetro para a comparação com populações de outras áreas, quanto à presença de estrutura genética espacial com base em marcadores microssatélites.

## REFERÊNCIAS

- Bodmer, R.E. 1991. **Strategies of seed dispersal and seed predation in amazonian ungulates.**
- Cavers, S.; Degen, B.; Caron, H.; Lemes, M.R.; Margis, R.; Salgueiro, F.; Lowe, A.J. **Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations.** *Heredity*, v. 95, p. 281–289, 2005.
- Collevatti, R. G.; Grattapaglia, D.; Hay, J. D. **Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci.** *Molecular Ecology*, Oxford, n. 10, p. 349-356, 2001.
- Diniz-Filho, J. A. F.; Telles, M. P. C. **Spatial autocorrelation analysis and the identification of operational units for conservation in continuous populations.** *Conservation Biology*, v. 16, n. 4, p. 924-935, 2002.

Levin, D.A. & Kerster, H.W. 1974. **Gene flow in seed plants**. Evolutionary Biology 7:139-230

Manica, I.; Icuma, I. M.; Junqueira, K. P.; Oliveira, M. A. S.; Cunha, M. M. da; Oliveira Jr, M. E. de; Junqueira, N. T. V.; ALVES, R. T. **Frutas Annonáceas: ata ou pinha, atemóia, cherimóia e graviola**. Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado. Porto Alegre-RS: Editora Cinco Continentes, 2003. 596 p.

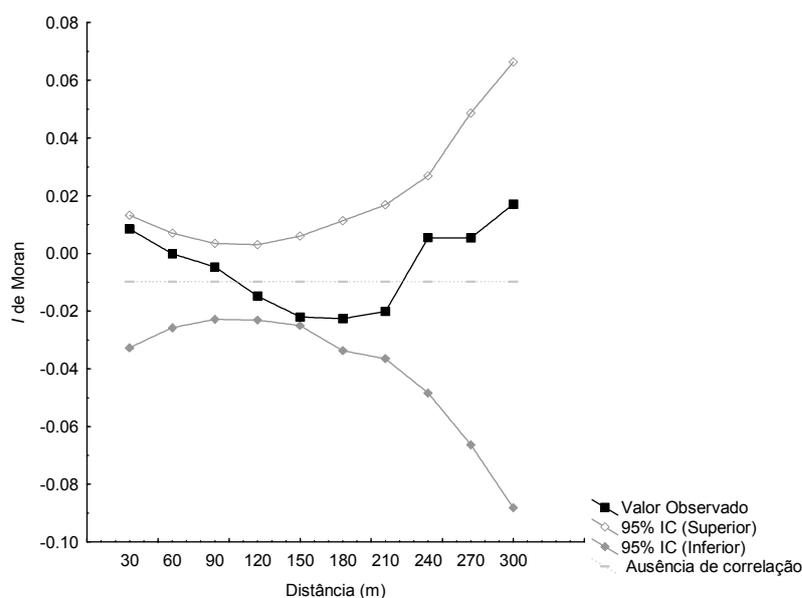
Wright, S. 1943. **Isolation by distance**. Genetics 28:114-138.

**Tabela 1.** Parâmetros de diversidade genética de *Annona crassiflora* estimados com base em cinco marcadores microsatélites mostrando a seqüência *forward* e *reverse*, a temperatura de anelamento (TA), número de alelos (NA), heterozigosidade esperada e observada (He e Ho) e o índice de fixação intrapopulacional *f*.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	TA	NA	He	Ho	<i>f</i>
Acr01	F: GGCCTTCAAAGGGAGATA	58	14	0,6120	0,5397	0,1290
	R: CATGATTCTTCTGCTTCTGTGG					
Acr26	F: CACGACCAAGGAGAGAGGAG	58	6	0,7806	0,5395	-0,1890
	R: GGCAACAATCCTGACTCACA					
Acr10	F: TGACGAAAACGAGAAAAGCA	58	6	0,5150	0,5784	0,0130
	R: ATGTCCCAACCAATACAT					
Acr19	F: GAGAGCTGGGAGAAGAGCAA	58	12	0,7046	0,6931	0,0480
	R: AAAGCTGGGAGAGACGACAC					
Acr22	F: CTGACTCGCTGGCTCTCTCT	60	18	0,8243	0,9756	-0,001
	R: CTACAGCCCACATGTGCAAC					

**Tabela 2.** Nível de significância (p valor) obtido pelo teste de desequilíbrio de ligação nos 5 locos analisados (nível de significância 0,005 corrigido por Bonferroni para  $\alpha$  5%).

	Acr1	Acr26	Acr10	Acr19	Acr22
<b>Acr1</b>	-				
<b>Acr26</b>	0,035	-			
<b>Acr10</b>	0,015	0,435	-		
<b>Acr19</b>	0,080	0,280	0,005	-	
<b>Acr22</b>	0,115	0,750	0,290	0,175	-



**Figura 1.** Correlograma do índice de Moran para os cinco locos ao longo das classes de distancia. As linhas em cinza inferior e superior indicam o intervalo de confiança (95%, 1000 permutações) e a reta entre elas a ausência de correlação (-0,0097).