UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CLAUDEMIR RODRIGUES DIAS FILHO

"Alterações na variabilidade genética de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae)"

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento Genético.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Roberto Martins

Campinas, 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

D543a

Dias Filho, Claudemir Rodrigues
Alterações na variabilidade genética de *Euterpe edulis* Mart / Claudemir Rodrigues Dias Filho. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Vera Nisaka Solferini.
Co-orientador: Fernando Roberto Martins.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Microssatélites (Genética). 2. Isoenzimas. 3. Efeito Wahlund temporal. 4. Plantas - Ontogenia. 5. *Euterpe edulis*. I. Solferini, Vera Nisaka. II. Martins, Fernando Roberto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Gene diversity variation in *Euterpe edulis* Mart.
Palavras-chave em inglês: Microsatellites (Genetics); Isoenzymes; Temporal Wahlund effect; Plants - Ontogeny; *Euterpe edulis*.
Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.
Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.
Banca examinadora: Vera Nisaka Solferini, Louis Bernard Klaczko, Maria Imaculada Zucchi.
Data da defesa: 17/05/2006.

Campinas, 17 de maio de 2006

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini (Orientadora)

Assinatura

Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko

Assinatura

Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi

Assinatura

Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Russo Matioli

Assinatura

Índice

página

Agradecimentos.....5

Introdução.....9

Sobre a espécie e alguns estudos.....10

Capítulo 1: Diferenças na composição genética entre indivíduos de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) de áreas secas e úmidas, claras e escuras.....13

- Resumo.....14
- Introdução.....15
- Material e Métodos.....16
  - Local de estudo.....16
  - Coletas.....17
  - Sistemas alozímicos utilizados e genotipagem.....18
  - Extração do DNA genômico e genotipagem dos locos de microssatélites.....20
  - Análise dos resultados.....21
- Resultados.....22
  - Umidade.....22
  - Luminosidade.....23
- Discussão.....24
- Conclusão.....26

Capítulo 2: Alterações na variabilidade genética ao longo dos estádios ontogenéticos de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) 27

- Resumo.....28
- Introdução.....29
- Material e Métodos.....31
  - Local de estudo.....31
  - Coletas.....31
  - Sistemas alozímicos e microssatélites utilizados.....32
  - Estimativas e análise dos dados.....32
- Resultados.....33
  - Marcadores alozímicos.....33
  - Marcadores microssatélites.....35
- Discussão.....38
- Conclusão.....42

Conclusões Gerais.....43

Literatura Consultada.....44

Anexos.....53-56

Agradecimentos

É constante em nosso dia-a-dia o agradecer. Sim, por incrível que pareça é verdade. Se espera alguém dizer “obrigado” para computar um agradecimento deve estar duvidando que o agradecer seja tão constante assim. Esclareço: eis que para agradecer alguém não precisamos necessariamente usar as palavras “obrigado”, “grato” ou “agradecido”. Um olhar, um sorriso, um gesto, um aperto de mão são rotineiramente suficientes para nos fazermos entender o quanto somos gratos. Aposto que a grande maioria das pessoas que citarei a seguir já sabem o quanto sou grato pelo apoio concedido nos últimos anos das mais variadas formas. Entretanto, como o fato deve ser escrito, devo transformar minha gratidão em vocábulo. E isso é bom, pois deixa registrado meu agradecer em papel. Nossas mentes, por mais sãs e duradouras que possam ser, ora esquecem, e quando isso ocorrer cá estará um bom lembrete.

Por onde devo começar. Pelo começo, óbvio. É fato que todo fim é um novo começo: com o fim do mestrado inicio uma nova fase em minha vida. Mas não é desse começo que estou falando, e sim do começo de minha existência. Assim, agradeço a meus pais, meus irmãos, minha família por terem acreditado em meu potencial antes mesmo de eu descobri-lo. Pelo apoio e companhia sincera dessas pessoas também devo registrar minha gratidão.

Não menos importantes foram aqueles que lapidaram esse potencial. Professores que souberam aguçar minha curiosidade e direcionar meu raciocínio farto e desordenado desde a graduação. Impossível deixar de citar o nome do Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko e da Profa. Dra. Vera Nisaka Soferini, professores estes que primeiramente me apresentaram a genética de populações de forma apaixonante e encorajadora.

Destes, devo salientar o agradecer aos meus orientadores, Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini e Prof. Dr. Fernando Roberto Martins, por motivos que vão muito além da orientação. Inicialmente, devo agradecê-los por terem me oferecido a “pílula vermelha”, dando-me a oportunidade de explorar o que estava por traz dessas nobres palmeiras. Em seguida, por toda a orientação e persistência em me instruir. Depois, pela amizade, pela confiança e pelas conversas descompromissadas.

Àqueles com quem convivi dentro do Laboratório de Diversidade Genética, além da gratidão, deixo minhas congratulações pela paciência, pela genialidade, pelo dom da descontração e pelo convívio harmônico propriamente dito. São eles: Juliana José, Aluana Abreu, Sônia Andrade, Evandro Moraes, Suzana Alcântara, Flávio Ramos, Gustavo Dias, Karina Brandão, Renato Rogner, Horácio Montenegro, Flávia Füchs, Tereza Grombone, Teresa Almeida, Maína Bertagna, Joice Machado, Bruno Udelsman, Fabio Silva, Kaiser Schwarcz e Camila Macrini.

Àqueles que prezo por um sentimento fiel de afeição, ternura ou estima, agradeço pelo apreço. Elogio, portanto, meus amigos. Me fazendo crescer diariamente, seria o menor dos mínimos que poderia ser feito pela amizade dessas pessoas. Agradeço a convivência dos que dividem o mesmo teto comigo, os que já dividiram e os que só não dividiram por questões meramente formais. Apresento aqui o nome de alguns deles, deixando assim o registro de minha gratidão: Taís Mazzola, Priscila Cortez, Andréa Borges, Priscila Carrara, Rafael de Andrade, Marcos Túlio de Oliveira, Márcio Lorencini, Fábio Dias, Plínio Morita, entre outros...

À minha companheira, Andréa Borges, pela compreensão incessante, pela companhia constante, pelo carinho indispensável. Cuidando de quem vos escreve, as mãos dessa mulher puderam afagar e acalmar a mim nos momentos de desespero e afobação momentâneos normais da labuta laboratorial.

Como melhor amigo do homem, não seria demais agradecer a um cão. Dessa maneira, como não poderia deixar de ser, agradeço meu labrador Edge pelos momentos de descontração e orgulho que ele tem me proporcionado nos últimos anos.

O que seria deste projeto se não fosse a Fundação Mary Brown? A resposta é deveras incerta. Assim, sou grato aos assessores desta fundação e ao seu responsável, Prof. Dr. Keith Brown pela confiança, na concessão de bolsa. Este projeto também recebeu recursos da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 04/09742-0) e do Fundo de Apoio a Ensino e Pesquisa (FAEP – processo 700/04), órgãos os quais devo agradecer pelo apoio.

Não há como deixar de mencionar meu sincero apreço aos membros das bancas prévia e examinadora pelo aceite em participar dessas etapas do processo de obtenção do título de mestre e pelas valorosas sugestões e críticas já fornecidas e futuras.

E como o que faz o barco andar não é a vela enfunada, e sim o vento que ninguém vê, passo a agradecer aqueles que, de forma críptica, contribuíram para o conclusão desse trabalho. Então agradeço as faxineiras do Departamento de Genética e Evolução, os técnicos de laboratório, os funcionários do Instituto de Biologia, a secretaria de pós-graduação na figura da secretaria Maria de Lourdes Fagundes, a coordenadora do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Profa. Anete Pereira de Souza e os representantes discentes Luís Antonio Peroni, Mariana Lira (ex) e Prianda Laborda.

À quem agradeço, dedico

Introdução

Estudos populacionais de plantas deixam cada vez mais evidente que elas não apresentam uma distribuição genotípica aleatória, mas sim algum padrão de estruturação genética (Hamrick 1982, Husband & Barrett 1996, Godoy & Jordano 2001). Esta estruturação pode se manifestar entre populações geograficamente distintas, dentro de um grupo local de plantas ou mesmo na progênie de indivíduos (Loveless & Hamrick 1984). Uma estruturação genética espacial pode existir quando certos alelos ou genótipos se apresentam distribuídos de maneira espacialmente agregada. Por outro lado, uma estruturação genética temporal pode ocorrer entre classes de idade (Hamrick 1982, Silvertown & Doust 1993, Loveless & Hamrick 1984).

A estruturação genética espacial pode ser causada por diversos fatores, como adaptação a micro-habitats e clines. A adaptação a ambientes específicos é característica de populações de plantas e sua existência poderia levar a uma distribuição agregada de alelos ou de genótipos dentro de uma população (Hamrick 1982, Silvertown & Doust 1993). Já em clines (Hartl & Clark 1997), os valores adaptativos dos genótipos variam geograficamente de acordo com uma variação gradual do ambiente. Existe também a chance de ocorrer agrupamento de genótipos semelhantes em áreas que foram recentemente colonizadas (Silvertown & Doust 1993), ou seja, efeito fundador e gargalos populacionais podem causar agregação espacial de indivíduos geneticamente similares.

Uma terceira causa de estruturação genética espacial de plantas se relaciona ao pequeno tamanho efetivo das populações devido à limitação nos processos de dispersão de pólen e sementes (Husband & Barrett 1996, Loveless & Hamrick 1984). Fatores ecológicos ligados à reprodução e à dispersão têm um papel preponderante neste caso. Um dos mais conceituados modelos de como uma subdivisão ocorre dentro de uma população grande e aleatoriamente distribuída é o do isolamento por distância desenvolvido por Wright (1969). Este modelo se baseia no fato de que a probabilidade de dois indivíduos se cruzarem é dependente da distância física entre eles ou da variância de dispersão de seus propágulos. Isto teria como conseqüência a vizinhança de indivíduos aparentados, acarretando redução do tamanho efetivo da população

(Wright 1969, Silvertown & Doust 1993, Loveless & Hamrick 1984). Tais eventos parecem ser bastante comuns em populações vegetais, inclusive em árvores florestais (Linhart *et al* 1981).

A estruturação genética temporal também pode ter várias causas. Mudanças ambientais freqüentes poderiam levar a diferenças genéticas significativas entre classes etárias. Além disso, a ecologia reprodutiva e o estabelecimento individual também são fatores importantes para a estruturação temporal (Hamrick 1982, Loveless & Hamrick 1984, Silvertown & Doust 1993). Se poucas plantas parentais contribuem para a progênie, isso pode acarretar em uma significativa heterogeneidade tanto espacial, quanto temporal (Hamrick 1982).

Existem muitos outros fatores que poderiam levar à estruturação genética de uma população, como a morfologia floral, a forma de reprodução, a ausência de dormência das sementes, o ciclo de vida, o sincronismo do período de reprodução dos indivíduos, o tamanho e a densidade da população, entre outros (Loveless & Hamrick 1984). Assim, o sistema de reprodução não só é um importante fator de organização de variabilidade genética (Loveless & Hamrick 1984), como também é a mais importante característica para a sua interpretação (Hamrick 1982, Borba *et al.* 2001).

Estudos referentes à variação genética temporal em populações naturais apresentam muitas dificuldades. Muitas plantas perenes apresentam fases do ciclo de vida distintas, chamadas de estádios ontogenéticos, que ocorrem lado a lado nas populações naturais (Gatsuk *et al.*1980, Carvalho *et al*. 1999). Deste modo, estudos temporais seriam facilitados em plantas, uma vez que a coleta de diferentes estádios ontogenéticos seria simplificada e simultânea.

Sobre a espécie e alguns estudos

Nativa da Mata Atlântica, *Euterpe edulis* é uma palmeira de estipe único que atinge de 10 a 20 m de altura e de 8 a 20 cm de diâmetro do caule à altura do peito. Quando adulta, apresenta de 10 a 20 folhas alternas e pinadas, agrupadas no ápice da planta (Reitz *et al.* 1978). É uma espécie

monóica com inflorescências em forma de espádice de 50 a 70 cm de comprimento. As flores são unisexuadas e agrupadas em tríades, sendo uma feminina e duas masculinas. Segundo Mantovani & Morellato (2000), suas inflorescências apresentam protandria acentuada, as flores masculinas permanecem abertas por volta de sete dias e, após um intervalo de dois a quatro dias, abrem-se as flores femininas também por cerca de sete dias. As inflorescências são visitadas por muitos insetos (Reis *et al.* 1993, Mantovani & Morellato 2000), sendo muito freqüente a presença da abelha *Trigona spinipes* nas flores e, por isso, a espécie tem sido apontada como importante polinizador do palmiteiro (Reis *et al.* 2000b).

Devido à sua importância econômica e às ameaças à conservação, muitos estudos têm sido desenvolvidos em *Euterpe edulis*. Alguns trabalhos foram feitos envolvendo estudos populacionais e variabilidade genética desta espécie (Conte *et al.* 2003, Gaiotto 2001, Silva 1991, Reis *et al.* 2000a e b, Matos *et al.* 1999, Reis 1995, Ballvé 1988). Silva (1991) observou que, antes de tornar-se adulta, isto é, madura reprodutivamente, a planta passa por estádios ontogenéticos, que foram denominados plântula, jovem I, jovem II e imaturo, e que ocorre uma diminuição progressiva da densidade de indivíduos desde o estádio de plântula até o de adulto (tabela 1). Num trecho da floresta ombrófila densa da encosta atlântica em Santa Catarina, Reis (1995) encontrou resultados semelhantes: a proporção de cada estádio ontogenético na população diminuía progressivamente a partir de plântulas e os adultos representavam apenas 0,17% da população total (figura 1).

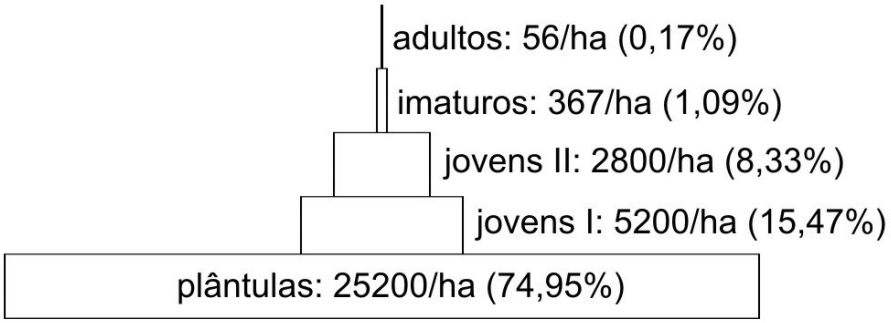

Figura 1: Pirâmide numérica de indivíduos de *E. edulis* até a fase adulta (adaptado de Reis 1995).

Tabela 1: Número médio de plantas por área (25 m^2) do palmiteiro *Euterpe edulis* na Reserva Municipal de Santa Genebra, Campinas, SP (adaptado de Silva 1991).

	Plântulas	***Jovens***	***Imaturos***	***Adultos***
Área seca	22,20	5,70	0,10	0,03
(%)	79,20	20,34	0,36	0,11
Área pouco úmida	15,40	5,30	0,19	0,19
(%)	73,06	25,14	0,90	0,90
Área úmida	45,50	8,00	0,30	0,70
(%)	83,49	14,68	0,55	1,28
Área muito úmida	93,70	8,60	0,90	1,50
(%)	89,49	8,21	0,86	1,43
Área alagada	214,50	14,10	2,10	2,00
(%)	92,18	6,06	0,90	0,86

Reis *et al.* (2000a) realizaram um estudo comparativo em populações naturais de *E. edulis*. Os baixos valores de F_{ST} encontrados indicaram uma reduzida divergência genética entre as populações estudadas. Já a avaliação das freqüências gênicas e a análise de agrupamento se adequaram ao modelo de isolamento por distância proposto por Wright (1969), pois revelaram maior divergência entre populações mais distantes. Os resultados desse trabalho indicam também um excesso de heterozigotos nos indivíduos adultos. Reis *et al.* (2000a) sugerem que estes resultados, associados aos de Silva (1991) e de Reis (1995), indicam a ocorrência de seleção a favor do heterozigoto.

Capítulo 1

Diferenças na composição genética entre indivíduos de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) de áreas secas e úmidas, claras e escuras

Resumo

Alguns trabalhos têm descrito relações e associações entre características ambientais e freqüências alélicas em locos alozímicos, ocorridas em ambientes heterogêneos ou com regimes restritivos antagônicos. A floresta paludícola, ambiente em que *E. edulis* ocorre, é caracterizada por um mosaico micro-ambiental em que variam o teor hídrico do solo e a luz. As sementes dessa espécie só germinam em ambientes úmidos e os juvenis só recrutam na presença de luminosidade. Utilizamos marcadores alozímicos e microssatélites (SSR) para comparar indivíduos de áreas secas e úmidas, e de áreas claras e escuras. Para esta última comparação, os indivíduos foram subdivididos em duas classes: estabelecidos (com estipe aéreo) e não estabelecidos (sem estipe aéreo). Cinco classes de luminosidade foram comparadas entre si, correlacionando par-a-par as diferenças de luminosidade e seus θs por meio de análise de correlação. Dos quarenta locos analisados, apenas um loco alozímico apresentou-se moderadamente estruturado entre as classes de umidade (θ = 0,058) e outros cinco levemente estruturados ($\theta \leq 0,050$). Um loco mostrou-se moderadamente estruturado ($\theta > 0,050$) entre os estabelecidos e outro entre os não estabelecidos. Quatro locos apresentaram estruturação leve entre os não estabelecidos e um entre os estabelecidos. Os valores de θ foram maiores entre os estabelecidos. Não houve diferenciação entre os locos SSR e não houve correlação entre diferenças de luminosidade e θs. Tais resultados são bastante próximos do esperado, pois sendo a umidade importante para a germinação dessa espécie, então não deveriam existir diferenças entre os indivíduos de locais secos e úmidos, uma vez que todos já germinaram. De fato, a maioria dos locos não mostrou diferenças pelo θ. Quanto à luminosidade, sendo ela importante para o recrutamento, os indivíduos estabelecidos em áreas claras e escuras apresentaram locos mais estruturados, enquanto os ainda não estabelecidos apresentaram locos menos estruturados. Assim, fatores de restrição ambiental abióticos, como luz e água, podem estar ligados às freqüências gênicas de diferentes marcadores dessa espécie.

Palavras-chave: *Euterpe edulis*, umidade, luminosidade, alozima, microssatélites

Introdução

Alguns trabalhos têm relatado indícios de seleção natural em locos alozímicos (Richmond & Powell 1970, Bergmann & Ruetz 1991, Eanes 1999, Murren 2003). Uma fração deles relaciona características ambientais a freqüências alélicas em locos alozímicos (Hamrick *et al.* 1979, Hamrick & Godt 1989), descrevendo uma associação entre estes (Hamrick & Allard 1972, Clegg & Allard 1972, Loveless & Hamrick 1984).

Em *Euterpe edulis*, Reis (1996) relaciona variações nas freqüências alélicas a um gradiente altitudinal, não encontrando relação consistente na maior parte dos marcadores. Outros trabalhos sugerem a ocorrência de seleção nesta espécie (Reis *et al.* 2000a, Conte *et al.* 2003, Conte 2004) potencialmente relacionada à heterogeneidade microgeográfica. Tal fenômeno pode acontecer em ambientes em que os regimes de restrição micro-ambiental formam um mosaico (Spieth 1979, Templeton & Levin 1979, Frankham *et al.* 2003), como é o caso de áreas florestais brejosas (Klinge *et al*. 1990, Joly 1991, Souza & Martins 2005), locais nos quais o palmiteiro ocorre (Dias *et al.* 1987).

Tendo em vista o sucesso de sementes ou de plântulas, é possível distinguir duas categorias de restrições ambientais: fatores pré-germinativos e pós-germinativos. Como exemplo de fator pré-germinativo pode-se citar o dessecamento ao qual as sementes estão sujeitas logo após serem dispersas. Já como um fator pós-germinativo, cita-se a intensidade luminosa à qual os indivíduos mais jovens têm acesso.

Sabe-se que sementes de *E. edulis* têm sua viabilidade significativamente reduzida se seu teor de umidade for inferior a 28% (Reis *et al.* 1999). Brochado (2003) relata que apenas 12% das sementes germinam após perder 30% da massa fresca, ocorrendo perda total de viabilidade ao reduzir essa perda em 40%. Tais características confirmam que o palmiteiro apresenta sementes recalcitrantes, isto é, inviabilizam-se após desidratação a partir de um valor crítico (Baskin & Baskin 1998), e sugerem uma variação da capacidade germinativa. Essa variação pode estar relacionada à variação genética das sementes dessa espécie.

Quanto à luminosidade, estudos indicaram melhor desenvolvimento de *E. edulis* em moderadas intensidades de luz (entre 20% e 70% de luminosidade relativa); menores taxas de crescimento, menor biomassa, menor razão raiz/parte aérea, entre outras anomalias, foram observadas quando a luminosidade relativa foi menor que 6% (Nakazono *et al*. 2001). Segundo Reitz *et al*. (1978) e Klein (1980), esta espécie necessita de sombra para o desenvolvimento inicial, o que a caracterizaria como uma espécie de sombra, mas recruta após aumento da intensidade luminosa (Leão & Cardoso 1974, Bovi *et al.* 1987). É possível que indivíduos estabelecidos em áreas mais claras difiram geneticamente daqueles estabelecidos em áreas com menor luminosidade.

Então, se existe algum tipo de seleção em *E. edulis,* ela pode estar relacionada à umidade (pré-germinativa) ou à luminosidade (pós-germinativa). De posse desse conhecimento, o presente capítulo tem por objetivo testar:

1) Se a umidade funciona como fator seletivo para a germinação de *E. edulis*, diferenças nas freqüências alélicas entre indivíduos de locais úmidos e secos não devem existir, uma vez que todos já germinaram.

2) Se a luminosidade age como fator de seleção para o estabelecimento, deve haver diferenças entre indivíduos estabelecidos no escuro e no claro.

Material e Métodos

Local de estudo

A Reserva Municipal de Santa Genebra (22°48'34''-50'13''S e 47°06'15''-07'33''W) localiza-se no distrito de Barão Geraldo, município de Campinas, estado de São Paulo e tem cerca de 250 ha, em que predomina a floresta mesófila semidecídua, ocorrendo também a floresta paludícola em 15% da área (Leitão-Filho 1995). A temperatura média anual é de 20,3°C (22,7°C no verão e

17,4°C no inverno) e a precipitação média anual é de 1409,5 mm, sendo os períodos mais chuvosos a primavera e o verão (Mello *et al.* 1994). O relevo regional é predominantemente suave ondulado a ondulado, com colinas suavizadas de declives inferiores a 7% (Oliveira *et al.* 1979). Na Reserva, as altitudes variam de ca. 585 a 616 m (Estado de São Paulo 1981) e o relevo é predominantemente plano a suave ondulado. Na área paludosa, o relevo é ondulado, com declividade variando de 6 a 9% (Jener F. L. Moraes[1], comunicação pessoal). O solo da floresta paludícola classifica-se como Glei Pouco Húmico eutrófico textura média a argilosa (Unithal[2]/Hélio do Prado[3], comunicação pessoal).

Coletas

As coletas foram realizadas na região brejosa, em uma área delimitada por eixos ortogonais de 100 x 100 m (1 ha) já utilizada por outros estudos (Silva 1991, Alves 1994, Carvalho *et al.* 1999, Souza & Martins 2005, entre outros), na região da nascente do Córrego do Quilombo, na Reserva Municipal da Mata de Santa Genebra. O hectare está subdividido em 400 parcelas de 5 x 5 m, as quais foram medidas em termos de luminosidade e disponibilidade hídrica.

A luminosidade foi medida em cada parcela através da porcentagem de abertura de dossel. A abertura do dossel em cada parcela foi estimada utilizando um densiômetro esférico (Lemmon 1957). Quatro medidas foram tomadas por parcela em quatro direções diferentes a cerca de 1,30 m do solo. A média das quatro medidas foi utilizada como a abertura do dossel em cada parcela. Parcelas com abertura de dossel menor que 13% foram consideradas escuras, enquanto parcelas com medidas maiores ou iguais a 13% foram consideradas claras.

Cada parcela foi subdividida em quatro sub-parcelas iguais de 2,5 x 2,5 m. Tais sub-parcelas foram classificadas em secas ou úmidas. Uma sub-parcela foi considerada seca quando o solo em seu centro estivesse seco e não houvesse emersão de água ao pressioná-lo. Foram consideradas úmidas as sub-parcelas que se apresentavam submersas, com solo umedecido ou com emersão de

[1] Pesquisador Científico, Centro de Solos e Recursos Agroambientais, Instituto Agronômico.
[2] Laboratório Agroquímico, Campinas, SP.
[3] Pesquisador Científico, Centro de Solos e Recursos Agroambientais, Instituto Agronômico.

água quando pressionado. Parcelas com até uma sub-parcela seca foram consideradas úmidas, ou seja, as parcelas úmidas foram assim classificadas por terem até 25% de sua área seca. Já parcelas que apresentavam duas ou mais sub-parcelas secas foram classificadas como secas (mais de 25% da área seca).

Para as análises de luminosidade, foram coletados 69 indivíduos em áreas claras (32 indivíduos sem estipe aéreo (não estabelecidos) e 37 indivíduos com estipe aéreo (estabelecidos)), e 67 em áreas escuras (30 não estabelecidos e 37 estabelecidos). Nas parcelas úmidas, 54 indivíduos foram amostrados e nas parcelas secas, 82 indivíduos.

Sistemas alozímicos utilizados e genotipagem

Técnicas de eletroforese de isoenzimas foram utilizadas para estimar a variabilidade genética. Pequenos fragmentos de tecido foliar foram macerados em tampão de extração (100ml TrisHCl 0,1M pH 7,0; 6,85g sacarose; 0,6g PVP; 0,038g EDTA; 0,145g BSA; 0,13g DIECA; 0,6g BORAX; 100µl β-mercaptoetanol; modificado de Sun & Ganders 1990). Os extratos foram absorvidos em retângulos de papel Whatman #3 (0,4 x 10 mm) que, então, foram aplicados em géis de amido Sigma (8,5%) com 1 cm de espessura. Foram utilizados 3 sistemas de corrida:

1. Sistema 1: eletrodo: ácido cítrico 0,04 M ajustado para pH 6,1 com N-(3- aminopropil)-morfolina; gel: solução de eletrodo diluída 1:20 (Clayton & Tretiak 1972);

2. Sistema 2: eletrodo: ácido cítrico 0,04 M ajustado para pH 7,5 com N-(3-aminopropil)-morfolina; gel: solução de eletrodo diluída 1:20 (Clayton & Tretiak 1972 modificado);

3. Sistema 3: eletrodo: 0,6 g de hidróxido de lítio, 5,9 g de ácido bórico e 1,1 g de EDTA para 1000 ml de água; gel: solução do eletrodo diluída 1:10.

A eletroforese horizontal foi conduzida até o marcador (azul de bromofenol) atingir aproximadamente 9 cm do local de aplicação. Em todos os sistemas foi utilizada uma corrente elétrica constante de 30 mA.

Os sistemas enzimáticos utilizados, bem como os sistemas eletrodo/gel em que foram analisados estão listados no **Tabela 2**.

Tabela 2. Enzimas e locos de *Euterpe edulis* que apresentaram atividade e resolução satisfatórias para a leitura dos locos e sistemas eletrodo/gel em que ocorreram.

Enzima	Código	nº de locos	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	EC[1]
6-fosfogluconato desidrogenase	6pgd	*2*	*X*			*1.1.1.44*
Fosfatase ácida	Acph	*2*		*X*		*3.1.3.2*
Álcool desidrogenase	Adh	*2*		*X*		*1.1.1.1*
Adenilato quinase	Ak	*2*			*X*	*2.7.4.3*
Fosfatase alcalina	Alp	*1*			*X*	*3.3.3.1*
Esterase	Est	*2*			*X*	*3.1.1.1*
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	G3pd	*2*			*X*	*1.2.1.12*
Glicose-6-fosfato desidrogenase	G6pdh	*4*	*X*			*1.1.1.49*
Hexoquinase	Hk	*3*	*X*			*2.7.1.1*
Isocitrato desidrogenase	Idh	*1*		*X*		*1.1.1.42*
Aminopeptidase da leucina	Lap	*2*			*X*	*3.4.11.1*
Enzima málica	Me	*2*			*X*	*1.1.1.40*
Fosfoglicose isomerase	Pgi	*2*	*X*			*5.3.1.9*
Fosfoglucomutase	Pgm	*2*	*X*			*2.7.5.1*
Peroxidase	Pr	*3*			*X*	*1.11.1.7*
Xiquimato desidrogenase	Skdh	*2*		*X*		*1.1.1.25*

[1]número da *Enzyme Comission*

Depois de devidamente corados, os géis foram submetidos à inspeção visual em transluminador para genotipagem dos indivíduos.

Extração do DNA genômico e genotipagem dos locos de microssatélites

O protocolo de extração de DNA genômico padronizado para *Euterpe edulis* foi uma adaptação do utilizado por Gaiotto (2001) e Gaiotto *et al.* (2001). A extração de DNA vegetal padronizada pode ser dividida em três partes: (1) rompimento dos envoltórios das células vegetais e neutralização de compostos DNA degradantes, (2) separação de fase e (3) isolamento e purificação do DNA.

A primeira etapa consiste da maceração de partes foliares em nitrogênio líquido até a aquisição de um pó fino e acréscimo de tampão de extração CTAB 2% aquecido. Na segunda etapa, acrescentamos uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) visando separar a fase orgânica da solução. Nesta se encontram as moléculas de ácidos nucléicos. Finalmente, adicionamos álcool gelado (isopropílico) para que os ácidos nucléicos precipitem, possam ser isolados e limpos (etílico 70%).

No total, seis locos de microssatélites foram utilizados. Os locos estudados foram EE03 (GenBank n. AF328881), EE08 (GenBank n. AF328872), EE09 (GenBank n. AF328880), EE41 (GenBank n. AF328884), EE43 (GenBank n. AF328886) e EE 48 (GenBank n. AF328875). Gaiotto (2001) e Gaiotto *et al.* (2001) desenvolveram os *primers* e descreveram todos os locos utilizados.

A reação de amplificação dos locos (PCR) foi conduzida com um volume total de 25 µl por amostra nas seguintes concentrações: 1x PCR buffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 0,4 µM de cada primer, 1 unidade de *Brazilian Taq* (Invitrogen) e 1 µl de DNA (aproximadamente 10µg). A programação do termociclador (Hybaid) foi composta por (1x) 1’ a 94 ºC; (30x) 30” a 94 ºC, 30” à temperatura de anelamento específica para cada loco, 30” a 72ºC; (1x) 5’ a 72ºC.

A genotipagem dos indivíduos foi feita através da eletroforese de gel de poliacrilamida 10% não denaturante. A situação de corrida foi de voltagem constante de 80 volts por 6 h. Após a corrida, os géis foram corados com prata seguindo as recomendações de Creste *et al.* (2001).

O produto do PCR dos indivíduos correu em gel ao lado de um marcador *ladder* de 10 bp (Invitrogen) para que fosse possível estimar o tamanho dos alelos. Tal estimativa contou com o auxílio do programa computacional DNAFRAG (Schaffer & Sederoff 1981).

Análises dos resultados

As freqüências alélicas foram estimadas por leitura direta dos géis. A estruturação genética foi analisada através de estatística F de Weir & Cockerham (1984), usando theta (θ), estimativa análoga ao F_{ST}. Tais estimativas foram calculadas e avaliadas com auxílio dos pacotes computacionais Fstat (Goudet 2002) e Genetix (Belkhir *et al.* 2001). A significância do θ loco-a-loco foi calculada utilizando o método de permutações e seguindo as recomendações de Sokal & Rohlf (2001). Os valores de F_{ST} por loco que apresentaram algum grau de estruturação foram classificados de acordo com o recomendado por Wright (1978).

As análises envolvendo umidade se deram através do cálculo de θ entre indivíduos presentes em parcelas secas e úmidas. Quanto às comparações referentes à luminosidade, calculamos os mesmos índices tanto para indivíduos não estabelecidos quanto estabelecidos de parcelas claras e escuras.

Ainda envolvendo a luminosidade, separamos todos os indivíduos em cinco classes de luminosidade (classe 1< 9%, 9% ≤ classe 2 < 12%, 12% ≤ classe 3 < 14%, 14% ≤ classe 4 < 20% e classe 5 ≥ 20%, médias 7,3%, 10,4%, 13,0%, 15,6% e 23,6%, respectivamente) e os comparamos de forma pareada calculando o θ. Tais valores foram comparados com a diferença das médias de luminosidade das classes por meio de uma correlação de Pearson.

Resultados

Umidade

O θ entre indivíduos de parcelas secas e parcelas úmidas, considerando todos os locos, não foi significativamente diferente de zero ($p > 0,05$). Entretanto, a análise loco-a-loco revelou que seis locos apresentaram θ significativo (tabela 3). Destes, apenas um evidenciou θ entre 0,05 e 0,15, ou seja, diferenciação moderada segundo Wright (1978). Entre os locos de microssatélite nenhum valor de θ foi significativo (tabela 4).

Tabela 3. Valores de θ por loco de alozima entre indivíduos de parcelas úmidas e secas, não estabelecidos de parcelas claras e escuras e estabelecidos de parcelas claras e escuras.

Loco	Umidade	Luminosidade	
		Não Estabelecidos	Estabelecidos
Acph-2	0,042*	-0,011ns	-0,017ns
Ak-2	0,058*	0,000ns	-0,019ns
G6pd-3	-0,021ns	0,020**	-0,009ns
G6pd-4	0,023ns	0,008**	0,045ns
Hk-2	0,013ns	0,010**	-0,026ns
Hk-3	0,050*	0,000ns	-0,043ns
Lap-1	0,008ns	0,003**	-0,007ns
Lap-2	0,040**	0,000ns	-0,008ns
Me-2	0,041*	0,019ns	-0,001ns
Pgi-2	0,009ns	-0,032ns	0,065**
Pr-1	0,048*	0,095ns	-0,017ns
6pgdh-2	-0,012ns	0,000ns	0,040*
Total	0,000ns	0,000ns	0,000ns

ns não significativo ($p > 0,05$)
*$p < 0,05$
**$p < 0,01$
Obs.: os locos e valores não apresentados nessa tabela tiveram $p > 0,05$.

Luminosidade

Nem entre indivíduos não estabelecidos, nem entre estabelecidos o *θ* foi significativo (p > 0,05) considerando todos os locos. A comparação por loco evidenciou quatro locos com *θ* significativos em não estabelecidos entre parcelas claras e escuras (Lap-1 0,003, G6pd-3 0,020, G6pd-4 0,008, Hk-2 0,010) e dois em estabelecidos (6pgdh-2 0,040 e Pgi-2 0,065, tabela 3). Seguindo a classificação de Wright (1978), nenhum loco apresentou-se moderadamente estruturado entre os não estabelecidos, enquanto um loco (Pgi-2) o esteve entre os estabelecidos. Não houve *θ* significativo entre os locos de microssatélites (tabela 4).

Tabela 4. Valores de *θ* por loco de microssatélite entre indivíduos de parcelas úmidas e secas, não estabelecidos de parcelas claras e escuras e estabelecidos de parcelas claras e escuras.

Loco	Umidade	Luminosidade	
		Não Estabelecidos	Estabelecidos
EE03	0,009^{ns}	-0,013^{ns}	0,011^{ns}
EE08	-0,003^{ns}	0,006^{ns}	-0,006^{ns}
EE09	-0,003^{ns}	0,001^{ns}	-0,003^{ns}
EE41	-0,004^{ns}	-0,016^{ns}	-0,021^{ns}
EE43	0,000^{ns}	0,013^{ns}	0,005^{ns}
EE48	-0,002^{ns}	-0,014^{ns}	-0,011^{ns}
Total	0,000^{ns}	0,000^{ns}	0,000^{ns}

^{ns} não significativo (p>0,05)

O diagrama de dispersão entre as médias das cinco classes de luminosidade e os *θs* pareados pode ser visto na figura 2. Tais fatores não se mostraram relacionados no teste de correlação.

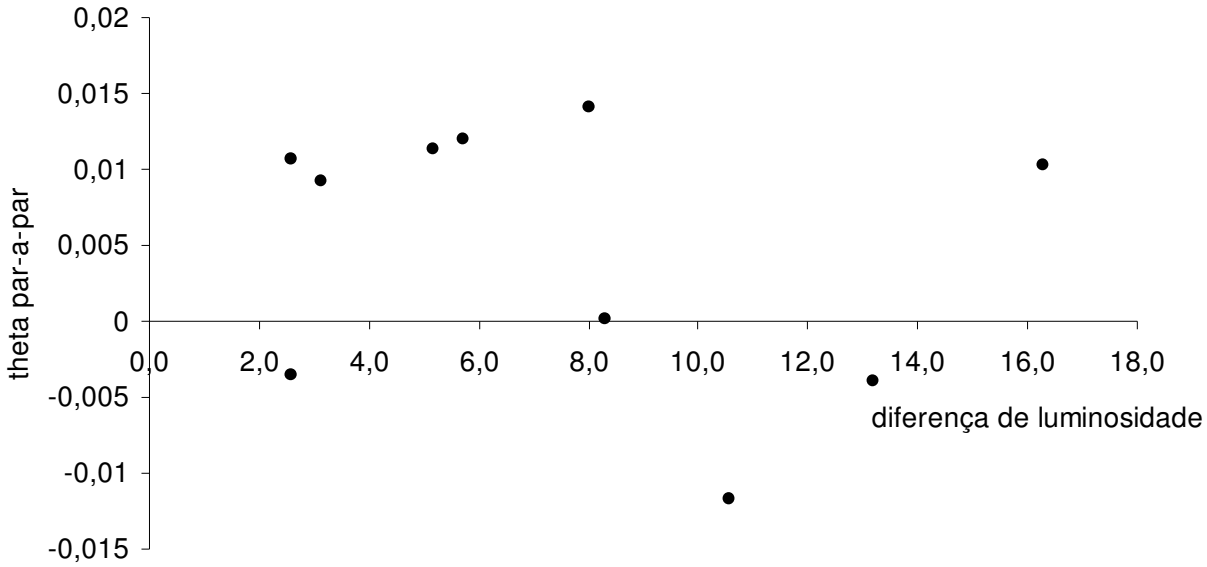

Figura 2. Diagrama de dispersão para valores pareados de θ e diferença das médias de luminosidade entre cinco classes (Pearson r = 0,231 e p > 0,05).

Discussão

Sementes recalcitrantes possuem a característica de perda progressiva do potencial germinativo com o dessecamento. Em um levantamento em floresta paludícola, Silva (1991) mostrou que, quanto mais úmido o solo, maior a quantidade de plântulas de *E. edulis*. Reis *et al.* (1999) e Brochado (2003) revelaram que as sementes dessa espécie são recalcitrantes, pois têm baixo potencial germinativo com perda de 30% de seu teor úmido. Apenas 12% das sementes germinam nessa condição (Brochado 2003). Isso sugere uma variação da capacidade germinativa relacionada à umidade: algumas sementes são mais sensíveis que outras ao dessecamento. Tal variação pode estar relacionada à variação genética entre as sementes.

Relacionando umidade às freqüências alélicas nos locos estudados, não haveríamos de encontrar diferenças nas freqüências alélicas entre indivíduos presentes em parcelas úmidas e secas, uma vez que todos os indivíduos coletados já germinaram. Este é o esperado se a umidade

é um fator seletivo para a germinação. Então, tanto os marcadores expressos (alozimas) quanto os não expressos (microssatélites) não deveriam mostrar estruturação entre as classes de indivíduos de parcelas úmidas e secas.

De fato não encontramos estruturação nos locos alozímicos como um todo, nem nos locos de microssatélites. Considerando a análise loco-a-loco, seis locos apresentaram algum grau de estruturação, dos quais cinco apresentaram uma baixa diferenciação e um, moderada diferenciação genética (Wright 1978). Aparentemente, tal resultado foge ligeiramente da expectativa de ausência de estruturação, porém não podemos ignorar que dos 41 locos analisados 35 não se mostraram estruturados e apenas um apresentou estruturação moderada, o que representa menos de 2,5% dos locos analisados. Assim, podemos concluir que existe uma pequena diferenciação genética entre indivíduos crescendo em parcelas úmidas e secas.

Entre os locos de microssatélite não era esperado nenhum tipo de diferenciação, uma vez que estes marcadores não são expressos e, por isso, seriam utilizados como controle. De fato, nenhum loco evidenciou diferenciação entre as classes analisadas.

Luz é um fator crucial para a fotossíntese e o crescimento da planta. Apesar de a germinação de *E. edulis* não ser afetada pela luminosidade (Brochado 2003), o desenvolvimento e, conseqüentemente, o recrutamento sofrem grande influência do regime de luz (Nakazono *et al.* 2001). Buscamos, então, comparar geneticamente indivíduos de áreas claras e escuras, subdividindo-os em não estabelecidos (sem estipe aéreo) e estabelecidos (com estipe aéreo). Esperávamos que indivíduos não estabelecidos não apresentassem estruturação entre parcelas claras e escuras, já que ainda não se desenvolveram. Por outro lado, os estabelecidos deveriam apresentar alguma diferenciação entre as duas classes de luminosidade.

Considerando o total dos marcadores, não encontramos diferença nos individuos não estabelecidos e os estabelecidos entre parcelas claras e escuras, mas mais locos apresentaram algum grau de estruturação entre os não estabelecidos que entre os estabelecidos. Mais uma vez, o resultado difere aparentemente do esperado: se luminosidade é importante para o recrutamento e está relacionada à presença de certos alelos, então mais locos deveriam estar estruturados entre

os que já passaram pelo processo de recrutamento (estabelecidos) que entre os que ainda não passaram por esse processo (não estabelecidos).

Entretanto, nenhum loco apresentou estruturação moderada entre os não estabelecidos, e apenas um apresentou estruturação moderada está entre os estabelecidos. Nota-se que apesar de menos locos apresentarem algum grau de estruturação entre os estabelecidos, os valores de θ entre estes são maiores do que entre os não estabelecidos. O maior θ entre os não estabelecidos (0,020) é metade do valor do menor θ entre os estabelecidos (0,040). Tal resultado está de acordo com o esperado, pois entre os mais velhos a diferença entre os que recrutaram em áreas claras e escuras é maior que entre os indivíduos mais jovens.

Os locos de microssatélite também não apresentaram estruturação nem considerando todos os locos nem na análise loco-a-loco referente à luminosidade. Tal resultado corrobora o esperado, uma vez que estes marcadores não são expressos.

Neste trabalho, a medição da luminosidade foi feita através da medida da abertura de dossel nas parcelas de acordo com a densiometria das copas. Segundo Souza & Martins (2005), a abertura de dossel aumentou na área de estudo de 2001 para 2002 e permaneceu inalterada de 2002 para 2003, chegando a variação de abertura do dossel a 26%. Disso pode-se interpretar que variações na cobertura ocorrem, ou seja, o regime de luz em que os indivíduos se desenvolvem é muito variável num tempo curto e isso pode afetar a correlação das diferenças de luminosidade entre parcelas com as diferenças entre os grupos de plantas. Assim, a ausência de correlação entre essas variáveis pode ser decorrente da dinâmica da luminosidade desta floresta paludícola.

Conclusão

Este estudo revela que as necessidades fisio-ecológicas de germinação e recrutamento podem estar diretamente relacionadas à genética em *Euterpe edulis*. Fatores de restrição ambiental abióticos, como luminosidade e umidade, podem influenciar as freqüências alélicas de certos marcadores, sobretudo os marcadores que tem expressão fenotípica.

Capítulo 2

Alterações na variabilidade genética ao longo dos estádios ontogenéticos de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae).

Resumo

Estádios ontogenéticos ocorrem lado a lado nas populações naturais de diversas plantas perenes, caracterizados por etapas distintas do ciclo de vida. Um estádio ontogenético não é necessariamente uma coorte, em que todos os indivíduos têm a mesma idade cronológica. *Euterpe edulis* passa por mudanças morfológicas características de estádios ontogenéticos, e a densidade dos indivíduos diminui progressivamente do estádio de plântula ao de adulto. Entender como a variabilidade genética se distribui ao longo dos estádios ontogenéticos pode auxiliar na elaboração de estratégias de conservação da espécie. O objetivo deste estudo foi caracterizar a variabilidade genética dos estádios ontogenéticos de *E. edulis* na Mata de Santa Genebra, Campinas, SP. Utilizamos amostras dos cinco estádios, dos quais investigamos marcadores alozímicos e microssatélites. A variabilidade genética foi crescente ao longo da ontogenia em ambos os marcadores, enquanto o coeficiente de endogamia foi decrescente. Existe uma estruturação entre adultos e os estádios ontogenéticos de plântula e jovem I, evidenciada pelos microssatélites. Tanto o processo de seleção em favor dos heterozigotos, proposto por outros autores, quanto o efeito Wahlund temporal, caracterizado pelo acúmulo progressivo de gerações ao longo da ontogenia, podem gerar o mesmo padrão de estruturação. Os valores decrescentes de F_{IS} corroboram a hipótese do efeito Wahlund, porém ambos os fenômenos devem estar ocorrendo na população de *E. edulis* da Mata Santa Genebra.

Palavras-chave: *Euterpe edulis*, alozima, microssatélites, estádio ontogenético, efeito Wahlund temporal

Introdução

Muitas plantas perenes apresentam etapas distintas do ciclo de vida, chamadas de estádios ontogenéticos, que ocorrem lado a lado nas populações naturais (Gatsuk 1980, Carvalho *et al*. 1999). Um estádio ontogenético não é necessariamente uma coorte, em que todos os indivíduos têm a mesma idade cronológica (Harper & White 1974). O ciclo de vida dos indivíduos de uma população consiste numa série de estádios morfologicamente reconhecíveis, que são produzidos um após o outro, até a morte, caracterizando-se pela aquisição e/ou perda de certas estruturas e propriedades, além de várias mudanças morfológicas, anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a ontogenia (Gatsuk *et al*. 1980).

Lawson & Poethig (1995) afirmaram que as plantas têm um mecanismo de regulação interna que percebe as condições ambientais e, em função delas, aceleram ou retardam seu desenvolvimento. Assim, uma planta individual, em cada momento, poderia ser caracterizada não só por sua idade cronológica como também por critérios biológicos típicos de certo intervalo de seu desenvolvimento, que é chamado estádio ontogenético (Carvalho *et al*. 1999).

A duração média de cada estádio ontogenético em cada espécie de planta tem um componente genético, mas, como as condições ambientais podem variar grandemente, diferentes indivíduos podem atingir um mesmo estádio ontogenético com diferentes idades cronológicas (Gatsuk *et al.*1980). Portanto, diferentes indivíduos num mesmo estádio ontogenético podem ter sido originados em diferentes eventos reprodutivos.

Silva (1991) observou que, antes de se tornarem adultos, indivíduos de *Euterpe edulis* passam por mudanças morfológicas características de estádios ontogenéticos. A densidade dos indivíduos diminui progressivamente do estádio inicial de plântula ao de adulto (tabela 1 e figura 1) (Silva 1991, Reis 1995). Esses resultados poderiam indicar diferenças na variabilidade genética entre os estádios ontogenéticos dessa espécie. A redução populacional poderia alterar as freqüências gênicas entre os estádios, uma vez que poucos indivíduos chegam à fase adulta.

Segundo Carvalho *et al.* (1999), a duração de cada estádio ontogenético tende a aumentar à medida que a ontogênese progride, sendo menor em plântulas e maior em adultos. A maior longevidade de um estádio ontogenético possibilita o acúmulo de indivíduos recrutados de diferentes eventos reprodutivos. Em outras palavras, o número de eventos reprodutivos acumulados num estádio ontogenético é tanto maior quanto maior a duração do estádio ontogenético considerado. Como a reprodução de *E. edulis* é exclusivamente sexuada (Reis & Guerra 1999) e nem todos os adultos se reproduzem simultaneamente (Alves 1994, Reis 1995, Mantovani & Morellato 2000), a variabilidade genética de um estádio deve ser tanto maior quanto mais duradouro for o estádio ontogenético.

Além disso, se o ambiente for temporalmente instável, poderia ocorrer seleção de genótipos, acarretando também variações entre as gerações que precedem e as que sucedem à seleção (Hartl & Clark 1997, Futuyma 1992, Shorrocks 1980). Bovi *et al.* (1987) encontraram uma taxa de sobrevivência de 21,61% entre plântulas e indivíduos de até 50 cm de altura e atribuíram a baixa sobrevivência à competição por água, nutrientes e luminosidade. Dessa forma, a variação temporal no ambiente também pode alterar a freqüência gênica ao longo da ontogenia dessa espécie.

Considerando tais informações, este capítulo tem por objetivos caracterizar a variabilidade genética dos estádios ontogenéticos de *E. edulis* e compará-la entre os estádios testando:

1) Se seleção natural for o principal mecanismo atuando ao longo dos estádios ontogenéticos, a variabilidade deve aumentar com a ontogenia nos marcadores enzimáticos (expressos) e ser aleatória nos marcadores microssatélites (não expressos);
2) Se um processo de acumulo progressivo de gerações estiver acontecendo, a variabilidade genética deve apresentar um padrão ascendente em ambos os marcadores.

Material e Métodos

Local de estudo

O presente trabalho teve por local de estudo a Reserva Municipal de Santa Genebra já descrita no capítulo inicial da tese.

Coletas

Foram coletados 32 indivíduos no estádio ontogenético de plântula, 30 indivíduos nos estágios jovem I, jovem II e imaturo e 14 indivíduos adultos, num total de 136 indivíduos. As parcelas nas quais os indivíduos foram coletados foram escolhidas através de sorteio de pares de números aleatórios (figura 3). Os estádios ontogenéticos foram caracterizados por Silva (1991), Reis (1995), Carvalho *et al*. (1999) e Souza & Martins (2005) como:

1. Plântula: indivíduos com até 10 cm de altura até a inserção da folha-flecha, tendo até três folhas flabeliformes. As plântulas, em sua maioria, estão ligadas à semente que ainda possui reservas de endosperma.
2. Jovem-fase I: indivíduos com alturas entre 10 e 30 cm até a inserção da folha-flecha, em geral com 2 a 4 folhas, das quais pelo menos uma tem forma transicional entre flabeliforme e pinatissecta. Sua nutrição é autônoma (independente das reservas da semente).
3. Jovem-fase II: alturas entre 0,3 e 1 m até a inserção da folha-flecha, estipe aéreo ausente e com 4 a 5 folhas pinatissectas.
4. Imaturo: plantas com altura superior a 1 m até a inserção da folha-flecha, com estipe aéreo, porém sem indicações de emissão de inflorescência.
5. Adulto: plantas com sinais evidentes de reprodução, como presença de inflorescência ou infrutescência; ou cicatrizes de inflorescências na parte superior do estipe; ou inflorescência caída na base das plantas; ou a presença de um aglomerado de plântulas sob a planta.

Estes dois últimos parâmetros apenas confirmam a presença duvidosa de cicatrizes de inflorescências.

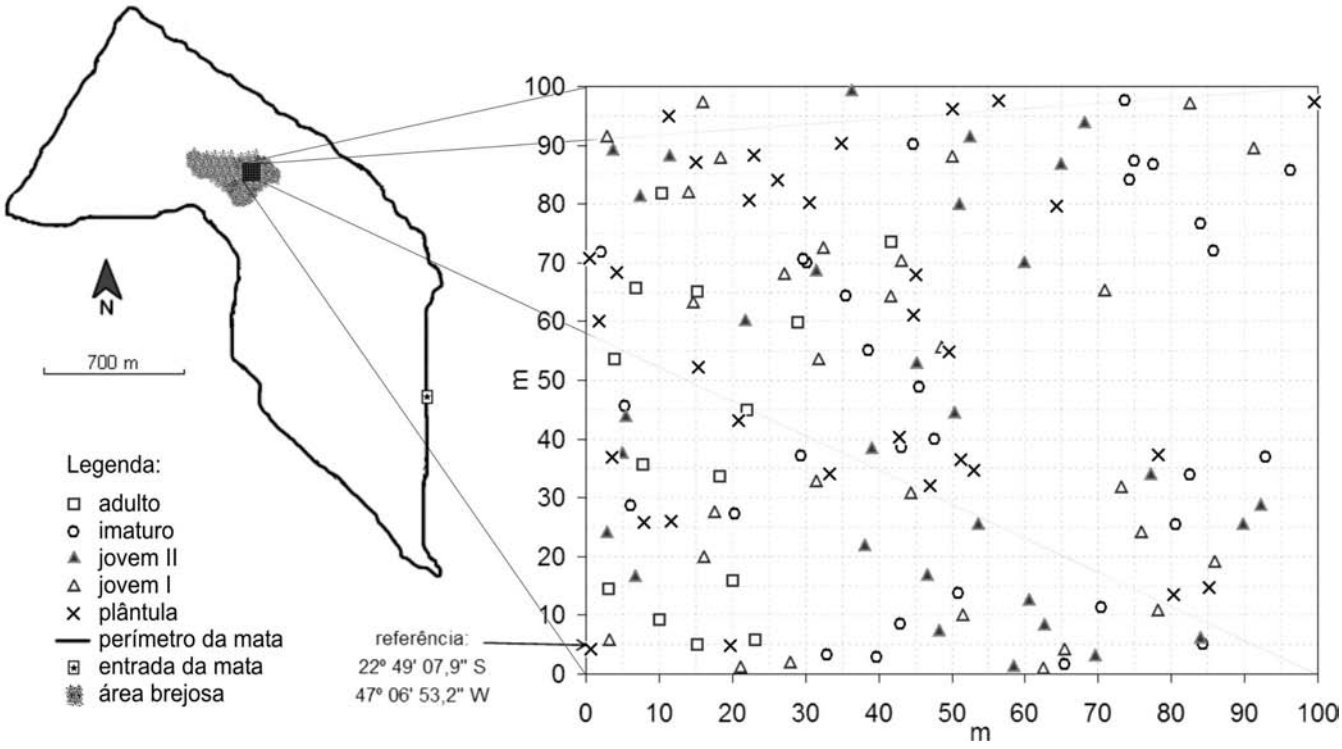

Figura 3. Mapa das parcelas na região brejosa da Mata Municipal de Santa Genebra, SP, ilustrando a localização de cada indivíduo coletado.

Sistemas alozímicos e microssatélites utilizados

Os sistemas e locos alozímicos foram os mesmos já descritos no primeiro capítulo, bem como os locos de microssatélites e os protocolos laboratoriais.

Estimativas e análise dos dados

As freqüências alélicas foram estimadas a partir da interpretação dos géis. As estimativas

de variabilidade genética foram calculadas e comparadas entre os estádios, sendo o critério para considerar um loco como polimórfico a freqüência do alelo mais comum inferior a 0,95. A estruturação genética foi analisada através do calculo de estatística F de Wright (1978) e índice de divergência de Rousset (1997) (R_{ST}). Os testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizados pelo método de permutações. Tais estimativas foram calculadas e avaliadas com auxílio dos pacotes computacionais Fstat (Goudet 2002), Arlequin (Schneider *et al.* 2000) e RSTCALC (Goodman, 1997).

Resultados

Marcadores alozímicos

As freqüências alélicas mostraram-se bastante variáveis entre os estádios para alguns locos, como em G6pd-2 e Me-1, e pouco variáveis em outros, como em Ak-2. O número de alelos nos locos variou de um (Pr-3 e Adh-2) a 5 (6pgdh-1) (anexos 1 e 2). A variabilidade genética encontrada nos estádios ontogenéticos mostrou uma tendência ascendente dos estádios mais novos para os mais avançados. Tal tendência pôde ser elucidada pelas quatro medidas de variabilidade: heterozigosidade esperada, heterozigosidade observada, porcentagem de locos polimórficos e número médio de alelos por loco (figura 4 e anexo 2). Considerando a população como um todo, o número médio de alelos por loco foi igual a 2,088, a porcentagem de locos polimórficos foi 61,660, a heterozigosidade observada foi igual a 0,152 e a esperada 0,204.

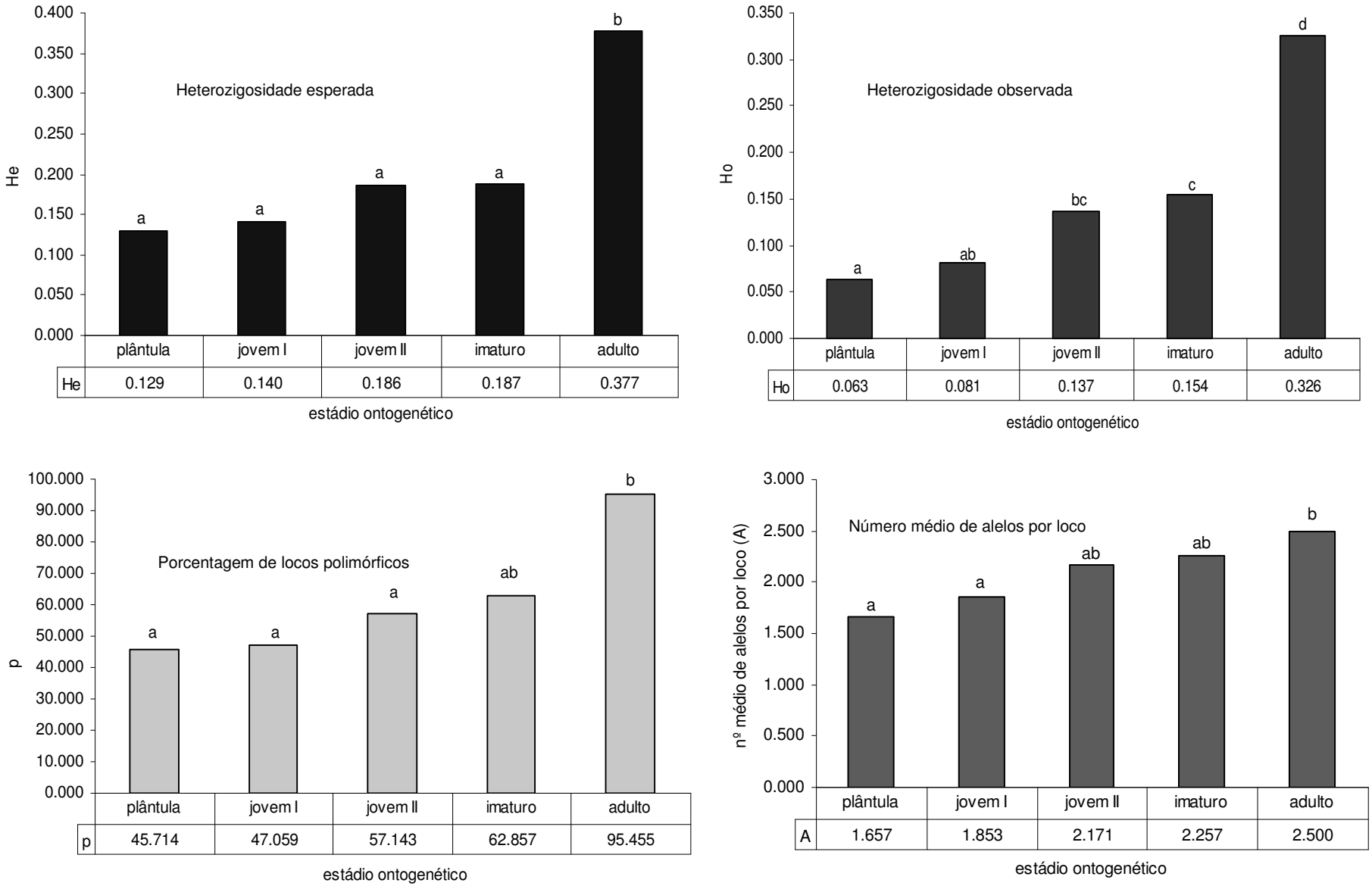

Figura 4. Variabilidade genética dos 35 locos de alozima nos estádios ontogenéticos de *Euterpe edulis* da Mata Santa Genebra, SP (ANOVA, $p<0,003$). Obs.: letras iguais significam valores estatisticamente iguais (Bonferroni, $p>0,05$)

Alguns valores de F_{IS} calculados por loco por estádio foram negativos, como em Me-2 de plântulas e G3pd-1 de imaturos (anexo 2). Ao contrário da variabilidade genética (figura 4), o F_{IS} médio dos estádios ontogenéticos mostrou uma tendência decrescente ao longo dos estádios ontogenéticos (figura 5).

Três dos estádios ontogenéticos apresentaram desvios do esperado por Hardy-Weinberg em ao menos um loco, sempre tendendo à deficiência de heterozigotos. Os locos foram Pr-2 em plântula e imaturo, Idh em jovem II e Acph-2 em imaturo. Todos os valores de F_{IS} foram significativamente diferentes de zero.

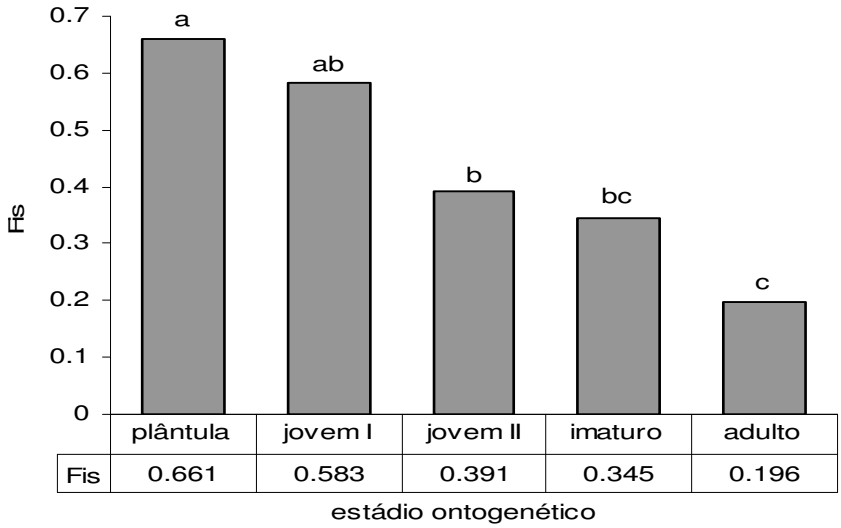

Figura 5. Coeficiente de endogamia (F_{IS}) para os 35 locos de alozima dos estádios ontogenéticos de *Euterpe edulis* da Mata Santa Genebra (ANOVA, p=0,004). Obs.: letras iguais significam valores estatisticamente iguais (Bonferroni, p>0,05).

Marcadores microssatélites

Todos os estádios ontogenéticos não reprodutivos apresentaram pelo menos dois locos fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg (p<0,05), enquanto o estádio adulto apenas um loco (EE41). Nos locos EE08, EE41 e EE48 as heterozigosidades observada e esperada foram diferentes nos

estádios de plântula e jovem II. Em jovem I, apenas os locos EE03 e EE48 estiveram fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, enquanto em imaturos, os locos EE09 e EE41 se mostraram fora do equilíbrio. Vale ressaltar que o loco EE48 esteve fora do equilíbrio em todos os estádios não reprodutivos, estando em Hardy-Weinberg apenas em adultos.

Foram amostrados 45 alelos de microssatélites no total, dos quais sete foram exclusivos dos estádios mais avançados. O número de alelos presentes por estádio foram 25, 28, 33, 32 e 24 para plântulas, jovens I, jovens II, imaturos e adultos, respectivamente. As freqüências alélicas variaram entre os estádios ontogenéticos (anexo 3). Alguns alelos aumentaram a freqüência ao longo dos estádios, como os alelos 190 do loco EE03, 120 do loco EE43 e 198 do loco EE48 e outros diminuíram, como os alelos 130 do loco EE41 e 104 do loco EE43.

Todos os locos analisados foram polimórficos em todos os estádios pelo critério do alelo mais comum com freqüência inferior a 0,95. A variabilidade genética foi ascendente ao longo da ontogenia considerando as heterozigosidades observadas, sendo as heterozigosidades esperadas similares entre os estádios (figura 6). Ao contrário da heterozigosidade e concordando com os dados de alozimas, o coeficiente de endogamia para os estádios foi decrescente (figura 7). Com exceção dos adultos, todos os estádios apresentaram falta de heterozigotos.

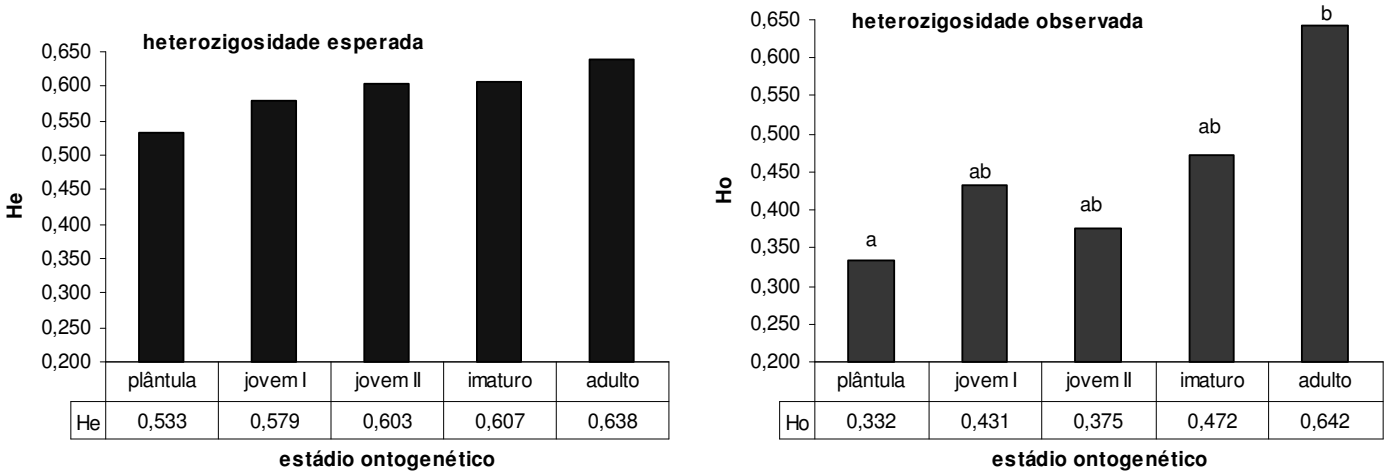

Figura 6. Heterozigosidades esperada (p>0,050) e observada (p=0,042) para os seis locos de microssatélites ao longo da ontogenia de *Euterpe edulis* da Mata Santa Genebra, SP (ANOVA). Obs.: letras iguais significam valores estatisticamente iguais (Bonferroni, p>0,050).

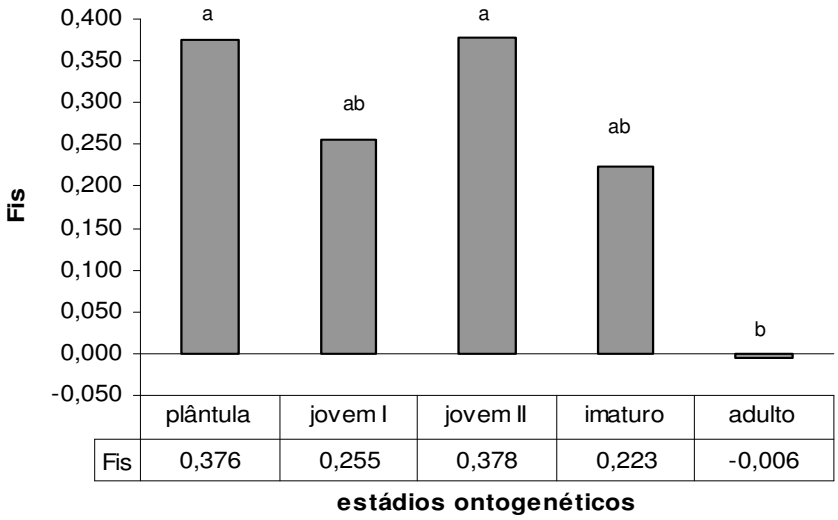

Figura 7. Coeficiente de endogamia (F_{IS}) para os seis locos de microssatélites dos estádios ontogenéticos de *Euterpe edulis* da Mata Santa Genebra (ANOVA, p=0,032). Obs.: letras iguais significam valores estatisticamente iguais (Bonferroni, p>0,050).

Os valores de diferenciação genética (R_{ST}) par-a-par não foram significativos para a maioria dos pares. Apenas os pares plântula-adulto e jovem I-adulto apresentaram valores significativos de R_{ST} (tabela 5).

Tabela 5. Valores significativos de R_{ST} pareados (1023 permutações)

	plântula	jovem I	jovem II	imaturo
jovem I	$-0,020^{ns}$	-		
jovem II	$0,005^{ns}$	$0,010^{ns}$	-	
imaturo	$0,000^{ns}$	$0,024^{ns}$	$0,012^{ns}$	-
adulto	$0,041^{*}$	$0,053^{*}$	$0,015^{ns}$	$-0,003^{ns}$

^{ns}não significativo ($p > 0,05$)
$^{*}p < 0,05$

Discussão

Considerando os marcadores alozímicos, as estimativas de variabilidade genética estão acima do estimado para plantas em geral, monocotiledôneas, espécies de ambiente úmido e de reprodução exclusivamente sexuada. Porém, as mesmas estimativas são mais baixas do que o estimado para *Euterpe edulis* em outros trabalhos (tabela 6).

Tabela 6. Comparação da variabilidade genética considerando locos alozímicos.

	Estudo	nº médio de alelos por loco	porcentagem de locos polimórficos	heterozigosidade esperada
Plantas	Hamrick & Godt 1989	1,96	-	-
monocotiledôneas	Hamrick *et al.* 1979	2,11	39,70	0,165
	Hamrick & Godt 1989	2,38	59,20	0,181
espécies de ambiente úmido	Hamrick *et al.* 1979	1,56	27,71	0,145
espécies de reprodução	Hamrick *et al.* 1979	1,63	35,64	0,135
exclusivamente sexuada	Hamrick & Godt 1989	2,00	51,60	0,151
Euterpe edulis	Reis 1996, Reis *et al.* 2000a	2,7 - 3,9	71,4 - 100,0	0,41 - 0,49
	Conte *et al.* 2003	2,4 - 2,6	62,50 - 68,75	0,259 - 0,284
	Conte 2004	3,05 - 3,15	100,0	0,416 - 0,431
	Presente estudo	2,088	61,66	0,204

Essas diferenças entre os resultados aqui apresentados e os de Reis (1996), Reis *et al.* (2000a), Conte *et al.* (2003) e Conte (2004) podem dever-se a três motivos:

1) A variabilidade genética das populações estudadas por aqueles autores foi maior que a do presente estudo. Neste caso, a diferença na área amostrada pode ter sido determinante, uma vez que aqueles autores amostraram áreas entre 2 e 10 ha, enquanto neste trabalho amostramos apenas um hectare.

2) A maior variabilidade genética descrita por aqueles autores seria um artefato do menor número de locos alozímicos analisados. Aqueles autores consideraram apenas de 7 a 10 locos alozímicos, enquanto o presente estudo considerou 35.

3) A menor variabilidade da população da Mata Santa Genebra pode se dever à endogamia. Sendo uma floresta urbana, essa reserva estaria sujeita a uma maior pressão de

degradação do que, por exemplo, a Fazenda Intervales, onde Reis (1996) e Reis *et al.* (2000a) realizaram o estudo.

Nossas estimativas de variabilidade genética (figuras 4 e 6) mostraram-se crescentes do estádio ontogenético mais novo (plântula) para o mais avançado (adulto) em ambos os marcadores. Conte (2004) encontrou resultados semelhantes em populações da Floresta Ombrófila Densa de Santa Catarina e o atribuiu à seleção em favor dos heterozigotos.

Reis (1996) encontrou excesso de heterozigotos nos adultos de seis das sete populações analisadas e uma pequena falta de heterozigotos nas progênies. Neste caso, o excesso de heterozigotos encontrado em adultos decorreria, segundo o autor, de heterose. Outros trabalhos com resultados semelhantes justificam o excesso de heterozigotos da mesma forma em outras espécies (Clegg & Allard 1973, Schaal & Levin 1976, El-Kassaby *et al.* 1987, Sampson *et al.* 1989, Tonsor *et al.* 1993, Kalisk *et al.* 2001, Murren 2003).

Tal explanação é possível, pois, apesar de os marcadores alozímicos terem sido considerados neutros desde sua descoberta, Mitton (1994) e Eanes (1999) relataram que pode existir seleção envolvendo esses marcadores e fatores ambientais. Trabalhos com outros organismos também apontam que alozimas nem sempre são tão neutras como se pensa (Richmond & Powell 1970, Allard *et al.* 1972, Bergmann & Ruetz 1991, Eguiarte *et al.* 1992, Tonsor *et al.* 1993, Thelen & Allendorf 2001, Murren 2003, entre outros).

Entretanto, o mesmo não pode ser dito para os marcadores de microssatélites. Ao contrário das alozimas, os microssatélites não são marcadores expressos. Como a seleção natural atua sobre o fenótipo, não se espera qualquer pressão seletiva sobre os microssatélites. Assim sendo, a hipótese de seleção não explica a ascensão da variabilidade genética desses marcadores como explicaria para alozimas. Devem existir, portanto, outros fatores envolvidos no padrão de aumento da variabilidade genética ao longo da ontogenia na população estudada de *E. edulis*.

A maior duração de um estádio ontogenético possibilita o acúmulo de indivíduos de diferentes eventos reprodutivos e, assim, o número de gerações acumuladas é maior quanto mais longa a duração do estádio ontogenético considerado. Como a reprodução de *E. edulis* é exclusivamente

sexuada (Reis & Guerra 1999, Henderson 2000) e nem todos os adultos se reproduzem simultaneamente (Alves 1994, Reis 1995, Mantovani & Morellato 2000), não se espera que as plântulas apresentem as mesmas freqüências gênicas encontradas nos adultos e sim um subconjunto de seus alelos. O acúmulo progressivo de eventos reprodutivos nos estádios ontogenéticos resultaria, então, em aumento da variabilidade genética de plântulas até adultos. Em outras palavras, a sobreposição de gerações aumenta ao longo do desenvolvimento de *Euterpe edulis*.

Esse fenômeno seria análogo a um efeito Wahlund ao longo do tempo. Este efeito é observado quando sub-populações com diferentes freqüências alélicas são submetidas ao mesmo teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Hartl & Clark 1997). Geralmente ele é considerado quando há subdivisão espacial das populações. Entretanto, uma subdivisão temporal com diferenças nas freqüências alélicas entre gerações pode gerar o efeito Wahlund temporal. Um resultado direto desse efeito é a deficiência de heterozigotos. Os valores de F_{IS} corroboram essa idéia, pois decresceram ao longo da ontogenia.

Conte *et al.* (2003) argumentaram que o efeito Wahlund temporal não deve ocorrer em *E. edulis* por três razões: (1) existência de sobreposição de gerações dentro das classes etárias estudadas, (2) o excesso de homozigotos nas classes mais novas não significativo e (3) a falta de estruturação genética entre as classes. No entanto, o efeito Wahlund temporal que se baseia no acúmulo progressivo de eventos reprodutivos ao longo da ontogenia, ou seja, na sobreposição progressiva de gerações nos estádios ontogenéticos. Logo, o efeito Wahlund temporal seria tanto maior num estádio quanto menos gerações sobrepostas nele existirem, aumentando ao longo da ontogenia. Além disso, o excesso de homozigotos foi significativo em todas as classes etárias (estádios ontogéticos, figuras 4 e 6), exceto para adultos com o marcador de microssatélites, e houve estruturação genética entre adultos e os estádios mais novos (tabela 5) no presente estudo. Como já dito antes, tais diferenças podem ser decorrentes da diferença no número de locos amostrados entre nosso trabalho e o de Conte *et al.* (2003).

Estudos anteriores com outras espécies sugeriram uma relação positiva entre a duração da etapa no ciclo de vida e sua variabilidade genética, principalmente trabalhos envolvendo bancos de

sementes e germinantes. O banco de sementes pode funcionar como um reservatório genético, no qual são estocados os genótipos de sementes produzidas por muitas temporadas reprodutivas (Templeton & Levin 1979, Brown & Venable 1986).

Alvarez-Buylla & Garay (1994) estudaram as mudanças genéticas ao longo do ciclo de vida de *Cecropia obtusifolia* e encontraram alelos exclusivos no banco de sementes dessa espécie. Segundo eles, a predação de sementes no solo é alta e poucas sementes contribuem para o recrutamento de novos indivíduos mas, nas poucas sementes que permanecem no solo, alguns alelos menos freqüentes podem se acumular com o tempo. Tal acúmulo aumentaria a freqüência de alelos raros e, conseqüentemente, a hetorozigosidade.

Cabin (1996) também encontrou maior heterozigosidade nas sementes no solo do que nos germinantes em *Lesquerella fendleri* e ressaltou que o banco deve conter sementes produzidas durante muitos anos por um grupos de parentais geneticamente diversos. Isso pode ser decorrente de vários mecanismos. Se a endogamia variar anualmente, por exemplo, a heterozigosidade média das coortes deve variar também, gerando diferenças entre gerações mais novas e mais avançadas. Resultados semelhantes foram descritos por McCue & Holtsford (1998) em *Clarkia springvillensis*.

O palmiteiro *E. edulis* não forma banco de sementes (Brochado 2003), e sim banco de plântulas (Carvalho *et al.* 1999). No entanto, como já discutido, essa espécie apresenta uma duração progressivamente maior dos estádios ontogenéticos. Portanto, também pudemos notar uma associação positiva entre a duração da etapa no ciclo de vida e a variabilidade genética.

Outra questão a ser considerada é que, da mesma forma que a heterozigosidade, o número médio de alelos por loco também aumentou ao longo da ontogenia da população estudada. O número médio de alelos deveria permanecer constante se a seleção fosse o único mecanismo de alteração da variabilidade genética ao longo da ontogenia. Por outro lado, ao aumentar o número de alelos, aumenta-se o número de heterozigotos possíveis, isto é, a heterozigosidade aumentaria não somente porque os heterozigotos são favorecidos, mas porque o número de heterozigotos cresce qualitativamente. Isso corrobora a idéia de que a hipótese de acúmulo progressivo de

gerações (efeito Wahlund temporal) também é um fator importante para o aumento da variabilidade genética ao longo da ontogenia de *Euterpe edulis*.

Conclusão

A variabilidade genética de *Euterpe edulis* aumenta do estádio ontogenético mais jovem para o mais avançado. Tal aumento pode ser o resultado de seleção em favor dos genótipos heterozigotos, como apontado por outros autores, ou decorrente de um efeito Wahlund temporal, caracterizado pelo acúmulo progressivo de eventos reprodutivos ao longo dos estádios ontogenéticos. É provável que tanto a seleção em favor dos heterozigotos quanto o efeito Wahlund temporal estejam acontecendo na população da Mata Santa Genebra, SP.

Conclusões Gerais

- Fatores de restrição ambiental abióticos, como luminosidade e umidade, podem influenciar as freqüências alélicas de certos marcadores, sobretudo os marcadores que tem expressão fenotípica em *Euterpe edulis*

- A variabilidade genética da espécie está concentrada nos estádios mais avançados. O que gera o padrão ascendente da variabilidade genética pode ser seleção em favor do heterozigoto, como descrito em outros trabalhos, ou acúmulo progressivo de eventos reprodutivos ao longo da ontogenia (efeito Wahlund temporal).

Literatura Consultada

ALLARD, RW; KAHLER, A.L. & WEIR, BS. 1972. The effect of selection on esterase allozyme in barley population. **Genetics 72: 489-503.**

ALVAREZ-BUYLLA, E. & GARAY, A.A. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. **Evolution 48(2): 437-453.**

ALVES, L.F. 1994. Competição intraespecífica e padrão espacial em uma população de Euterpe edulis Mart. (Arecaceae). Tese apresentada ao Inst. de Biologia da Univ. Estadual de Campinas para a obtenção do título de mestre. Campinas, SP.

BALLVÉ, R.M.L. 1988. Isoenzimas como marcadores genéticos em palmiteiro (*Euterpe* spp.). Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp para obtenção do título de Mestre em Biologia. Campinas, SP.

BASKIN, J.M. & BASKIN, C.C. 1998. Seed ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Academic Press, California.

BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N. & BONHOMME, F. 2001. GENETIX 4.02, logiciel sous Wi-ows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier, France.

BERGMANN, F & RUETZ, W. 1991. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations. **Forest Ecology and Management 46: 39–47.**

BORBA, E.L. 2001. Biossistemática de espécies rupícolas de *Pleurothallis* (Orchidaceae) ocorrentes em campos rupestres brasileiros: aspectos reprodutivos, genéticos, fitoquímicos, morfológicos e taxonômicos. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp para obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal. Campinas, SP.

BOVI, M.L.A.; GODOY-JÚNIOR, G. & SAES, L.A. 1987. Pesquisas com os gêneros *Euterpe* e *Bactris* no Instituto Agronômico de Campinas. In; EMBRAPA. Palmito – I Encontro Nacional de Pesquisadores, Anais. 1-43. Curitiba, PR.

BROCHADO, P.G. 2003. Germinação de Duas Espécies de Palmeiras (*Geonoma brevispatha* e *Euterpe edulis*) de uma Floresta Paludícola no Sudeste do Brasil. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp para obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal. Campinas, SP.

BROWN, JS & VENABLE, DL. 1986. Evolutionary ecology of seed bank annuals in temporally varying environments. **American Naturalist 127:31-47.**

CABIN, R.J. 1996. Genetic comparisons of seed bank and seedling populations of a perennial desert mustard, *Lesquerella fendleri*. **Evolution 50 (5): 1830-1841.**

CARVALHO, R.M.; MARTINS, F.R. & SANTOS, F.M. 1999. Leaf ecology of pre-reproductive ontogenetic stages of the palm tree *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) **Annals of Botany 83: 225-233.**

CLAYTON, J. & TRETIAK, D. 1972. Amine - citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. **Journal of Fisheries Reserch Board of Canada. 29: 1169 - 1172.**

CLEGG, M.T. & ALLARD, R.W. 1972. Patterns of differentiation in slender wild oat species *Avena barbata*. **Proceedings of the National Academy of Science USA 69: 1820–1824.**

CLEGG, M.T. & ALLARD, R.W. 1973. Viability versus fecundity selection in the Slender Wild Oat, *Avena barbata* L. **Science 181: 667-668.**

CONTE, R; NODARI, RO; VENCOVSKY, R & SEDREZ DOS REIS, M. 2003. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity 91: 401-406.**

CONTE, R. 2004. Estrutura genética de populaçoes de Euterpe edulis Mart. Submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura Luiz de Quiroz, USP, para obtenção do título de doutor. Piracicaba, SP.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A. & FIGUEIRA, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter 19: 299-306.**

DIAS, A.C.; FIGLIOLIA, M.B.; MOURA NETTO, B.V.; NOGUEIRA, J.C.B.; SILVA, A.; SIQUEIRA, A.C.M.F. & YAMAZOE, G. 1987. Pesquisa sobre o palmito no Instituto Florestal de São Paulo. In: ; EMBRAPA. Palmito – I Encontro Nacional de Pesquisadores, Anais. 63-74. Curitiba, PR.

EANES, WF. 1999. Analysis of selection on enzyme polymorphisms. **Annual Reviews of Ecology and Systematics 30: 301–326.**

EGUIARTE, LE; PEREZ-NASSER, N & PIÑERO, D. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in Astrocarium mexicanum (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity 69: 217–228.**

EL-KASSABY, Y.A; MEAGHER, M.D.; PARKINSON, J. & PORTLOCK, F.T. 1987. Allozyme inheritance, heterozygosity and outcrossing rate among *Pinus monticola* near Ladysmith, British Columbia. **Heredity 58: 173-181.**

ESTADO DE SÃO PAULO. SECRETARIA DE ECONOMIA E PLANEJAMENTO. 1981. Plano cartográfico do estado de São Paulo: Barão Geraldo (mapa). São Paulo, SP.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D. & BRISCOE, D.A. 2003. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. 544pp.

FUTUYMA, D.J. 1992. Biologia Evolutiva 2ª ed., Sociedade Brasileira de Genética/CNPq.

GAIOTTO, F.A. 2001. Inferências sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpe edulis* Mart. utilizando marcadores de microssatélites Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas. Piracicaba, SP.

GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V. & GRATTAPAGLIA, D. 2001. Microsatellite markers for heart of palm - *Euterpe edulis* and *E. oleraceae* Mart. (Arecacea). **Molecular Ecology /no prelo/.**

GATSUK, L.E.: SMIRNOVA, O.V.; VORONTZOVA, L.I.; ZAUGOLNOVA, L.B. & ZHUKOVA, L.A. 1980. Age states of plants of various growth forms: a review **Journal of Ecology 68:675-696**.

GODOY, J.A. & JORDANO, P. 2001. Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with encocarp DNA microsatellites **Molecular Ecology 10: 2275-2283.**

GOODMAN, S.J. 1997. RST CALC: A collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. **Molecular Ecology 6:881-885.**

GOUDET, J. 2002. FSTAT (version 2.9.3.2): a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (software). http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html (consultado em janeiro de 2003).

HAMRICK, J.L. 1982. Plant population genetics and evolution **American Journal of Botany 69: 1685-1693.**

HAMRICK, J.L. & ALLARD, R.W. 1972. Microgeographical variation inallozyme frequencies in *Avena barbata.* . **Proceedings of the National Academy of Science USA 69: 2100–2104.**

HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B. & MITTON, J.B. 1979. Relationships between life history characteristics a- eletrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics 10: 173-200.**

HAMRICK, J.L. & GODT, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. *In*: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L. & WEIR, B.S. 1989. Plant population genetis, breeding, a-genetic resources, Sinauer Associates Inc. Publishers. 449 pp.

HARPER, J.L. & WHITE, J. 1974. The demography of plants. **Annual Review of Ecology and Systematics 5:419-463.**

HARTL, D.L. & CLARK, A.G. 1997. Principles of population genetics 3rd ed., Sinauer Associates Inc. Publishers. 452 pp.

HUSBAND, B.C. & BARRETT, S.C.H. 1996. A metapopulation perspective in plant population biology **Journal of Ecology 84: 461-469**

JOLY, C.A. 1991. Flooding tolerance in tropical forest trees. *In*: JACKSON, M.B.; DAVIES, D.D.; & LAMBERS, H. (Eds.). Plant life under oxygen deprivation: ecology, physiology and biochemistry. SBP Academic Publishing, The Hauge. pp. 23-34.

KALISK, S.; NASON, J.D.; HANZAWA, F.M. & TONSOR, S.J. 2001. Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history, and selection. **Evolution 55(8): 1560-1568.**

KLEIN, RM. 1980. Ecologia da flora e vegetação do Vale do Itajaí. **Sellowia 31-32: 9-38.**

KLINGE, H.; JUNK, W.J. & REVILLA, C.J. 1990. Status and distribution of forested wetlands in tropical South America. **Forest Ecology and Management 33/34: 81-101.**

LAWSON, E.J. & POETHIG, R.S. 1995. Shoot development in plants: time for a change. **Trends in Genetics 11:263-268.**

LEÃO, M. & CARDOSO, M. 1974. Instruções para a cultura do palmiteiro. Trabalho referente ao convênio CIA/SUDELPA.

LEITÃO-FILHO, H.F. Vegetação. *In*: MORELLATO, P.C. & LEITÃO-FILHO, H.F. (org.) 1995. Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana. Reserva de Santa Genebra. Campinas: Editora da UNICAMP. 19-36.

LEMMON, P.E. 1957. A new instrument for measuring forest overstory density. **Journal of Forestry 55: 667-668.**

LINHART, Y.B.; MITTON, J.B.; STURGEON, K.B. & DAVIS, M.L. 1981. Genetic variation in space and time in population of ponderosa pine. **Heredity 46: 407-426.**

LOVELESS, M.D. & HAMRICK, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics 15: 65-95.**

MANTOVANI, A & MORELLATO, P. 2000.Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral do palmiteiro. **Sellowia 49-52: 23-38.**

MATOS, D.M.S.; FRECKLETON, R.P. & WATKINSON, A.R. 1999. The role of density dependence in the population dynamics of a tropical palm. **Ecology 80: 2635-2650.**

McCUE, A. & HOLTSFORD, T.P. 1998. Seed bank influence on genetic diversity in the rare annual *Clarkia springvillensis* (Onagraceae). **American Journal of Botany 85(1): 30-36.**

MELLO, M.H.; PEDRO-JÚNIOR, M.J.; ORTOLANI, A.A. & ALFONSI, R.R. 1994. Chuva e temperatura: cem anos de observações em Campinas. Campinas: Instituto Agronômico. Boletim Técnico 154.

MITTON, JB. 1994. Molecular approaches to population biology. **Annual Review of Ecology and Systematics 25: 45–69**.

MURREN, C.J. 2003. Spatial and demographic population genetic structure in *Catasetum viridiflavum* across a human-disturbed habitat. **Journal of Evolutionary 16: 333-342.**

NAKAZONO, E.M.; COSTA, M.C.; FUTATSUGI,K. & PAULILO, M.T.S. 2001. Crescimento inicial de *Euterpe edulis* Mart. em diferentes regimes de luz. **Revista Brasileira de Botânica 24**

OLIVEIRA, J.B.; MENCK, J.R.F. & ROTTA, C.L. 1979. Levantamento pedológico semidetalhado dos solos do estado de São Paulo: quadrícula de Campinas. IBGE, SUPREN. Rio de Janeiro, RJ. 169pp.

REITZ, R; KLEIN, RM & REIS, A. 1978. Projeto madeira de Santa Catarina. Itajaí: Sudesul. 320p

REIS, A. 1995. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius – (Palmae) em uma floresta ombrófila densa Montana da encosta atlântica em Blumenau, SC Tese apresentada no Instituto de Biologia da UNICAMP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal. Campinas, SP.

REIS, A.; PAULILO, M.S.T.; NAKAZONO, E.M.; VENTURI, S. 1999. Efeito de diferentes níveis de dessecamento na germinação de *Euterpe edulis* Martius Arecaceae. **Insula 28: 31-41.**

REIS, M.S. 1996. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius). Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor. Piracicaba, SP.

REIS, M.S. & GUERRA, M.P. 1999. *Euterpe edulis Martius (PALMITO)* Projeto "Inventário dos Recursos Florestais da Mata Atlântica", http://www.unicamp.br/nipe/rbma/palmito.htm (consultado em agosto de 2004), Florianópolis, SC.

REIS, MS; GUIMARÃES, E & OLIVEIRA, GP. 1993. Estudos preliminares da biologia reprodutiva do palmiteiro (*Euterpe edulis*) em mata residual do Estado de São Paulo. *In*: Congresso Florestal Brasileiro, 7. Anais. Embrapa. Curitiba, PR. P. 358-360.

REIS, M.S.; VENCOVSKY, R.; KAGEYAMA, P.Y.; GUIMARÃES, E.; FANTINI, A.C.; NODARI, R.O. & MANTOVANI, A. 2000a. Variação genética em populações naturais de palmiteiro (*Euterpe edulis* Martius - Arecaceae) na floresta ombrófila densa *In:* REIS, M.S. & REIS, A. (org.) *Euterpe edulis* Martius (Palmiteiro) – Biologia, conservação e manejo. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí, SC. 335 pp.

REIS, MS; FANTINI, AC; NODARI, RO; REIS, A; GUERRA, MP & MANTOVANI, A. 2000b. Management and conservation of natural populations in Atlantic Rain Forest: the case study of palm heart (*Euterpe edulis* Martius). **Biotropica 32(4):894-902.**

RICE, W. 1989. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution 43(1): 223-225.**

RICHMOND, R.C. & POWELL, J.R. 1970. Evidence of heterosis associated with an enzyme locus in a natural population of *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences 67 (3): 1264-1267.**

ROUSSET F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. **Genetics 145:1219-1228**

SAMPSON, J.F.; HOPPER, S.D. & JAMES, S.H. 1989. The mating system and population genetic structure in a bird-pollinated mallee*, Eucalyptus rhodantha*. **Heredity 63: 383-393.**

SCHAAL, B.A. & LEVIN, D.A. 1976. The demographic genetics os *Liatris cylindracea* Michx. (Compositae). **American Naturalist 110: 191-206.**

SCHAFFER, H.E. & SEDEROFF, R.R. 1981. DNAFRAG Version 3.03. **Analytical Biochemistry 115: 113-122.**

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin ver 2.000, a software for population genetics data analysis. http://anthro.unige.ch/arlequin.

SHORROCKS, B. 1980. A origem da diversidade: as bases genéticas da evolução. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

SILVA, M.D. 1991. Estrutura de tamanho padrão espacial de uma população de *Euterpe edulis* Mrt. (Arecaceae) em Mata Mesófila Semidecídua no Município de Campinas, SP Tese apresentada no Instituto de Biologia da UNICAMP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal. Campinas, SP.

SILVERTOWN, J.W. & DOUST, J.L. 1993. Introduction to plant population biology. 3rd edition, Blackwell Science Ltd. 210 pp.

SOKAL, R.R & ROHLF, F.J. 2001. Biometry. 3rd edition, W.H.Freeman and Company. 887pp.

SOUZA, A.F. & MARTINS, F.R. 2005. Spatial variation and dynamics of flooding, canopy openness, and structure in a Neotropical swamp forest. **Plant Ecology 180: 161–173.**

SPIETH, P.T. 1979. Environmental heterogeneity: a problem of contradictory selection pressures, gene flow, and local polymorphism. **American Naturalist 113(2): 247-260.**

SUN, M. & GANDERS, F. R. 1990. Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of Bidens pilosa. **Heredity. 64: 139-143.**

TEMPLETON, AR & LEVIN, DA. 1979. Evolutionary consequence of seed pools. **American Naturalist 144:232-249.**

THELEN, G.C. & ALLENDORF, F.W. 2001. Heterozygosity–fitness correlations in rainbow trout: effects of allozyme loci or associative overdominance? **Evolution 55: 1180–1187.**

TONSOR, S.J.; KALISZ, S.; FISHER, J. & HOLTSFORD, T.P. 1993. A life-history based study on population genetic structure: seed bank to adults in *Plantago lanceolata*. **Evolution 47: 833–843.**

WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. 1984 Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution 38: 1358-1370.**

WRIGHT, S. 1969. Evolution and the Genetics of Populations – Volume 2: The Theory of Gene Frequencies. The University of Chicago Press. Chicago, IL.

WRIGHT, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations – Volume 4: Variability within and among Natural Populations. The University of Chicago Press. Chicago, IL.

Anexo 1. Freqüências alélicas dos loco de alozima por estádio ontogenético e por classe de umidade e luminosidade de *Euterpe edulis* da Mata Municipal da Santa Genebra, SP.

Obs.: locos monomórficos foram suprimidos.

		Estádio ontogenético					Umidade		Luminosidade			
									não estabelecidos		estabelecidos	
Loco	alelo	plant.	jov. I	jov. II	imat.	ad.	úm.	sec.	esc.	cla.	esc.	cla.
Pgm-1	1	0,083	0,000	0,125	0,260	0,313	0,155	0,144	0,031	0,053	0,143	0,300
	2	0,917	1,000	0,875	0,740	0,688	0,845	0,856	0,969	0,947	0,857	0,700
Pgm-2	1	0,250	0,063	0,048	0,025	nu[1]	0,114	0,056	0,154	0,115	0,048	0,025
	2	0,750	0,938	0,952	0,975	nu[1]	0,886	0,944	0,846	0,885	0,952	0,975
Lap-1	1	0,000	0,019	0,093	0,074	0,154	0,083	0,041	0,020	0,000	0,117	0,081
	2	1,000	0,981	0,907	0,926	0,846	0,917	0,959	0,980	1,000	0,883	0,919
Lap-2	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188	0,042	0,000	0,000	0,000	0,043	0,018
	2	1,000	1,000	1,000	1,000	0,813	0,958	1,000	1,000	1,000	0,957	0,982
6pgdh-1	1	0,053	0,018	0,017	0,017	0,107	0,051	0,021	0,063	0,000	0,027	0,042
	2	0,000	0,018	0,138	0,033	0,071	0,051	0,056	0,021	0,000	0,108	0,056
	3	0,132	0,143	0,172	0,317	0,036	0,133	0,211	0,083	0,196	0,176	0,236
	4	0,789	0,536	0,552	0,600	0,571	0,602	0,599	0,708	0,565	0,581	0,569
	5	0,026	0,286	0,121	0,033	0,214	0,163	0,113	0,125	0,239	0,108	0,097
6pgdh-2	1	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016
	2	1,000	1,000	0,979	0,964	0,750	0,953	0,944	1,000	1,000	0,983	0,891
	3	0,000	0,000	0,021	0,018	0,250	0,031	0,056	0,000	0,000	0,017	0,094
Acph-1	1	0,042	0,071	0,058	0,161	nu[1]	0,088	0,094	0,094	0,029	0,096	0,125
	2	0,958	0,881	0,885	0,821	nu[1]	0,882	0,868	0,906	0,912	0,885	0,821
	3	0,000	0,048	0,058	0,018	nu[1]	0,029	0,038	0,000	0,059	0,019	0,054
Acph-2	1	0,000	0,026	0,000	0,077	nu[1]	0,036	0,031	0,000	0,029	0,045	0,040
	2	0,909	0,974	0,976	0,885	nu[1]	0,875	0,969	0,923	0,971	0,955	0,900
	3	0,091	0,000	0,024	0,038	nu[1]	0,089	0,000	0,077	0,000	0,000	0,060
Pgi-1	1	0,054	0,167	0,121	0,067	0,071	0,059	0,123	0,056	0,161	0,097	0,081
	2	0,857	0,722	0,810	0,900	0,857	0,833	0,825	0,833	0,750	0,861	0,851
	3	0,089	0,111	0,069	0,033	0,071	0,108	0,052	0,111	0,089	0,042	0,068
Pgi-2	1	0,083	0,000	0,000	0,000	nu[1]	0,000	0,056	0,000	0,091	0,000	0,000
	2	0,917	1,000	0,929	1,000	nu[1]	1,000	0,917	1,000	0,909	0,900	1,000
	3	0,000	0,000	0,071	0,000	nu[1]	0,000	0,028	0,000	0,000	0,100	0,000
G3pd-1	1	0,000	0,100	0,079	0,028	0,107	0,043	0,083	0,000	0,143	0,040	0,096
	2	1,000	0,900	0,868	0,833	0,821	0,870	0,857	1,000	0,857	0,920	0,769
	3	0,000	0,000	0,053	0,139	0,071	0,087	0,060	0,000	0,000	0,040	0,135
G3pd-2	1	0,000	0,000	0,000	0,033	0,077	0,045	0,013	0,000	0,000	0,048	0,023
	2	0,000	0,000	0,067	0,033	0,154	0,091	0,039	0,000	0,000	0,071	0,091
	3	1,000	1,000	0,933	0,933	0,769	0,864	0,947	1,000	1,000	0,881	0,886
Adh-1	1	1,000	0,833	1,000	1,000	nu[1]	1,000	0,960	1,000	0,875	1,000	1,000
	2	0,000	0,167	0,000	0,000	nu[1]	0,000	0,040	0,000	0,125	0,000	0,000
Skdh-1	1	0,000	0,083	0,000	0,083	nu[1]	0,050	0,043	0,000	0,063	0,063	0,038
	2	1,000	0,917	1,000	0,917	nu[1]	0,950	0,957	1,000	0,938	0,938	0,962
Skdh-2	1	0,118	0,227	0,022	0,114	nu[1]	0,140	0,083	0,227	0,118	0,000	0,115
	2	0,882	0,773	0,957	0,886	nu[1]	0,840	0,917	0,773	0,882	1,000	0,865
	3	0,000	0,000	0,022	0,000	nu[1]	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019
Idh	1	0,750	0,969	0,795	0,880	nu[1]	0,875	0,851	0,929	0,850	0,825	0,852
	2	0,250	0,031	0,205	0,120	nu[1]	0,125	0,149	0,071	0,150	0,175	0,148
Alp	1	0,932	1,000	0,952	0,972	0,885	0,950	0,955	0,977	0,955	0,923	0,962
	2	0,068	0,000	0,048	0,028	0,115	0,050	0,045	0,023	0,045	0,077	0,038

Anexo 1 (continuação)

		Estádio ontogenético					Umidade		Luminosidade			
									não estabelecidos		estabelecidos	
Loco	alelo	plant.	jov. I	jov. II	imat.	ad.	úm.	sec.	esc.	cla.	esc.	cla.
Est-1	1	0,056	0,018	0,033	0,042	0,000	0,043	0,026	0,038	0,034	0,000	0,061
	2	0,889	0,946	0,950	0,958	0,821	0,902	0,935	0,942	0,897	0,943	0,909
	3	0,056	0,036	0,017	0,000	0,179	0,054	0,039	0,019	0,069	0,057	0,030
Est-2	1	0,000	0,029	0,000	0,071	0,107	0,043	0,033	0,000	0,025	0,087	0,025
	2	1,000	0,971	0,967	0,929	0,857	0,943	0,956	1,000	0,975	0,870	0,975
	3	0,000	0,000	0,033	0,000	0,036	0,014	0,011	0,000	0,000	0,043	0,000
Me-1	1	0,813	0,714	0,569	0,650	nu[1]	0,702	0,667	0,788	0,731	0,589	0,629
	2	0,146	0,250	0,310	0,267	nu[1]	0,238	0,254	0,212	0,192	0,268	0,306
	3	0,042	0,036	0,121	0,083	nu[1]	0,060	0,080	0,000	0,077	0,143	0,065
Me-2	1	0,067	0,000	0,115	0,089	nu[1]	0,133	0,043	0,000	0,053	0,140	0,069
	2	0,933	1,000	0,885	0,911	nu[1]	0,867	0,957	1,000	0,947	0,860	0,931
G6pd-1	1	1,000	0,727	0,333	0,900	0,813	0,789	0,683	0,800	0,889	0,559	0,769
	2	0,000	0,273	0,667	0,100	0,188	0,211	0,317	0,200	0,111	0,441	0,231
G6pd-2	1	0,000	0,000	0,136	0,167	0,250	0,071	0,146	0,000	0,000	0,214	0,125
	2	1,000	1,000	0,818	0,500	0,750	0,857	0,750	1,000	1,000	0,607	0,792
	3	0,000	0,000	0,045	0,333	0,000	0,071	0,104	0,000	0,000	0,179	0,083
G6pd-3	1	0,000	0,000	0,000	0,063	0,036	0,020	0,029	0,000	0,000	0,060	0,000
	2	0,000	0,100	0,033	0,094	0,357	0,140	0,129	0,000	0,143	0,120	0,200
	3	1,000	0,900	0,967	0,844	0,607	0,840	0,843	1,000	0,857	0,820	0,800
G6pd-4	1	0,000	0,077	0,139	0,158	nu[1]	0,160	0,071	0,000	0,091	0,056	0,237
	2	1,000	0,923	0,833	0,789	nu[1]	0,800	0,914	1,000	0,909	0,861	0,763
	3	0,000	0,000	0,028	0,053	nu[1]	0,040	0,014	0,000	0,000	0,083	0,000
Hk-1	1	0,000	0,000	0,094	0,021	0,091	0,050	0,033	0,000	0,000	0,037	0,083
	2	1,000	1,000	0,906	0,979	0,909	0,950	0,967	1,000	1,000	0,963	0,917
Hk-2	1	0,063	0,000	0,269	0,088	0,385	0,238	0,149	0,000	0,071	0,175	0,283
	2	0,938	1,000	0,692	0,853	0,192	0,595	0,757	1,000	0,929	0,625	0,587
	3	0,000	0,000	0,038	0,059	0,385	0,167	0,081	0,000	0,000	0,175	0,130
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038	0,000	0,014	0,000	0,000	0,025	0,000
Hk-3	1	0,000	0,000	0,000	0,056	0,273	0,100	0,018	0,000	0,000	0,083	0,083
	2	1,000	1,000	1,000	0,944	0,727	0,900	0,982	1,000	1,000	0,917	0,917
Pr-1	1	0,306	0,105	0,125	0,119	0,063	0,242	0,100	0,367	0,091	0,080	0,146
	2	0,639	0,842	0,875	0,833	0,625	0,677	0,845	0,633	0,818	0,840	0,792
	3	0,056	0,053	0,000	0,048	0,313	0,081	0,055	0,000	0,091	0,080	0,063
Pr-2	1	0,250	0,109	0,056	0,048	0,179	0,190	0,074	0,190	0,159	0,167	0,031
	2	0,750	0,848	0,833	0,786	0,750	0,750	0,833	0,762	0,841	0,714	0,844
	3	0,000	0,043	0,111	0,167	0,071	0,060	0,093	0,048	0,000	0,119	0,125
Ak-1	1	0,071	0,083	0,136	0,000	0,318	0,139	0,078	nu[1]	nu[1]	nu[1]	nu[1]
	2	0,929	0,917	0,864	1,000	0,682	0,861	0,922	nu[1]	nu[1]	nu[1]	nu[1]
Ak-2	1	0,000	0,000	0,065	0,033	0,269	nu[1]	nu[1]	0,000	0,000	0,096	0,120
	2	1,000	1,000	0,935	0,967	0,731	nu[1]	nu[1]	1,000	1,000	0,904	0,880

[1]nu: loco não utilizado nas análises

Anexo 2. Heterozigosidade esperada, número de alelos e F_{IS} por estádio ontogenético por loco de alozima de *E. edulis*.

	plântula			jovem I			jovem II			imaturo			adulto				
Loco	**He**	**F_{IS}**	**A**	**He**	**F_{IS}**	**A**	**He**	**F_{IS}**	**A**	**He**	**F_{IS}**	**A**	**He**	**F_{IS}**	**A**	**G_{ST}**	**Ho**
Pgm-1	0,160	0,653	2		-	1	0,226	0,337	2	0,397	0,496	2	0,482	0,741	2	0,060	0,106
Pgm-2	0,411	0,757	2	0,125	1,000	2	0,095	1,000	2	0,050		2	-	-	-	0,050	0,038
Lap-1		-	1	0,037		2	0,171	-0,083	2	0,140	-0,061	2	0,269	-0,143	2	0,032	0,136
Lap-2		-	1		-	1		-	1		-	1	0,321	-0,167	2	0,137	0,075
6pgdh-1	0,373	0,718	4	0,626	0,430	5	0,647	0,361	5	0,544	-0,288	5	0,629	-0,135	5	0,032	0,458
6pgdh-2		-	1		-	1	0,042		2	0,071	-0,009	3	0,400	0,250	2	0,090	0,083
Acph-1	0,083		2	0,226	0,789	3	0,216	0,288	3	0,306	0,300	3	-	-	-		0,125
Acph-2	0,182	1,000	2	0,053		2	0,048		2	0,218	1,000	3	-	-	-		0,025
Acph-3	0,000	-	1		-	1		-	1		-	1	-	-	-		
Pgi-1	0,260	0,176	3	0,450	0,424	3	0,331	0,271	3	0,187	-0,067	3	0,264	-0,083	3		0,240
Pgi-2	0,167	1,000	2		-	1	0,143		2		-	1	-	-	-		0,036
G3pd-1		-	1	0,200	1,000	2	0,246	0,357	3	0,292	-0,140	3	0,319	-0,121	3		0,170
G3pg-2		-	1		-	1	0,129	-0,037	2	0,131	-0,018	3	0,391	-0,180	3	0,052	0,146
Adh-1		-	1	0,333	1,000	2		-	1		-	1	-	-	-	0,030	
Adh-2	-	-	1	-	-	-		-	1		-	1	-	-	-		
Skdh-1		-	1	0,167		2		-	1	0,159	-0,048	2	-	-	-		0,083
Skdh-2	0,221	1,000	2	0,382	0,762	2	0,086	-0,011	3	0,210	0,784	2	-	-	-	0,004	0,056
Idh	0,429	1,000	2	0,063		2	0,340	0,866	2	0,217	0,262	2	-	-	-	0,009	0,067
Alp	0,132	0,656	2		-	1	0,093	-0,026	2	0,056		2	0,212	-0,091	2	0,006	0,085
Est-1	0,210	0,647	3	0,106	0,663	3	0,098	-0,024	3	0,082	-0,022	2	0,302	-0,182	2	0,023	0,130
Est-2		-	1	0,059		2	0,067		2	0,137	-0,040	2	0,266	0,464	3	0,011	0,082
Me-1	0,324	0,101	3	0,436	0,263	3	0,577	0,163	3	0,510	0,215	3	-	-	-	0,011	0,374
Me-2	0,129	-0,037	2		-	1	0,211	0,635	2	0,167	0,357	2	-	-	-	0,004	0,079
G6pd-1		-	1	0,427	0,574	2	0,477	0,651	2	0,200	1,000	2	0,339	0,632	2	0,226	0,095
G6pd-2	-	-	1		-	1	0,336	0,730	3	0,674	0,670	3	0,433	0,615	2		0,096
G6pd-3		-	1	0,200	1,000	2	0,067		2	0,288	0,348	3	0,516	-0,245	3	0,105	0,179
G6pd-4		-	1	0,154	1,000	2	0,296	0,249	3	0,360	0,122	3	-	-	-	0,017	0,135
Hk-1		-	1		-	1	0,179	0,651	2	0,042		2	0,182	1,000	2		0,021
Hk-2	0,125		2		-	1	0,478	0,678	3	0,276	0,787	3	0,705	0,455	4	0,250	0,144
Hk-3		-	1		-	1		-	1	0,111	1,000	2	0,436	1,000	2	0,139	
Pr-1	0,520	0,679	3	0,289	0,636	3	0,226	0,337	2	0,300	0,524	3	0,545	0,082	3	0,043	0,213
Pr-2	0,395	1,000	2	0,279	0,844	3	0,304	0,634	3	0,369	0,871	3	0,418	0,145	3		0,112
Pr-3		-	1		-	1		-	1		-	1		-	1		
Ak-1	0,138	0,655	2	0,157	-0,063	2	0,242	0,250	2		-	1	0,455		2	0,083	0,170
Ak-2		-	1		-	1	0,125	-0,048	2	0,067		2	0,410	0,063	2	0,127	0,116
Média	0,129	0,589	1,657	0,140	0,516	1,853	0,186	0,294	2,171	0,187	0,287	2,257	0,377	0,195	2,500	0,044	0,111

Obs.: Os valores nulos estão referidos por células em branco.

Anexo 3. Freqüências alélicas dos locos de microssatélites por estádio ontogenético e por classe de umidade e luminosidade de *Euterpe edulis* da Mata Municipal de Santa Genebra, SP.

		Estádio ontogenético					Umidade		Luminosidade			
									não estabelecidos		estabelecidos	
loco	alelo	plant.	jov. I	jov. II	imat.	ad.	úm.	sec.	esc.	cla.	esc.	cla.
EE03	188	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,014
	190	0,000	0,000	0,000	0,033	0,089	0,010	0,013	0,000	0,000	0,047	0,000
	192	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,014
	195	0,000	0,039	0,058	0,017	0,000	0,010	0,033	0,000	0,036	0,031	0,027
	198	0,083	0,089	0,025	0,000	0,000	0,010	0,046	0,089	0,036	0,016	0,000
	208	0,849	0,706	0,725	0,817	0,661	0,867	0,770	0,821	0,839	0,750	0,824
	222	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,014
	228	0,000	0,056	0,025	0,000	0,000	0,020	0,013	0,036	0,018	0,016	0,000
	231	0,000	0,072	0,058	0,117	0,089	0,061	0,059	0,036	0,036	0,125	0,041
	234	0,068	0,039	0,058	0,000	0,161	0,020	0,046	0,018	0,036	0,016	0,068
EE08	98	0,313	0,244	0,194	0,244	0,321	0,287	0,234	0,241	0,313	0,229	0,243
	108	0,609	0,694	0,761	0,711	0,679	0,667	0,722	0,621	0,688	0,771	0,703
	118	0,078	0,061	0,044	0,044	0,000	0,046	0,044	0,138	0,000	0,000	0,054
EE09	82	0,131	0,107	0,167	0,083	0,286	0,179	0,111	0,100	0,133	0,189	0,122
	88	0,163	0,173	0,400	0,333	0,321	0,283	0,265	0,200	0,133	0,351	0,365
	94	0,272	0,207	0,117	0,183	0,143	0,170	0,204	0,183	0,300	0,162	0,135
	98	0,413	0,407	0,283	0,367	0,250	0,330	0,377	0,417	0,417	0,257	0,365
	102	0,022	0,107	0,033	0,000	0,000	0,038	0,031	0,100	0,017	0,014	0,014
	106	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,027	0,000
EE41	116	0,000	0,000	0,272	0,000	0,143	0,033	0,115	0,000	0,000	0,150	0,145
	118	0,000	0,000	0,089	0,457	0,286	0,174	0,154	0,000	0,000	0,267	0,323
	121	0,430	0,550	0,256	0,107	0,107	0,283	0,338	0,460	0,540	0,183	0,145
	126	0,086	0,000	0,106	0,207	0,250	0,141	0,092	0,060	0,020	0,150	0,194
	130	0,445	0,450	0,239	0,123	0,107	0,315	0,277	0,480	0,420	0,183	0,145
	132	0,039	0,000	0,039	0,107	0,000	0,043	0,015	0,000	0,020	0,050	0,032
	134	0,000	0,000	0,000	0,000	0,107	0,011	0,008	0,000	0,000	0,017	0,016
EE43	104	0,766	0,733	0,750	0,633	0,571	0,679	0,731	0,707	0,817	0,622	0,716
	120	0,234	0,267	0,250	0,333	0,429	0,321	0,256	0,293	0,183	0,365	0,270
	148	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,014	0,014
EE48	196	0,125	0,000	0,000	0,053	0,000	0,067	0,025	0,050	0,081	0,000	0,041
	198	0,000	0,000	0,033	0,136	0,179	0,058	0,051	0,000	0,000	0,121	0,081
	201	0,000	0,137	0,033	0,036	0,000	0,067	0,032	0,067	0,065	0,061	0,000
	206	0,109	0,037	0,117	0,136	0,071	0,125	0,076	0,100	0,048	0,091	0,135
	209	0,297	0,170	0,183	0,053	0,393	0,221	0,190	0,267	0,210	0,152	0,189
	212	0,000	0,000	0,217	0,086	0,000	0,038	0,089	0,000	0,000	0,121	0,135
	215	0,078	0,270	0,083	0,170	0,107	0,106	0,171	0,150	0,194	0,121	0,122
	220	0,266	0,153	0,200	0,236	0,143	0,192	0,222	0,200	0,226	0,197	0,216
	226	0,000	0,053	0,067	0,053	0,000	0,019	0,051	0,033	0,016	0,076	0,027
	227	0,031	0,087	0,000	0,000	0,000	0,038	0,019	0,100	0,016	0,000	0,000
	229	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,014
	230	0,000	0,000	0,000	0,000	0,107	0,019	0,000	0,000	0,000	0,015	0,014
	232	0,031	0,020	0,000	0,020	0,000	0,010	0,019	0,000	0,048	0,000	0,014
	234	0,000	0,037	0,067	0,000	0,000	0,019	0,025	0,000	0,032	0,045	0,014
	237	0,000	0,037	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,032	0,000	0,000
	242	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,013	0,033	0,032	0,000	0,000