

Rafael Flora Ramos

“Estrutura genética em escala geográfica reduzida em *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae), uma palmeira da Mata Atlântica”

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

RAFAEL FLORA RAMOS

**“Estrutura genética em escala geográfica reduzida em *Euterpe edulis*
Mart. (Arecaceae), uma palmeira da Mata Atlântica”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Rafael Flora Ramos
Solferini
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção
do Título de Mestre em Ecologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R147e Ramos, Rafael Flora, 1986-
Estrutura genética em escala geográfica reduzida em *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae), uma palmeira da Mata Atlântica / Rafael Flora Ramos. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Vera Nisaka Solferini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Variação altitudinal. 2. Palmito. 3. Diversidade genética. 4. Parque Estadual da Serra do Mar (SP). 5. Marcadores microssatélites. I. Solferini, Vera Nisaka, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Small scale genetic structure in *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae), a rainforest palm tree

Palavras-chave em Inglês:

Altitudinal variation
Heart of palm
Genetic diversity
Parque Estadual da Serra do Mar (SP)
Microsatellite markers

Área de concentração: Ecologia

Titulação: Mestre em Ecologia

Banca examinadora:

Vera Nisaka Solferini [Orientador]

Simone Aparecida Vieira

Evandro Marsola de Moraes

Data da defesa: 01-02-2013

Programa de Pós Graduação: Ecologia

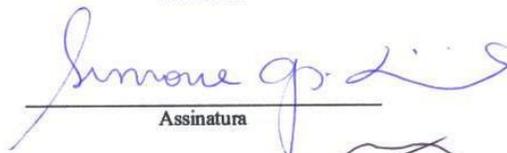
Campinas, 01 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

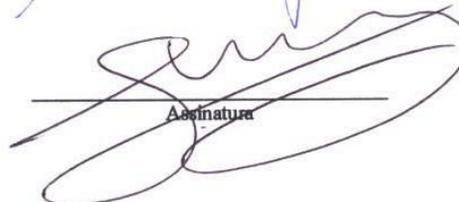
Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Simone Aparecida Vieira


Assinatura

Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes


Assinatura

Profa. Dra. Marlies Sazima

Assinatura

Dr. Iderval da Silva Júnior Sobrinho

Assinatura

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Edmar e Lígia, pelo amor, a dedicação e o incentivo à continuidade na carreira acadêmica. Às minhas irmãs, Natália e Valéria, pelo interesse e constante preocupação. Aos demais membros da família, os quais estiveram o tempo todo na torcida desejando o meu melhor. São pessoas importantíssimas para mim e que sempre me deram suporte, mesmo às vezes sem compreender exatamente os meus objetivos.

À Profa. Dra. Vera Nisaka Soferini pela oportunidade de realização deste projeto, pela orientação e incentivo e, principalmente, pela amizade. Esse foi um período de grande aprendizagem e crescimento pessoal.

Aos colegas e agregados do Laboratório de Diversidade Genética pelo apoio mútuo, assistências técnicas, discussões, puxões de orelha e, principalmente, por tornarem agradáveis os momentos dentro e fora do laboratório. São eles: Caiame, Camila, Christiane, Elen, Fernanda, Henrique, João, João Del Giudice, Julia, Juliana, Luiz Filipe, Mauricio, Monica, Patricia, Priscila, Renata, Renê, Ricardo e Thadeu.

À bióloga Célia Bresil e ao técnico Herbert, por facilitarem a execução das atividades no laboratório. Um agradecimento especial à Célia pelo exemplo de dedicação ao trabalho e pela amizade.

Aos amigos de Campinas, aqueles que iniciaram a pós-graduação comigo em 2009 e aqueles encontrados pelo caminho, pela contribuição acadêmica e também pela diversão e o apoio nos momentos difíceis. Aos amigos de São Carlos que mesmo na distância continuam sempre presentes.

Aos amigos motoristas de plantão que facilitaram o meu deslocamento. Ao Mauricio, à Elen e ao João Del Giudice pelas viagens à Serra do Mar; à Monica, ao Henrique e ao João Del Giudice pelas caronas até o Laboratório Nacional de Biologia, onde as genotipagens foram realizadas.

À Juliana José pelo auxílio desde o planejamento da amostragem até a análise e discussão dos dados, bem como pela paciência e a amizade. À Patricia Sujii pelas inúmeras dicas de laboratório e de análise dos dados.

Aos mateiros e guardas-parques que me acompanharam em campo: Seu Salvador e Dionísio na Fazenda Capricórnio, Cristo em Picinguaba e Wagner e Abner em Santa Virgínia, sem os quais eu não seria capaz de me embrenhar nas encostas da Serra do Mar.

Ao técnico Wanderley Pedroso, do Laboratório Nacional de Biologia, pelo serviço de genotipagem.

Ao Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes por permitir uma breve estadia em seu laboratório e pelos muitos ensinamentos.

Aos membros examinadores da pré-banca Prof. Dr. Flavio Antonio Mães do Santos, Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes e Profa. Dra. Simone Aparecida Vieira pelas sugestões e aprimoramento da dissertação.

Aos amigos Camila Macrini, João Del Giudice e Juliana José que se dispuseram a ler a dissertação e também contribuíram para o seu aprimoramento.

Ao Cnpq e posteriormente à Fapesp pelas bolsas de mestrado concedidas e à Fapesp pelo financiamento do projeto.

Ao IBAMA, ao Instituto Florestal de São Paulo e aos gestores do Parque Estadual da Serra do Mar pelas autorizações de coleta.

Ao programa de Pós-Graduação em Ecologia da Unicamp.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.

Muito obrigado!

“Nada é mais fatal para o progresso da mente humana do que achar que nossas visões da ciência são definitivas, que nossos triunfos são completos, que não há mistérios na natureza e que não há mundos novos a conquistar”

Humphry Davy

Resumo

Euterpe edulis é uma palmeira tropical ameaçada de extinção que no passado era abundante na Mata Atlântica, desde a planície costeira até 1.000 metros acima do nível do mar. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade e a estrutura genética em populações naturais de *E. edulis* distribuídas em diferentes altitudes dentro de um contínuo florestal. O estudo foi conduzido em uma área de proteção ambiental da Serra do Mar, no litoral norte do estado de São Paulo, onde foram amostrados 300 adultos em seis localidades, denominadas subpopulações. Cada indivíduo foi genotipado com sete locos microssatélite. O número total de alelos foi alto (140) e o número médio de alelos não variou entre as subpopulações. A heterozigosidade total esperada foi de 0,867, variando entre 0,782 e 0,859 entre subpopulações. O índice de fixação foi baixo para todas as subpopulações, concordando com o sistema de reprodução cruzada da espécie. A estruturação espacial genética foi ausente ou muito baixa nas subpopulações analisadas separadamente ou agrupadas. A estrutura genética foi alta ($\theta' = 0,26$) considerando a distância máxima de 32 km entre as subpopulações amostradas. Foram definidos quatro grupos genéticos mais prováveis de acordo com o teste de atribuição dos indivíduos, e cinco grupos de acordo com a AMOVA (Análise de Variância Molecular). O teste de Mantel parcial correlacionou a estrutura genética entre pares de subpopulações com a distância geográfica ($r = 0,8$; $p < 0,05$) e ainda com a diferença altitudinal excluindo o efeito da distância geográfica ($r = 0,5$; $p < 0,05$). Se estas diferenças são causadas pelo fluxo gênico reduzido ou por adaptações locais ainda precisa ser testado em estudos futuros. Este padrão de diferenciação genética em distâncias reduzidas é inesperado dentro de um contínuo florestal, destacando a importância de abordagens em pequena escala para a compreensão das dinâmicas complexas nos sistemas tropicais.

Abstract

Euterpe edulis is an endangered tropical palm, once abundant throughout the Atlantic Forest from the coastal plain up to 1000 meters above sea level. The main purpose of this study was to evaluate the genetic diversity and structure in natural populations of *E. edulis* distributed in different altitudes within a continuous forest. The study was conducted in a protected area of Serra do Mar, at the north coast of São Paulo State, where we sampled 300 adults from six locations. Each individual was genotyped with seven microsatellite loci. The total allele number was high (140) and the mean allele number did not vary between samples. The total expected heterozygosity was 0.867, ranging from 0.782 to 0.859 among samples. The inbreeding coefficient was low in all samples, in accordance with the outcrossing breeding system. The spatial genetic structure was absent or weak at populations analyzed individually or grouped. The genetic structure was high ($\theta' = 0.26$) considering that the maximum distance of 32 km between samples. Four most likely genetic groups were defined according to the assignment test, and five groups according to AMOVA (Analysis of Molecular Variance). A partial Mantel test correlated the pairwise genetic structure with the geographical distance ($r = 0.8$; $p < 0.05$) and also with the pairwise altitudinal differences without the effect of the geographic distances ($r = 0.5$; $p < 0.05$). Whether those differences are mainly due to reduced gene flow or to local adaptation remains to be tested in future studies. This pattern of genetic differentiation at short distances is unexpected within a continuous rainforest, highlighting the importance of small scale approaches to understanding the complex dynamics of tropical systems.

Sumário

Introdução	1
Mata Atlântica	1
Estrutura genética	2
Microssatélites	4
Variação altitudinal	6
<i>Euterpe edulis</i>	8
Objetivo	13
Material e Métodos	14
Local de estudo	14
Amostragem	16
Extração de DNA	20
Amplificação	21
Análise dos dados	23
Resultados	28
Discussão	39
Considerações	48
Conclusões	49
Referências Bibliográficas	50

Introdução

Mata Atlântica

A Mata Atlântica é, provavelmente, uma das formações florestais mais devastadas e mais seriamente ameaçadas do planeta. Devido à intensa exploração e à ocupação humana ocorrida ao longo dos últimos séculos, atualmente restam apenas 11,7% da sua cobertura original (RIBEIRO *et al.*, 2009). As áreas remanescentes são constituídas por inúmeros fragmentos, dos quais os de maior tamanho ocorrem em regiões de difícil acesso e relevo acidentado, como as serras costeiras do Sudeste e Sul do Brasil (HIROTA, 2005). O alto grau de endemismo aliado à grande devastação tornam a Mata Atlântica um dos “*hot-spots*” para a conservação da diversidade biológica mundial (MYERS *et al.*, 2000).

Contudo, a escassez de informações ainda é um fator preocupante para a compreensão e conservação deste bioma. Os estudos sobre a estruturação genética na Mata Atlântica, por exemplo, têm buscado avaliar quais são as consequências da fragmentação do habitat para a diversidade genética das espécies ali confinadas (p.ex.: ALCÂNTARA *et al.*, 2006; FRANCESCHINELLI *et al.*, 2007; SCHWARCZ *et al.*, 2010). Porém, de maneira surpreendente, pouco se sabe, de fato, sobre como se dá a estruturação em florestas naturais contínuas e em escala geográfica reduzida. Dessa forma, é de grande relevância para os planos de conservação avaliar se a estrutura genética observada em uma espécie é consequência de causas naturais, como a heterogeneidade ambiental ou a própria biologia da espécie, ou de ações antrópicas diretas.

Estruturação genética

De maneira geral, a distribuição da variabilidade genética não ocorre de maneira homogênea entre as populações de uma determinada espécie, sendo comum encontrar níveis de diferenciação entre elas (WRIGHT, 1951). Fatores como mutação, seleção natural, migração e deriva genética, bem como fatores históricos e demográficos, afetam a dinâmica e a distribuição dos alelos e ocasionam o que chamamos de estruturação genética (WRIGHT, 1951). Tal estruturação pode ser observada inclusive dentro das populações, no nível dos indivíduos, sendo referida neste caso como estrutura genética espacial.

A causa mais preponderante para a estruturação genética populacional é a limitação do fluxo gênico (WRIGHT, 1931; SLATKIN, 1987). No contexto de fluxo reduzido, as dinâmicas demográficas e evolutivas das populações isoladas seguem de maneira independente, o que possibilita a diferenciação (WRIGHT, 1951). Assim, é esperado que a fragmentação de habitats e a criação de pequenas populações distintas ocasionem a divergência interpopulacional e a erosão da variabilidade genética intrapopulacional devido ao incremento nas taxas de endocruzamento e do efeito da deriva genética (YOUNG *et al.*, 1996).

Para as plantas, a polinização e a dispersão de sementes são etapas determinantes para a conectividade demográfica e genética entre populações (OUBORG *et al.*, 1999). A dispersão de sementes e outros propágulos apresenta efeito crucial para a estrutura genética populacional (SCHUPP & JORDANO, 2011). Em um cenário onde ocorra dispersão de sementes a longa distância, não será esperada

estruturação genética, pois indivíduos aparentados se estabelecerão afastados uns dos outros (VEKEMANS & HARDY, 2004).

A biologia reprodutiva das espécies também contribui fortemente para a estruturação genética populacional. Em geral, as plantas autoincompatíveis tendem a ter uma distribuição mais homogênea dos alelos no espaço, enquanto que plantas autocompatíveis tendem a uma distribuição mais agregada (LOVELESS & HAMRICK, 1984). Além disso, as variações fenológicas individuais, o sucesso reprodutivo diferenciado e os desvios da panmixia durante os eventos reprodutivos podem contribuir para a estruturação, sendo possível inclusive notar diferenciação entre as coortes de uma dada população (LOVELESS & HAMRICK, 1984; CHUNG *et al.*, 2003).

Mesmo em populações contínuas e com grande número de indivíduos reprodutivos é possível observar a distribuição heterogênea dos alelos no espaço. Segundo o modelo de isolamento por distância, a probabilidade de cruzamento entre dois indivíduos depende da distância entre eles e da capacidade da dispersão de seus propágulos (WRIGHT, 1943). Dessa forma, cruzamentos entre indivíduos próximos se tornam mais frequentes, causando desvios da panmixia durante os eventos reprodutivos. Por esse motivo, o tamanho efetivo populacional é frequentemente menor do que o número real de indivíduos na população e a diferenciação genética pode ocorrer além dos limites da vizinhança genética ou deme (WRIGHT, 1938; 1943). Dois indivíduos podem ser considerados como pertencentes a populações genéticas distintas mesmo que não estejam localizados em populações geograficamente distintas.

Além disso, em paisagens heterogêneas, a seleção natural pode favorecer a adaptação local, possibilitando a diferenciação e mesmo o isolamento das populações estabelecidas em manchas de habitat cujas condições ambientais sejam distintas (LINHART & GRANT, 1996; HUFFORD & MAZER, 2003).

Microsatélites

A variabilidade genética pode ser quantificada em uma população por meio de diferentes índices de diversidade, os quais são estimados a partir de marcadores moleculares, ou seja, regiões do genoma onde o polimorfismo é detectável (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os microsatélites, por exemplo, são sítios do DNA com alto polimorfismo de tamanho. São constituídos por um motivo, de 1 a 6 pares de bases, que se repete em tandem por um número variável de vezes (TAUTZ, 1989). Estes marcadores moleculares são bastante abundantes e amplamente distribuídos nos genomas eucariotos. Grande parte deles está localizada em regiões não expressas do DNA, consideradas seletivamente neutras (LI *et al.*, 2002; ELLEGREN, 2004). A função biológica dos microsatélites ainda não é totalmente compreendida, entretanto, alguns estudos demonstram a sua participação na organização da cromatina e, em certos casos, na regulação gênica (LI *et al.*, 2002).

Os microsatélites possuem altas taxas de mutação, variando de 10^{-2} a 10^{-6} eventos por loco por geração, em comparação às regiões codificantes do genoma, que apresentam taxas de mutação entre 10^{-9} e 10^{-10} (ELLEGREN, 2000; WHITTAKER *et al.*, 2003). Tais taxas mutacionais elevadas são provocadas pelo pareamento incorreto das

fitas molde e complementar durante a replicação gênica, bem como pelo pareamento desigual das cromátides durante a meiose (LI *et al.*, 2002).

Os altos níveis de polimorfismo associados à neutralidade, à expressão codominante e à relativa facilidade de análise em laboratório, tornam os microssatélites ferramentas ideais para análises genética populacionais. Desde a sua descrição, as estimativas de estrutura e fluxo gênico, endogamia, hibridização, análise de paternidade, mapeamento genético, dentre inúmeras outras análises, vêm sendo predominantemente realizadas utilizando-se este tipo de marcador molecular (AVISE, 2004; SELKOE & TOONEN, 2006).

Contudo, os mecanismos de surgimento e evolução dos microssatélites ainda não são perfeitamente compreendidos. Dois modelos de evolução são frequentemente discutidos na literatura: o Modelo de Alelos Infinitos – *Infinite Allele Model* (IAM; KIMURA & CROW, 1964) e o Modelo de Mutação por Passos – *Stepwise Mutation Model* (SMM; KIMURA & OHTA, 1978). Segundo o IAM, as mutações nos microssatélites resultariam da adição ou subtração de um ou mais motivos repetitivos, gerando alelos nunca antes encontrados na população. Já segundo o SMM, as mutações resultariam da adição ou subtração de um único motivo repetitivo ao microssatélite e os alelos nascentes poderiam ser equivalentes a formas já existentes na população, ou seja, idênticos por estado, mas não por descendência. Adicionalmente, o primeiro modelo assume a ausência de limites para o incremento do tamanho dos microssatélites, enquanto que o segundo assume a existência de um tamanho máximo possível.

Embora tais modelos de mutação e evolução dos microssatélites sejam os mais discutidos, outros modelos já foram propostos e parecem igualmente, ou até mais,

adequados. O Modelo de Duas Fases – *Two-Phase Model* (TPM; DI RIENZO *et al.*, 1998), por exemplo, permite a adição ou subtração de um único motivo repetitivo com probabilidade p e a adição ou inclusão de mais de um motivo com probabilidade $1-p$. Já o Modelo de Escorregamento Proporcional – *Proportional Slippage* (PS; KRUGLYAK *et al.*, 1998; CALABRESE *et al.*, 2001) assume taxas de mutação mais altas para microssatélites mais longos.

Variação altitudinal

As mudanças altitudinais podem afetar diretamente a distribuição da variabilidade genética entre as populações de uma dada espécie (GONZALO-TURPIN & HAZARD, 2009; HERRERA & BAZAGA, 2008; PREMOLI, 2003). Embora a altitude em si não seja considerada uma variável influente para as dinâmicas biológicas, os diversos fatores ambientais covariantes constituem um gradiente complexo (KÖRNER, 2007). Dentre estes fatores podem ser destacados: temperatura, umidade do ar, precipitação, disponibilidade de luz, declividade, profundidade do solo e suas características físicoquímicas (GRUBB, 1977; SOUSA-NETO *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2011).

Ohsawa & Ide (2008), em uma revisão da literatura, reportaram quatro padrões de distribuição da diversidade genética ao longo de gradientes altitudinais. No primeiro, encontrado em 26% dos estudos, existe maior diversidade genética nas populações intermediárias do gradiente, onde as condições de sobrevivência são ótimas em relação aos extremos. No segundo, encontrado em 19% dos estudos, existe menor diversidade nas populações mais altas, onde as condições são mais extremas e o tamanho populacional é reduzido. No terceiro, encontrado em 24% dos estudos,

existe maior diversidade nas populações mais altas, onde a adaptação local favorece a diversificação e onde os impactos humanos são menos severos, além de possuírem taxas de mutação incrementadas devido à maior incidência da radiação solar. E no último padrão, encontrado em 29% dos estudos, não há variação da diversidade genética entre as altitudes. Já em relação à estruturação genética, ela pode variar entre forte, fraca e ausente ou ainda ser restrita a apenas certos alelos. Segundo os autores, as divergências fenológicas e a adaptação local são os principais promotores da diferenciação populacional.

No Brasil, a Serra do Mar é um importante cinturão orogênico que se estende por cerca de 1.000 km, entre os estados do Rio de Janeiro e de Santa Catarina. Nos estados do Paraná e Rio de Janeiro é vista como uma cadeia de montanhas enquanto que no estado de São Paulo se mostra como uma borda de planalto que se eleva do nível do mar a altitudes entre 800 e 1.200 m (ALMEIDA & CARNEIRO, 1998). A Mata Atlântica ainda recobre boa parte desse maciço, sendo possível notar mudanças na comunidade vegetal acompanhando o gradiente altitudinal (LACERDA, 2001; BLUM *et al.*, 2011a; 2011b; ASSIS *et al.*, 2011; PADGURSCHI *et al.*, 2011; PRATA *et al.*, 2011; GOMES, *et al.*, 2011). Grande parte das espécies vegetais estabelecidas na Serra do Mar está limitada a uma determinada amplitude altitudinal, podendo-se destacar *Euterpe edulis*, *Schefflera angustissima*, *Garcinia gardneriana* e *Campomanesia guaviroba* como algumas das poucas com distribuição relativamente homogênea ao longo de todo o gradiente (LACERDA, 2001).

Euterpe edulis

Euterpe edulis Martius (Arecaceae), popularmente conhecida por juçara, içara ou palmitheiro, dentre várias outras denominações, tem área de ocorrência ao longo de quase todo o domínio da Mata Atlântica, do sul da Bahia ao norte do Rio Grande Sul no litoral, adentrando para o interior do continente nas regiões sul e sudeste, até o oeste do Paraná, norte da Argentina e leste do Paraguai (REIS *et al.*, 2000). Na Floresta Ombrófila Densa, ocorre em grande abundância desde a planície litorânea até o topo dos morros, em altitudes superiores a 1.000 m. Já nas demais formações florestais é mais frequentemente observada em áreas úmidas como as encostas protegidas, vales e matas ciliares (HENDERSON & GALEANO, 1996; REIS *et al.*, 2000).

É uma palmeira com estipe solitário que alcança entre 10 e 20 m de altura e 8 e 20 cm de diâmetro a altura do peito (Fig. 1). Os adultos apresentam de 10 a 20 folhas alternas e pinadas cujas bainhas formam uma coroa fechada (HENDERSON & GALEANO, 1996). No interior da coroa encontram-se folhas imaturas e o meristema apical que, em conjunto, constituem o palmito. Por oferecer este produto de ótima qualidade gastronômica, a espécie foi intensamente explorada e atualmente está incluída na “Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção” (MMA, 2008), uma vez que a extração do meristema apical acarreta a morte do indivíduo. Atualmente, as populações naturais remanescentes estão restritas a localidades de difícil acesso e unidades de conservação, especialmente nas regiões da Serra do Mar e do vale do Ribeira no estado de São Paulo (REIS *et al.*, 2000).

Devido às altas densidades populacionais que podem ser alcançadas, *E. edulis* é considerada uma espécie de grande importância para a comunidade em diversos

estudos florísticos e fitossociológicos (JARENKOW & WAECHTER, 2001; DIAS, 2005; TEIXEIRA & ASSIS, 2005; GOMES *et al.*, 2011). Frequentemente, a estrutura etária populacional da espécie é do tipo J-reverso, ou seja, com predomínio de indivíduos juvenis em relação ao número de adultos (SILVA, 1991; REIS, 1995). E, embora não haja a formação de um banco de sementes no solo (BOVI & CARDOSO, 1978) é possível observar, em certos casos, a formação de um banco de plântulas no qual os indivíduos podem permanecer por algum tempo (REIS, 1995). Em situação de cultivo, os indivíduos atingem a maturidade reprodutiva em torno dos sete anos de idade, contudo as taxas de desenvolvimento no interior da floresta podem ser mais lentas. Fisch *et al.* (2000) reportam indivíduos reprodutivos com altura mínima de 10 m, enquanto Silva (1991) reporta indivíduos com apenas 3,5 m já se reproduzindo.



Figura 1. Indivíduo adulto de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaeae) com inflorescência exposta. Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, SP.

A floração ocorre no início da estação chuvosa e dura entre quatro e cinco meses (FAVRETO, 2010). As inflorescências são compostas por flores unissexuais masculinas e femininas (REITZ, 1974) que se abrem em períodos distintos: a antese feminina ocorre em torno de sete dias após a masculina (MANTOVANI & MORELLATO, 2000). Entretanto, acredita-se que a autofecundação possa ocorrer quando um mesmo indivíduo emite duas ou mais inflorescências simultaneamente e elas estejam em

estágios de maturação distintos (MANTOVANI & MORELLATO, 2000). A polinização é feita por uma grande variedade de insetos (REIS *et al.*, 1993; MANTOVANI, 1998), destacando-se a atuação da abelha *Trigona spinipes*, cujos voos, em geral, são de curta distância (REIS *et al.*, 1993). Ainda, é sugerida a ocorrência de anemofilia, especialmente entre os indivíduos que alcançam o dossel (MANTOVANI & MORELLATO, 2000).

A frutificação ocorre na estação seca e pode durar até seis meses (FAVRETO, 2010). Os frutos são globosos, com 10 a 15 mm de diâmetro, e são consumidos por uma variedade de vertebrados, em especial aves e mamíferos de pequeno e médio portes, cujas capacidades dispersivas são bastante variáveis (GALETTI *et al.*, 1999; REIS & KAGEYAMA, 2000). Em geral, a chuva de sementes ocorre concentrada próxima à planta-mãe e as distâncias média e máxima de dispersão descritas são de 6 e 60 m respectivamente (REIS, 1995), embora haja indícios que ela possa ocorrer a distâncias de até 20 km (GAIOTTO *et al.*, 2003).

Devido a sua grande relevância ecológica e econômica, *E. edulis* é uma das espécies melhor estudadas da Mata Atlântica. As análises genéticas realizadas até o momento apontam que a espécie detém grande diversidade genética e, em geral, pequena estruturação entre as populações (REIS, 1996; CARDOSO *et al.*, 2000; GAIOTTO *et al.*, 2003; CONTE *et al.*, 2003; DIAS-FILHO, 2006; SEOANE, 2007; CONTE *et al.*, 2008; MARTINS-CORDER *et al.*, 2009). Em relação a marcadores alozímicos, Reis (1996) encontrou F_{ST} de 0,031 para populações separadas por até 500 km de distância e F_{ST} de 0,014 para duas populações distantes 9 km em uma mata contínua. Já Martins-Corder *et al.* (2009) encontraram F_{ST} de 0,04 entre populações distantes

entre 25 e 280 km, situadas em diferentes tipos florestais. Em relação a marcadores microssatélites, Gaiotto *et al.* (2003) relatam F_{ST} de 0,06 e R_{ST} de 0,07 para populações em duas matas ciliares do Cerrado distantes 22 km, enquanto que Conte *et al.* (2008) reportam G_{ST} variando entre 0,013 e 0,038 e R_{ST} entre 0,004 e 0,091 para quatro populações localizadas em fragmentos cujas distâncias variavam de 2 a 150 km. Em contraste com os demais estudos, Cardoso *et al.* (2000), utilizando marcadores AFLP, observaram um F_{ST} de 0,426 entre populações variando entre 40 e 1700 km de distância, distribuídas ao longo do litoral brasileiro. Apesar destes estudos, pouco se sabe sobre a estruturação genética em escala local em populações naturais contínuas e qual a real influência da variação altitudinal sobre a dinâmica gênica da espécie.

Objetivos

Frequentemente os estudos de diversidade genética em espécies arbóreas tropicais tratam de populações fragmentadas e/ou de grandes extensões geográficas. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar, em uma escala geográfica reduzida, a diversidade e a estruturação genética em populações naturais de *Euterpe edulis* (Arecaceae) distribuídas em diferentes altitudes dentro de um contínuo florestal da Mata Atlântica. Considerando-se o grau de preservação da área de estudo e a escala geográfica abordada, esperava-se encontrar grande diversidade genética e pequena diferenciação entre as localidades amostradas, sendo esta diferenciação fortemente relacionada à variação altitudinal.

Materiais e Métodos

Local de estudo

O estudo foi realizado no litoral norte do estado de São Paulo, nos Núcleos Picinguaba e Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), onde há variação altitudinal expressiva em uma pequena escala geográfica.

O PESM, criado pelo Decreto Estadual n.º 10.251, de 30 de agosto de 1977, abriga o maior remanescente contínuo de Mata Atlântica do país, com cerca de 315.000 ha, e se estende do município de Ubatuba, no litoral norte do estado de São Paulo, até o município de Itariri, no litoral sul, abrangendo um total de 15 municípios. Devido à sua grande extensão, o parque é gerido por oito núcleos administrativos.

O Núcleo Picinguaba está localizado no município de Ubatuba (23° 31' a 23° 34' S e 45° 02' a 45° 05' W) e possui uma área com cerca de 47.500 ha, com altitudes de zero a 1300m acima do nível do mar. O clima da região é classificado como tropical úmido (SETZER, 1966), com precipitação média anual superior a 2.200mm. A vegetação local apresenta diferentes fisionomias que acompanham a variação do relevo (ASSIS, 1999; SANCHEZ *et al.*, 1999; BERTONCELLO, 2009; PRATA *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2011). Na floresta Submontana as famílias mais ricas em espécies são: Myrtaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Lauraceae e Sapotaceae, havendo o predomínio de indivíduos das famílias Rubiaceae, Myrtaceae e Arecaceae (GOMES *et al.*, 2011).

Já o Núcleo Santa Virgínia é partilhado pelos municípios de São Luiz do Paraitinga, Cunha, Natividade da Serra e Ubatuba (23° 17' a 23° 24'S e 45° 03' a 45° 11' W) e possui uma área de cerca de 17.500 ha, cuja altitude varia de 850 e 1.100 m. O clima é tropical temperado sem estação seca, com precipitação média anual

superior a 2.000 mm e nenhum mês com precipitação média inferior a 60 mm (SETZER, 1966). A presença de neblina é frequente ao longo de todo o ano e a vegetação predominante é do tipo Floresta Ombrófila Densa Montana (TABARELLI & MANTOVANI, 1999; PADGURSCHI *et al.*, 2011). As famílias mais ricas em espécies são: Myrtaceae, Lauraceae, Fabaceae e Monimiaceae, havendo predomínio de indivíduos das famílias Arecaceae (sendo *E. edulis* a principal espécie), Myrtaceae e Lauraceae (PADGURSCHI *et al.*, 2011).

Até a criação do PESM, vários pontos da floresta em ambos os núcleos haviam sofrido extração seletiva de madeira, corte raso, queima ou transformados em áreas agrícolas e pastagens. Atualmente, a floresta se apresenta como um mosaico composto por áreas de floresta madura entremeadas por áreas de floresta secundária em diferentes estágios de regeneração. Informações detalhadas sobre a composição e a abundância de espécies arbóreo-arbustivas em florestas com diferentes idades no núcleo Santa Virginia podem ser obtidas em Tabarelli *et al.* (1994), Tabarelli (1997) e Tabarelli & Mantovani (1999).

A fauna local é bastante rica sendo encontrados inclusive mamíferos de médio porte como catetos (*Tayassu tajacu*), queixadas (*Tayassu pecari*), antas (*Tapirus terrestris*) e onças-pardas (*Puma concolor*), principalmente nas regiões nucleares do parque (MARQUES, 2004; PINHEIRO & GEISE, 2008; INSTITUTO FLORESTAL DE SÃO PAULO, 2006). São registradas 254 espécies de aves naquela região, sendo que 33 delas estão ameaçadas de extinção (GOERCK, 1999), e 111 espécies de mamíferos em todo o parque, sendo 21 ameaçadas de extinção (INSTITUTO FLORESTAL DE SÃO PAULO, 2006).

Embora a vigilância tenha aumentado nos últimos anos na área estudada, ainda são relatadas atividades ilegais de caça e extração de palmito, principalmente no núcleo Picinguaba, nas regiões próximas à zona urbana e às inúmeras comunidades que vivem nos limites ou mesmo no interior do parque (MARQUES, 2004; e observações pessoais).

Amostragem

Para a análise de diversidade e estrutura genética em *E. edulis* foram amostradas seis localidades em diferentes altitudes do PESH, nas Florestas Ombrófila Densa Submontana e Montana (Figs. 2 e 3; Tab. 1). Uma vez que tais localidades pertenciam a um contínuo populacional, elas foram denominadas subpopulações. As subpopulações A e B estavam localizadas em uma mesma encosta, e juntas foram denominadas região AB, enquanto que as subpopulações C, D, E e F estavam localizadas em uma outra encosta, e juntas foram denominadas região CDEF. A subpopulação A, no passado, sofreu exploração de palmito. Já a área em que se encontra a subpopulação C, há cerca de 40 anos, passou por um processo de extração seletiva de madeira e exploração de palmito. Atualmente, devido à proximidade ao bairro Taquaral da cidade de Ubatuba, ainda sofre exploração ilegal de palmitos, não sendo observados muitos indivíduos de *E. edulis* com grande porte (acima de 10 m). A subpopulação D, um pouco mais distante, também está sujeita à exploração ilegal de palmito, mas em menor intensidade.

Em cada subpopulação, 50 indivíduos adultos contíguos foram amostrados e mapeados de acordo com o sistema de posicionamento global, por meio de um

receptor GPS, modelo GPSMAP 76Csx Garmin®. O erro médio do georreferenciamento variou entre 2 e 8 m, chegando em alguns casos a 12 m dependendo da abertura do dossel e da orientação da encosta. Foram considerados adultos os indivíduos com mais de seis metros de altura e evitou-se exceder 50 m de variação altitudinal em cada subpopulação. De cada indivíduo amostrado foi retirado um fragmento de 5 cm de comprimento de raiz para a extração do material genético (Fig. 4). Os tecidos radiculares ficaram em refrigeração durante o período de coleta e mantidos a -80°C até o momento da extração do DNA.

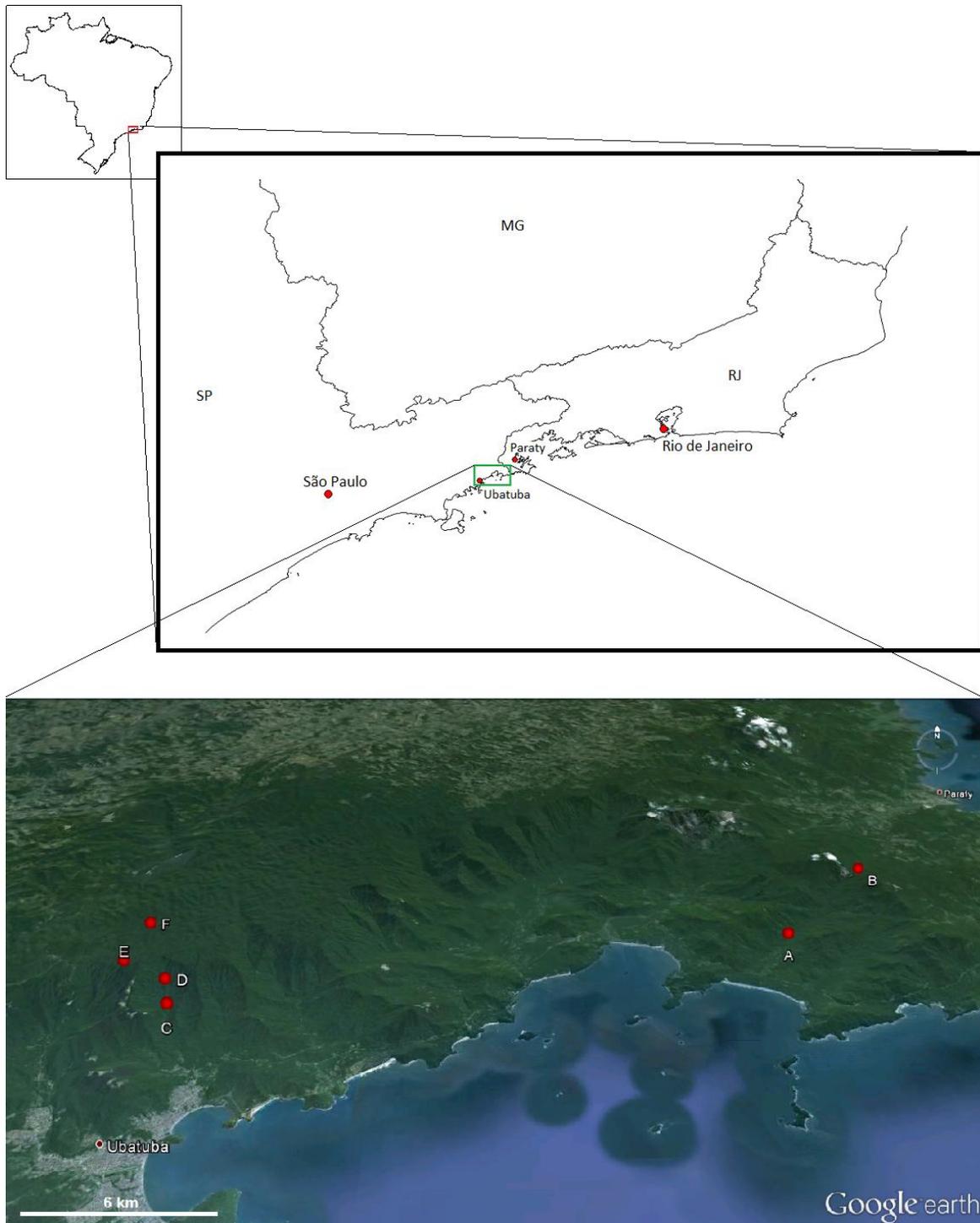


Figura 2. Localização das seis subpopulações de *Euterpe edulis* Mart., amostradas na Serra do Mar para análises de diversidade e estrutura genética. A, B, C, D, E e F identificam as seis subpopulações.

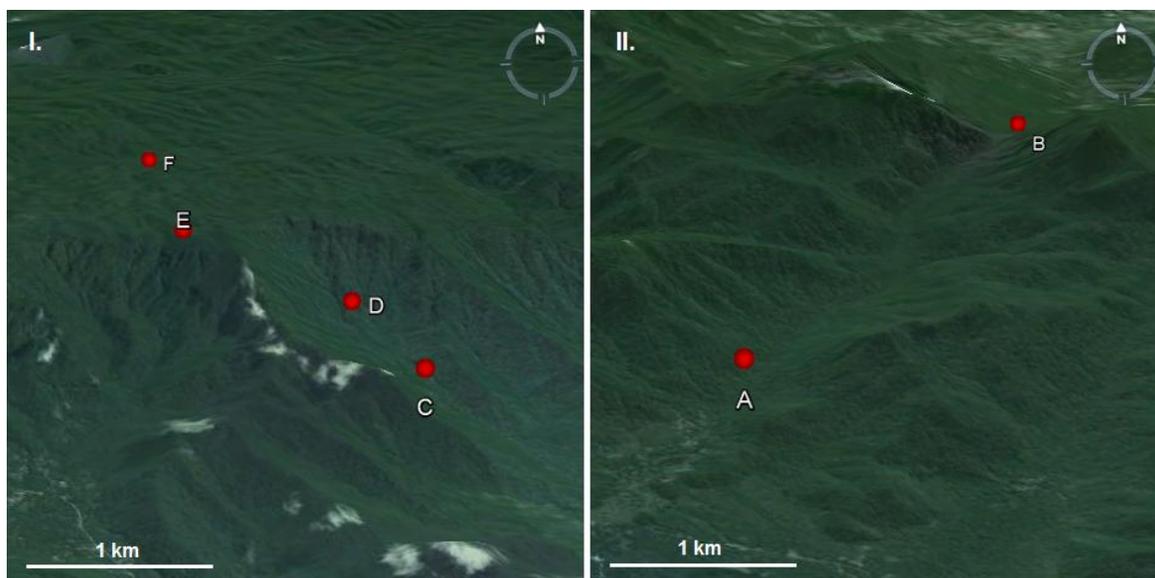


Figura 3. Detalhes da conformação do relevo e localização das seis subpopulações de *Euterpe edulis* Mart., amostradas na Serra do Mar para análises de diversidade e estrutura genética. I.) região CDEF; II.) região AB. A, B, C, D, E e F identificam as subpopulações.

Tabela 1. Altitudes médias e coordenadas geográficas das seis subpopulações de *Euterpe edulis* Mart. amostradas na Serra do Mar para análises de diversidade e estrutura genética. (m.a.n.m = metros acima do nível do mar)

Subpopulação	Altitude (m.a.n.m)	Latitude	Longitude
A	70	23°20'4.20"S	44°49'59.09"O
B	815	23°17'48.91"S	44°47'31.13"O
C	200	23°22'31.08"S	45° 4'55.38"O
D	460	23°21'53.93"S	45° 5'7.19"O
E	1045	23°21'33.59"S	45° 6'7.92"O
F	995	23°20'13.85"S	45° 5'56.94"O



Figura 4. Detalhe das raízes adventícias de *Euterpe edulis* Mart. no Parque Estadual da Serra do Mar, Ubatuba, SP. Foto: Ana L. S. Albino.

Extração de DNA

No momento da extração, os tecidos foram banhados em nitrogênio líquido e fragmentados com um martelo e, em seguida, pulverizados em almofariz novamente na presença de nitrogênio líquido. Cerca de 200 mg de tecido radicular foram utilizados, sendo o excedente armazenado como estoque. Utilizou-se o protocolo de extração de DNA de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998). Ao tecido macerado transferido para um tubo de 1,5 mL foram adicionados 700 μ L de tampão de extração

[CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; Polyvinylpyrrolidone 1% (p/v); 2-mercaptoetanol 2% (v/v) adicionado imediatamente antes do uso] e incubado em banho-maria a 60°C por 60 minutos. Durante a incubação, o tubo foi agitado a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão. Em seguida, foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) e misturados suavemente por inversão durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos. A fase superior aquosa foi delicadamente aspirada e transferida para outro tubo, novamente centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos e transferida para um novo tubo, a fim de se evitar quaisquer vestígios de parede celular que porventura ainda estivessem em suspensão. Em seguida, foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado (-20°C) ao sobrenadante e misturados suavemente por inversão. A solução foi incubada a -20°C por 60 minutos e centrifugada a 7.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes em 1 mL de etanol 70%, por dez minutos cada, e uma vez em 1 mL de etanol absoluto por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco ao ar. Por fim, o precipitado contendo o DNA foi ressuspenso em tampão TE [10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7.4]. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

Amplificação

Para as análises genéticas, foram usados oito locos microssatélites: EE3, EE15, EE23, EE41, EE47, EE48, EE52 e EE59, descritos por Gaiotto (2001). Para reduzir os custos da genotipagem, optou-se por seguir o método proposto por Schuelke (2000)

com algumas modificações. O método consiste na adição de uma sequência nucleotídica conhecida à extremidade 5' do *primer forward* de cada loco. A reação de amplificação se inicia normalmente, com a temperatura de anelamento dos *primers* originais e, ao final de certo número de ciclos, um “terceiro” *primer*, cuja sequência é idêntica àquela incluída na extremidade 5', mencionada anteriormente, é adicionado. Este *primer* é marcado com um fluoróforo e é comum a todos os locos. Submete-se então a reação a novos ciclos de amplificação com a temperatura de anelamento específica do último *primer*, que resultará na incorporação do fluoróforo aos microssatélites recém-amplificados. Este protocolo torna desnecessário o gasto com a síntese de vários *primers* marcados, sendo necessária a síntese de apenas um, o qual será comum a todos os locos.

As reações de amplificação (PCR's) foram realizadas em um volume de 15 μL , contendo 10-20 ng de DNA genômico; 1,5 μL de tampão para PCR (a empresa Fermentas fornece duas opções de tampão com diferentes composições que foram utilizados de acordo com a tabela 2); MgCl_2 nas concentrações indicadas na tabela 2; 1,5 μg de BSA, 260 μM de dNTP's; 0,1 μM de *primer forward*; 0,1 μM de *primer reverse*; DMSO 2%; 1 U de DNA-polimerase (Taq DNA Polymerase, Fermentas) e água milli-Q em quantidade suficiente para completar o volume. As PCR's seguiram o seguinte programa: 94°C por 1 minuto; 15 ciclos de 94°C por 45 segundos, a temperatura de anelamento específica de cada loco, tabela 2, por 45 segundos e 72°C por 45 segundos. Ao final do processo as PCR's foram interrompidas e foi adicionado em cada uma delas o volume de 1,5 μL de solução contendo 200 μM de *primer* corado com fluoróforo (6-FAM, VIC, PET ou NED); 130 μM de *primer reverse* específico do loco; 100 μM de

dNTP's; 0,25 U de DNA-polimerase e água milli-Q em quantidade suficiente para completar o volume. As reações foram submetidas a um novo processo de amplificação com o seguinte programa: 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; e 1 ciclo final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados em um analisador automático, modelo ABI 3130XL (Applied Biosystems), e tiveram seus tamanhos aferidos com o programa GeneMarker, versão 1.95 (SoftGenetics LLC), tendo como escala comparativa o GeneScan 500LIZ (Applied Biosystems).

Tabela 2. *Primers*, tipo de tampão, concentração final de MgCl₂ e temperatura de anelamento (T_A) utilizados para a amplificação dos microssatélites de *Euterpe edulis* Mart.

<i>Primers</i>	Tipo de Tampão	MgCl ₂ (mM)	T _A (°C)
EE3	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	56
EE15	KCl	3	56
EE23	KCl	3	56
EE41	(NH ₄) ₂ SO ₄	4	48
EE47	KCl	3	56
EE48	KCl	3	56
EE52	(NH ₄) ₂ SO ₄	3	57
EE59	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5	58

Análise dos dados

As análises genéticas foram realizadas com base nos dados de sete locos microssatélites, visto que o loco EE15 apresentou um padrão multibandas que inviabilizou a genotipagem adequada dos indivíduos.

A princípio, foi verificado se os locos analisados estavam em equilíbrio de ligação com o *software* Genepop 4.1.1 (ROUSSET, 2008). Utilizou-se a correção

sequencial de Bonferroni para avaliar as significâncias. Em seguida, os seguintes índices de diversidade genética foram estimados para cada subpopulação: número médio de alelos por locos (\hat{A}), heterozigosidades observada (\hat{H}_o) e esperada sob equilíbrio de Hardy-Weinberg (\hat{H}_e) e índice de fixação (\hat{f}). Os três primeiros índices foram calculados utilizando-se o *software* Arlequin v3.5.1.2 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) enquanto o último foi calculado com o Fstat v2.9.3.2 (GOUDET, 2002). A significância do índice de fixação foi testada por 1.000 reamostragens. As frequências alélicas para cada loco foram estimados com o *software* Fstat. A presença de alelos exclusivos foi avaliada com o *software* GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2001) considerando: subpopulações isoladamente, subpopulações agrupadas em regiões (AB *versus* CDEF) e apenas subpopulações A, B, C e F, cujas distâncias geográficas e diferenças altitudinais são próximas e o tamanho amostral equivalente. Para facilitar o processo, os diferentes arquivos de entrada específicos para cada *software* de análise foram originados como o auxílio do *software* Create v1.35 (COOMBS *et al.*, 2008).

A estrutura genética espacial foi analisada estimando-se o coeficiente de parentesco (F_{ij}) entre pares de indivíduos (LOISELLE *et al.*, 1995), em três níveis: para as subpopulações separadamente, para a região CDEF e para o total de indivíduos amostrados. Tal análise foi realizada com o auxílio do *software* SPAGeDi v1.3 (HARDY & VEKEMANS, 2002). Os pares de indivíduos foram agrupados em intervalos de distância geográfica que variaram da seguinte forma: intervalos de 7,5 m para as subpopulações E e F e de 15 m para as subpopulações A, B, C e D; e intervalos crescentes exponencialmente (base 2 e expoente 2) para a região CDEF e para o total da população. Para avaliar se os coeficientes de parentesco estavam relacionados com

as distâncias geográficas, foram calculados os valores médios para cada intervalo de distância e então realizadas regressões lineares em relação ao logaritmo das distâncias geográficas. O erro padrão para o coeficiente médio em cada classe de distância foi estimado por reamostragens *jackknife*. O intervalo de confiança (IC = 95%) e as significâncias dos coeficientes médios de parentesco e do coeficiente de regressão (*b-log*) foram estimados por 20.000 permutações entre genótipos e posições espaciais. Os resultados foram apresentados em correlogramas. A intensidade da estrutura genética espacial foi avaliada pelo coeficiente de intensidade $S_p = -b\text{-log}/(F_1-1)$ (VEKEMANS & HARDY 2004), onde F_1 é o coeficiente de parentesco médio da primeira classe de distâncias.

A estrutura genética populacional foi avaliada pelos estimadores θ (WEIR & COCKERHAM, 1984) e R_{ST} (SLATKIN, 1995), calculados com os *softwares* Fstat e Arlequin. O primeiro estimador assume o IAM (*Infinite Allele Model*) de evolução, enquanto o segundo, desenvolvido especificamente para microssatélites, assume o SMM (*Stepwise Mutation Model*). Uma vez que ambos os estimadores podem gerar resultados enviesados quando tratam de locos altamente polimórficos (HEDRICK, 2005), o estimador θ foi relativizado (θ') considerando o valor máximo que ele poderia alcançar ($\theta' = \theta / \theta_{máx}$), dada a heterozigosidade observada. O valor de $\theta_{máx}$ foi estimado a partir dos dados reconfigurados pelo o *software* RecodeData v0.1 (MEIRMANS, 2006). A comparação entre os pares de subpopulações foi realizada para os três diferentes estimadores e a significância estimada por 10.000 permutações.

Adicionalmente foi realizado um teste de atribuição dos indivíduos a grupos genéticos, utilizando-se uma abordagem bayesiana. Nesta análise, é avaliada a

probabilidade de um determinado indivíduo pertencer a um dado grupo genético a partir da sua constituição genotípica. Para isso, foi utilizado o *software* Structure (PRITCHARD *et al.*, 2000) assumindo-se o modelo de ancestralidade misturada, com alelos correlacionados e número de grupos (K) variando de um a nove. Para cada valor de K foram realizadas 20 replicações independentes, cada uma delas com 800.000 iterações da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) e *burn-in* de 200.000 iterações. Para a detecção do K mais provável, foi usada a estatística descrita por Evanno *et al.* (2005), utilizando-se o aplicativo Structure Harvester v. 0.6.92 (EARL & VONHOLDT, 2012).

A análise da estruturação genética ainda foi complementada pela Análise Molecular de Variância (AMOVA; EXCOFFIER *et al.*, 1992; EXCOFFIER, 2001) hierárquica. Para isso, as subpopulações foram agrupadas e comparadas de diferentes maneiras, seguindo aproximadamente os padrões de diferenciação observados no teste de atribuição. Foi considerada como a estruturação mais provável aquela em que as comparações geraram maior variação entre grupos de subpopulações do que dentro dos grupos.

Em seguida, foi avaliado se a estrutura genética observada para os estimadores θ e θ' estava relacionada com a distância geográfica e/ou a distância altitudinal. Para isso, foram calculadas as distâncias euclidianas entre os pares de subpopulações e as diferenças altitudinais entre elas, daqui em diante denominadas distâncias altitudinais (Tab. 3). Foram realizados testes de Mantel para avaliar a correlação entre as seguintes matrizes: distância geográfica *versus* distância altitudinal, estruturação genética *versus* distância geográfica e estruturação genética *versus* distância

altitudinal. Posteriormente, foram realizados testes de Mantel parciais para avaliar a correlação entre a matriz de estruturação genética *versus* distância geográfica, com o efeito da distância altitudinal controlado, e a correlação entre a matriz de estruturação genética *versus* distância altitudinal, com o efeito da distância geográfica controlado. Os testes foram realizados com o *software* Arlequin e a significância das correlações acessada por 100.000 permutações.

Tabela 3. Distâncias entre as seis subpopulações de *Euterpe edulis* Mart., em metros, amostradas na Serra do Mar para análises de diversidade e estrutura genética. Acima da diagonal: distâncias geográficas (distâncias euclidianas). Abaixo da diagonal: distâncias altitudinais (diferenças altitudinais).

	A	B	C	D	E	F
A		5922	25820	25970	27610	27170
B	745		30870	30890	32430	31680
C	130	615		1194	2717	4584
D	390	355	260		1833	3399
E	975	230	845	585		2483
F	925	180	795	535	50	

Resultados

Um total de 300 indivíduos adultos de *E. edulis* foram amostrados em campo, porém apenas 298 apresentaram amplificação satisfatória e foram analisados. Os locos microssatélites utilizados não apresentaram desequilíbrio de ligação e, portanto, foram considerados amostras independentes do genoma. Para o conjunto de sete locos, foram amostrados 140 alelos considerando a população total (Tab. 4). O loco EE41 foi o menos polimórfico, com 15 alelos, e o loco EE23 o mais polimórfico, com 26 alelos. O número de alelos variou de 85 a 97 por subpopulação (Tab. 4), não havendo diferença significativa entre elas (Kruskal-Wallis; $H = 1,50$; $p > 0,05$). A média de alelos por locos por subpopulação foi de 12,88. A heterozigosidade esperada, \bar{H}_e , total foi de 0,835, com valor mínimo de 0,782 e máximo de 0,859 (Tab. 5), não havendo diferença significativa entre as subpopulações (Kruskal-Wallis; $H = 2,01$; $p > 0,05$). O índice de fixação, \hat{f} , médio não foi significativo e, para as subpopulações separadamente, foi significativo apenas em C e F, com valores de 0,043 e 0,051 (Tab. 5). As frequências alélicas variaram entre as subpopulações, havendo poucos alelos com frequência relativa superior a 0,2 em cada uma delas (Fig. 5). O total de alelos exclusivos foi de 26 (Tab. 6), variando entre 1 e 8 por subpopulação, sem diferença significativa entre elas (Kruskal-Wallis; $H = 7,55$; $p > 0,05$). A frequência dos alelos exclusivos nas subpopulações em geral foi baixa, alcançando o valor máximo 0,08 em dois casos. Quando as subpopulações foram agrupadas, a região AB apresentou 16 alelos exclusivos e a região CDEF apresentou 24 (Tab. 7). Quando comparadas apenas as subpopulações extremas A, B, C e F foram observados 7, 10, 6 e 11 alelos exclusivos, respectivamente.

Tabela 4. Número de alelos por loco microssatélite e por subpopulação de *Euterpe edulis* Mart. amostrada.

Subpopulação	EE3	EE23	EE41	EE47	EE48	EE52	EE59	TOTAL
A	12	15	8	13	9	16	12	85
B	14	17	7	16	13	19	11	97
C	13	14	8	12	15	15	9	86
D	13	14	13	13	13	15	9	90
E	10	15	11	14	15	13	12	90
F	13	17	11	14	12	15	11	93
TOTAL	17	26	15	22	21	23	16	140

Tabela 5. Índices de diversidade genética para as seis subpopulações de *Euterpe edulis* Mart. amostradas. N = número médio de indivíduos; \hat{A} = número médio de alelos por loco; \hat{H}_e = heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \hat{H}_o = heterozigosidade observada; \hat{f} = índice de fixação. Valores em negrito são significativamente diferentes de zero ($p < 0,05$).

Subpopulação	N	\hat{A}	\hat{H}_e	\hat{H}_o	\hat{f}
A	49,85	12,14	0,782	0,779	0,004
B	48,85	13,85	0,851	0,851	0,000
C	48,71	12,28	0,827	0,792	0,043
D	49,42	12,85	0,856	0,844	0,014
E	47,71	12,85	0,835	0,845	-0,012
F	49,71	13,28	0,859	0,816	0,051
Média	49,04	12,88	0,835	0,821	0,017

Tabela 6. Número de alelos exclusivos por loco microssatélite e por subpopulação de *Euterpe edulis* Mart.

Subpopulação	EE3	EE23	EE41	EE47	EE48	EE52	EE59	TOTAL
A	1	1	0	1	0	2	1	6
B	1	3	0	1	1	2	0	8
C	0	1	1	1	1	1	0	5
D	0	0	1	0	0	0	0	1
E	0	0	1	0	1	0	1	3
F	1	0	0	1	0	0	1	3
TOTAL	3	5	3	4	3	5	3	26

Tabela 7. Número de alelos exclusivos por loco microssatélite e por agrupamento de subpopulações de *Euterpe edulis* Mart em regiões.

Região	EE3	EE23	EE41	EE47	EE48	EE52	EE59	Total
AB	2	5	0	3	1	4	1	16
CDEF	2	5	6	3	5	1	2	24
TOTAL	4	10	6	6	6	5	3	40

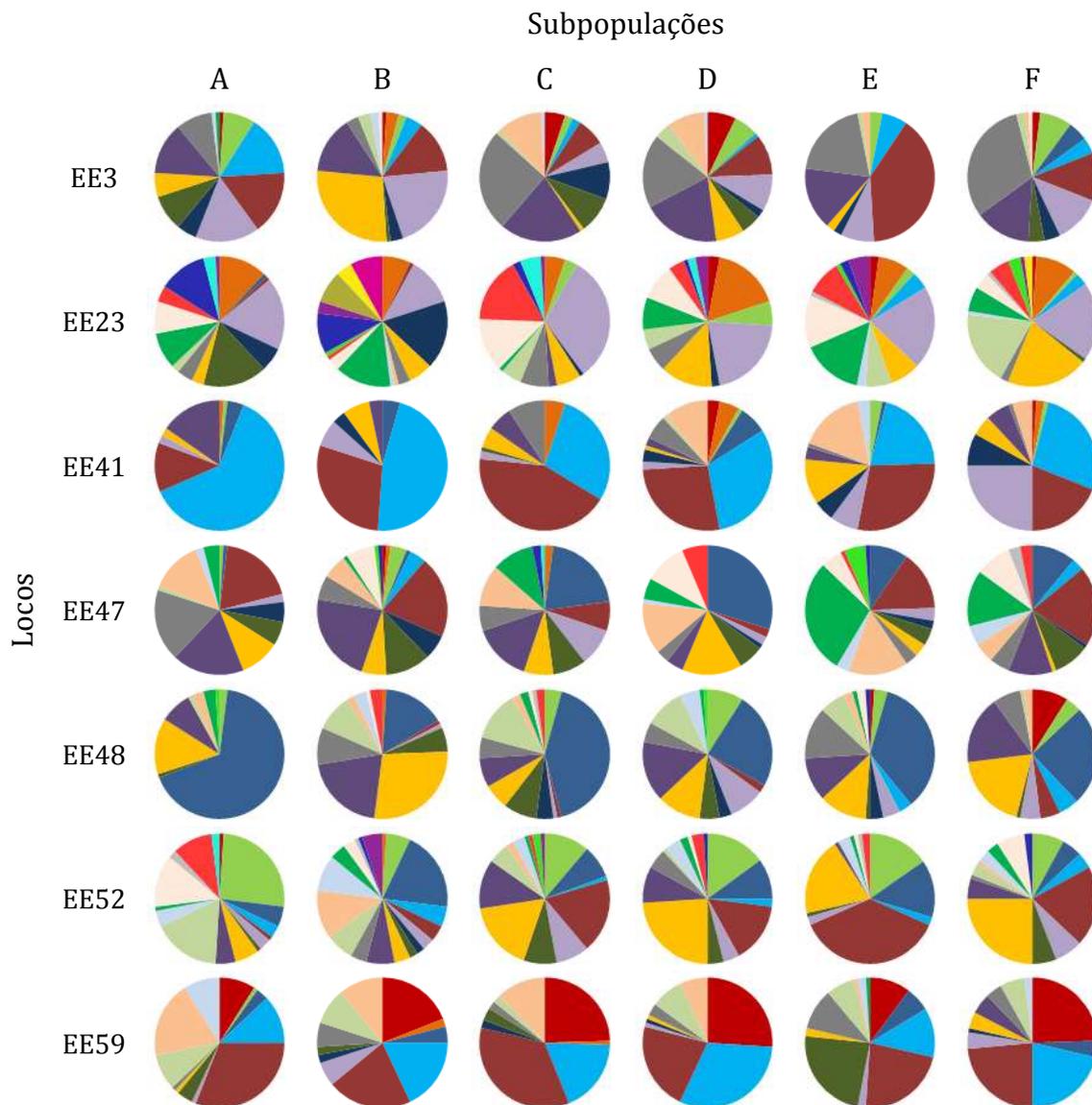


Figura 5. Frequências alélicas por loco microssatélite em cada subpopulação de *Euterpe edulis* Mart.

Em relação à estruturação genética espacial, apenas a subpopulação E apresentou agregação significativa de indivíduos aparentados (Tab. 8; Fig. 6). Quando todos os indivíduos foram agrupados como uma única população também houve correlação negativa significativa entre o grau de parentesco e a distância entre os pares de indivíduos (Tab. 8; Fig. 6). Os valores dos coeficientes de intensidade de estrutura genética espacial (Sp) para as subpopulações variaram entre -0,0028 e 0,0099, e foi de 0,0079 para a população total (Tab. 8).

Tabela 8. Índices de estruturação espacial para as seis subpopulações de *Euterpe edulis* Mart., para a região CDEF e para o total dos indivíduos amostrados. F_1 = coeficiente de parentesco na primeira classe de distâncias. F_2 = coeficiente de parentesco na segunda classe de distâncias. $b\text{-log}$ = coeficiente de regressão dos coeficientes médios de parentesco em relação à distância espacial logarítmica. Sp = coeficiente de intensidade de estruturação. Valores em negrito são significativamente diferentes de zero ($p < 0,05$)

	F_1	F_2	$b\text{-log}$	Sp
A	-0,0066	0,0033	0,0028	-0,0028
B	0,0034	0,0035	-0,0033	0,0034
C	0,0037	0,0008	-0,0011	0,0011
D	-0,0026	0,0103	-0,0024	0,0024
E	0,0289	-0,0012	-0,0096	0,0099
F	0,0079	0,0103	-0,0050	0,0050
CDEF	0,0423	0,0281	-0,0064	0,0067
Total	0,0439	0,0367	-0,0075	0,0079

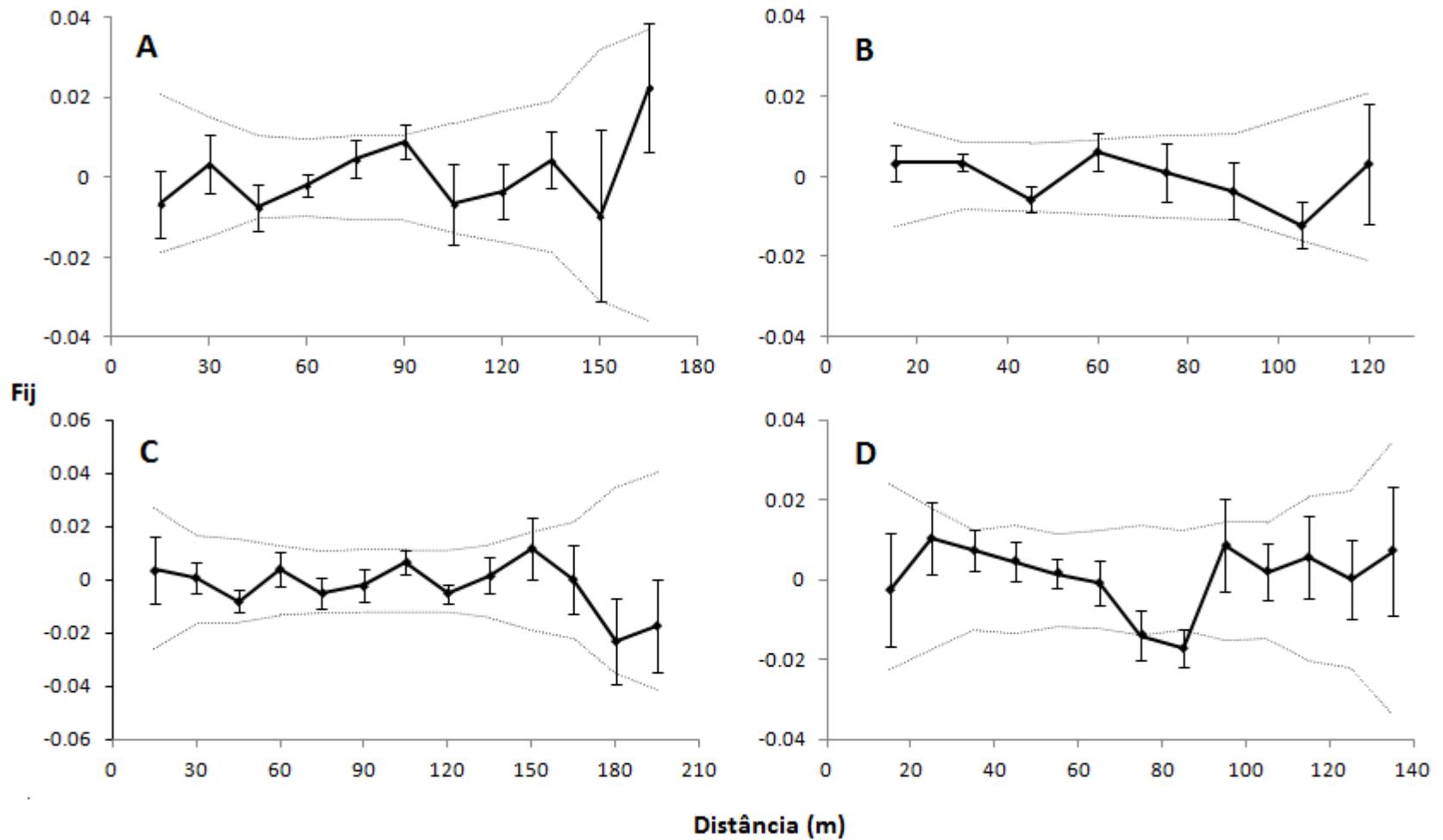


Figura 6. Correlogramas espaciais para cada subpopulação de *Euterpe edulis* Mart., amostrada para as subpopulações agrupadas na região CDEF e para o conjunto total de indivíduos amostrados. São representados os coeficientes médios de parentesco entre pares de indivíduos (F_{ij} , de Loiselle *et al.*, 1995) em cada classe de distância. Barras indicam o erro padrão e linhas pontilhadas o intervalo de confiança (95%). (continua)

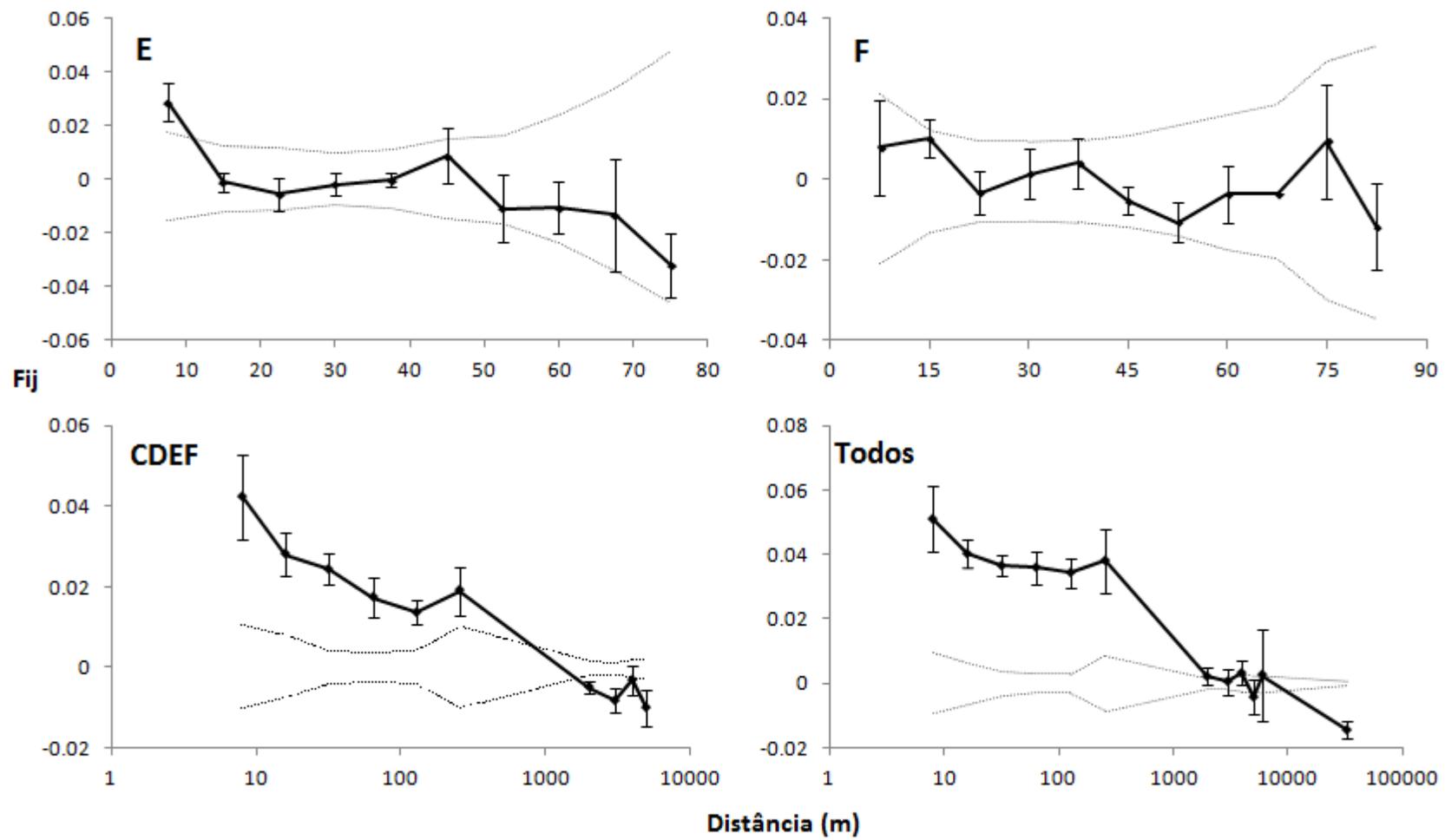


Figura 6. (continuação)

A estruturação genética populacional encontrada foi $\theta = 0,043$ e $R_{ST} = 0,054$, ambas significativamente diferentes de zero. Já o valor de θ' foi de 0,260, uma vez que o valor de $\theta_{máx}$ foi de apenas 0,165. A diferenciação genética entre pares de subpopulações foi variável (Tabs. 9 e 10). Com base no teste de atribuição de indivíduos, sugere-se a existência de quatro grupos genéticos distintos (Fig. 7), embora a probabilidade de três e cinco grupos também seja alta. Em geral, estes grupos genéticos coincidem com a divisão das subpopulações (Fig. 8). Já em relação à AMOVA hierárquica, nota-se a maximização da variação entre grupos e a minimização da variação dentro de grupos quando são considerados cinco grupos genéticos (Tab. 11).

Tabela 9. Estrutura genética entre os pares de subpopulações de *Euterpe edulis* Mart de acordo com o estimador θ (WEIR & COCKERHAM, 1984). Abaixo da diagonal, valores de θ . Acima da diagonal, valores de θ' . Todos os valores são significativamente diferentes de zero ($p < 0,05$).

	A	B	C	D	E	F
A		0,281	0,275	0,346	0,376	0,353
B	0,052		0,316	0,263	0,375	0,278
C	0,054	0,050		0,089	0,214	0,176
D	0,062	0,036	0,014		0,221	0,127
E	0,073	0,057	0,036	0,033		0,180
F	0,063	0,039	0,028	0,018	0,027	

Tabela 10. Estrutura genética entre os pares de subpopulações de *Euterpe edulis* Mart., de acordo com o estimador R_{ST} (SLATKIN, 1995). Valores significativamente diferentes de zero em negrito ($p < 0,05$).

	A	B	C	D	E	F
A						
B	0,071					
C	0,075	0,039				
D	0,080	0,062	0,006			
E	0,087	0,096	0,057	0,049		
F	0,054	0,066	0,008	0,005	0,051	

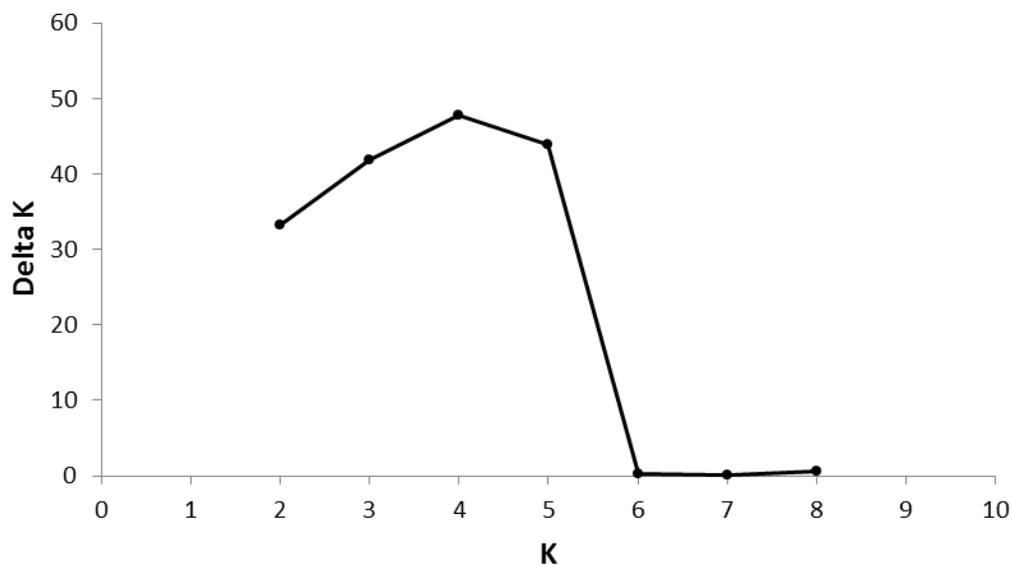


Figura 7. Estimativa para o número de grupos genéticos mais provável (K) em *Euterpe edulis* (Arecaceae) no Parque Estadual da Serra do Mar, segundo a metodologia de Evanno *et al.* (2005).

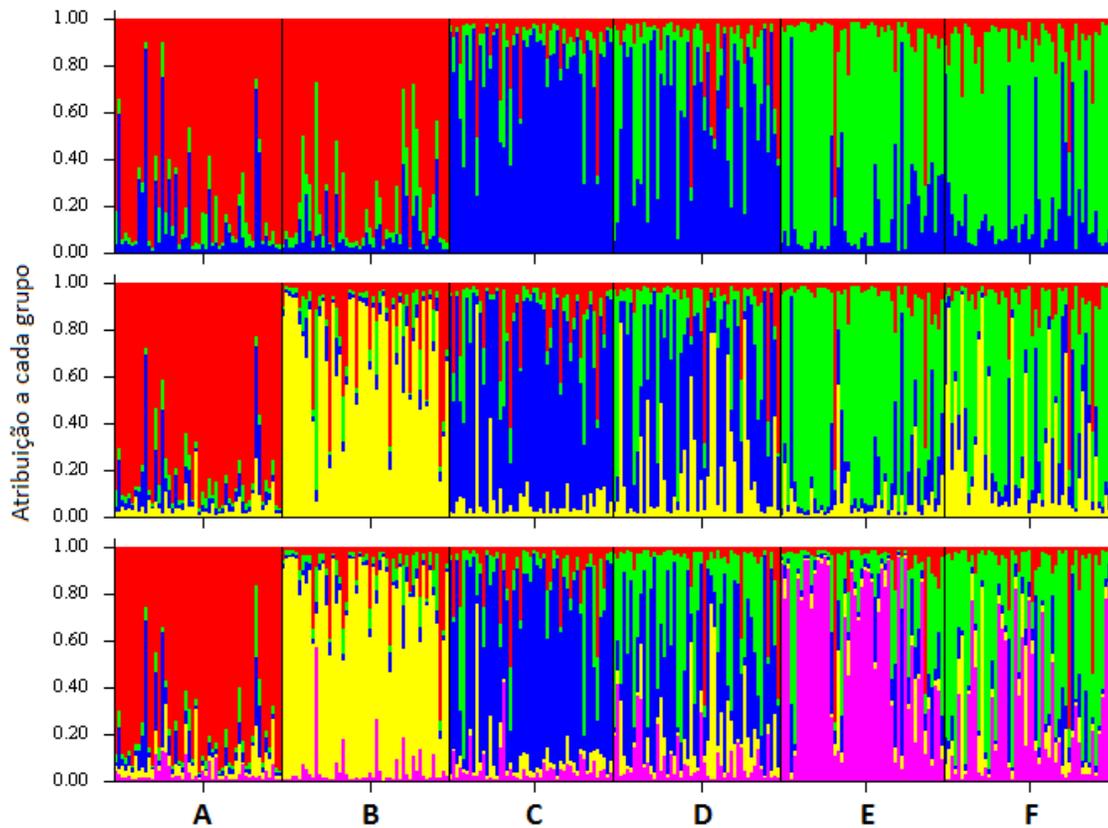


Figura 8. Representação gráfica da atribuição dos indivíduos de *Euterpe edulis* Mart. aos diferentes grupos genéticos (K): para $K = 3$ (em cima), para $K = 4$ (ao centro) e para $K = 5$ (em baixo). As barras verticais representam os indivíduos, os quais estão ordenados de acordo com as subpopulações de origem (A, B, C, D, E e F), e as cores indicam a probabilidade de cada um deles pertencer a um determinado grupo genético.

Tabela 11. Análise molecular de variância (AMOVA) hierárquica em *Euterpe edulis* Mart. baseada em sete locos microssatélites.
G. L. = Graus de Liberdade.

Nº de Grupos	Grupos	Fonte de Variação	G. L.	Componentes de Variância	Porcentagem da Variação (%)	Estatística-F
		Entre grupos	1	0,058	1,94	$\Phi_{CT} = 0,019^{\#}$
2	AB x CDEF	Entre subpopulações dentro de grupos	4	0,096	3,22	$\Phi_{SC} = 0,032^{**}$
		Dentro de subpopulações	590	2,852	94,84	$\Phi_{ST} = 0,051^{**}$
		Entre grupos	2	0,044	1,5	$\Phi_{CT} = 0,014^{\#}$
3	AB x CD x EF	Entre subpopulações dentro de grupos	3	0,092	3,09	$\Phi_{SC} = 0,031^{**}$
		Dentro de subpopulações	590	2,852	95,42	$\Phi_{ST} = 0,045^{**}$
		Entre grupos	3	0,077	2,58	$\Phi_{CT} = 0,025^{*}$
4	A x B x CD x EF	Entre subpopulações dentro de grupos	2	0,061	2,04	$\Phi_{SC} = 0,02^{**}$
		Dentro de subpopulações	590	2,852	95,38	$\Phi_{ST} = 0,046^{**}$
		Entre grupos	4	0,092	3,10	$\Phi_{CT} = 0,03^{\#}$
5	A x B x CD x E x F	Entre subpopulações dentro de grupos	1	0,041	1,39	$\Phi_{SC} = 0,014^{**}$
		Dentro de subpopulações	590	2,852	95,51	$\Phi_{ST} = 0,044^{**}$

37 $^{\#}p = 0,06$; $^{*}p < 0,05$; $^{**}p < 0,001$

As distâncias geográficas não se mostraram correlacionadas com as distâncias altitudinais ($r = -0,012$; $p > 0,05$) e, portanto, puderam ser tratadas de maneira independente. Em relação ao estimador θ , observou-se que a estrutura genética está correlacionada ao distanciamento geográfico ($r = 0,69$; $p < 0,05$) e marginalmente correlacionada ao distanciamento altitudinal ($r = 0,32$; $p = 0,08$). Quando se controla o efeito da distância altitudinal, a correlação com a distância geográfica aumenta ($r = 0,78$; $p < 0,05$) e quando se controla o efeito da distância geográfica, a correlação com a distância altitudinal se torna significativa ($0,56$; $p < 0,01$). Os resultados indicam que 51% da variância observada na estrutura genética estão relacionados ao distanciamento geográfico, 13% ao distanciamento altitudinal e 34% a outros fatores não identificados.

Já em relação ao estimador θ' , observou-se que a estruturação está mais fortemente correlacionada ao distanciamento geográfico ($r = 0,81$; $p < 0,05$) e não correlacionada ao distanciamento altitudinal ($r = 0,21$; $p = 0,14$). Quando se controla o efeito da distância altitudinal, a correlação com a distância geográfica se torna ainda mais forte ($r = 0,86$; $p < 0,001$), enquanto que, quando se controla o efeito da distância geográfica, a correlação com a distância altitudinal se torna significativa ($0,53$; $p < 0,05$). Neste caso, os resultados indicam que 69% da variância observada na estrutura genética estão relacionados ao distanciamento geográfico, 7% ao distanciamento altitudinal e 24% a outros fatores não identificados.

Discussão

Para as análises de diversidade e estrutura genética em *E. edulis*, foram empregados microssatélites descritos por Gaiotto *et al* (2001). Contudo, dois dos locos utilizados apresentaram diferenciações físicas em relação ao artigo de sua descrição. O loco EE15, excluído das análises, apresentou um padrão tetraplóide em todos os indivíduos amostrados, indicando um evento de duplicação gênica nas populações estudadas. Entretanto, não é possível afirmar se tal duplicação ocorreu ao nível cromossômico ou apenas em uma região limitada do DNA. Seoane (2007) utilizou esse mesmo loco para as análises realizadas em populações situadas no estado do Rio de Janeiro, cerca de 250 km de distância da área do presente estudo, e não encontrou tal resultado. Já os alelos do loco EE41 apresentaram tamanho médio cerca de 50 pares de bases menor do que o tamanho médio descrito por Gaiotto *et al.* (2001). O mesmo fato pôde ser observado nos resultados obtidos por Dias-Filho (2006) em uma população amostrada em Campinas, SP. Como a área de ocorrência da espécie é bastante extensa e o conjunto de microssatélites utilizados foi caracterizado a partir de populações localizadas em Brasília, DF, a 900 km de distância da área amostrada no presente estudo, não é de se estranhar que haja diferenciações desse tipo e que elas estejam restritas a apenas porções da distribuição geográfica. A realização de novos estudos genéticos abordando tais mutações seria interessante para a compreensão do fluxo gênico atual, bem como dos padrões históricos e filogeográficos da espécie.

Como esperado, os locos microssatélites analisados se mostraram altamente polimórficos. Embora a composição alélica tenha variado, o número médio de alelos se manteve constante entre as subpopulações, possivelmente próximo à capacidade

máxima suportada pelos demes (KIMURA & CROW, 1964; WRIGHT, 1946). Além disso, foram observados alelos exclusivos em todas as subpopulações, o que pode ser um indício de fluxo gênico reduzido e também de diferenciação populacional. As subpopulações A e B apresentaram maior número de alelos exclusivos em relação às demais e quando são consideradas as regiões AB e CDEF, observa-se que a segunda é a mais rica em alelos exclusivos. Porém, ambas as diferenças podem ser simples resultado do desenho amostral realizado. Enquanto as subpopulações da região AB se encontram afastadas, as subpopulações da região CDEF se encontram relativamente próximas. Assim, a maior proximidade facilitaria o compartilhamento de alelos e diminuiria o número de alelos exclusivos em cada subpopulação. Já o menor número de alelos exclusivos observados na região AB pode estar ligado à amostragem insuficiente de alelos, uma vez que esta região possui a metade do número de indivíduos amostrados na outra região. Para minimizar os efeitos do desenho amostral, foram comparadas apenas as quatro subpopulações extremas (A, B, C e F), cujas distâncias geográficas e altitudinais são próximas e o tamanho amostral é equivalente. Pôde-se notar, dessa forma, que ambas as regiões exibem padrões de distribuição de alelos exclusivos semelhantes e, ainda, que as subpopulações em altitudes menores tendem a apresentar menor número de alelos exclusivos em relação às de altitudes maiores, concordando com o terceiro padrão de diferenciação descrito por Ohsawa & Ide (2008).

As heterozigosidades esperadas, média e individual para cada subpopulação, foram ligeiramente superiores às já reportadas na literatura para a espécie quando se tratam de marcadores microssatélites (GAIOTTO *et al.*, 2003; SEOANE *et al.*, 2005;

DIAS-FILHO, 2006; CONTE *et al.*, 2008), destacando a região como reservatório genético de extrema importância para os atuais planos de conservação. Embora, as heterozigosidades observadas tenham variado levemente entre as subpopulações amostradas, as diferenças não foram significativas, indicando não haver alterações decorrentes da variação altitudinal.

Os índices de fixação obtidos foram positivos e significativos em apenas duas subpopulações (C e F). Valores próximos de zero e até mesmo negativos para os adultos da espécie já foram reportados em outros estudos, sendo comum encontrar valores positivos para as plântulas e a gradativa redução ao longo das classes ontogenéticas. Tal redução pode estar relacionada ao progressivo acúmulo de gerações em cada classe e, conseqüentemente, da adição de diversidade genética (DIAS-FILHO, 2006) ou ser um efeito direto da seleção natural a favor do heterozigoto (EGUIARTE *et al.*, 1992; REIS, 1996; CONTE *et al.*, 2008).

O excesso de homozigotos observado na subpopulação C pode estar relacionado justamente ao menor acúmulo de gerações entre os indivíduos amostrados em relação às demais localidades. Nesta subpopulação, os indivíduos de maior porte, supostamente originados em eventos reprodutivos mais antigos, foram eliminados pela extração ilegal de palmito, restando apenas adultos relativamente jovens, provenientes de eventos reprodutivos recentes. A mesma tendência ao excesso de homozigotos pode ser sugerida na subpopulação D, onde ocorre exploração em menor intensidade. Já o excesso de homozigotos na subpopulação F não era esperado, visto que ela se encontra em uma área nuclear e bem protegida do parque. De maneira similar, Seoane (2007) encontrou um índice de fixação bastante alto para os adultos

da espécie em um remanescente florestal bem preservado. Estes resultados são um indicativo de que, para a espécie, as dinâmicas genéticas ocorrem em uma escala bastante localizada.

Uma vez que apenas adultos foram amostrados, as estimativas de endogamia refletem eventos reprodutivos passados e de difícil interpretação. Assim, para uma análise adequada dos eventos reprodutivos contemporâneos, a amostragem de plântulas e juvenis também seria necessária. Além disso, as comparações com os demais estudos devem ser feitas com cautela, pois no presente estudo foram considerados adultos aqueles indivíduos com mais de seis metros de altura. Tal classificação é mais abrangente do que a frequentemente utilizada na literatura, a qual considera como adultos apenas os indivíduos estritamente reprodutivos.

Apenas a subpopulação E apresentou estruturação genética espacial, com coeficiente de parentesco entre pares de indivíduos significativo na primeira classe de distâncias (até 7,5 m). Porém, os coeficientes de regressão (*b-log*) e de estrutura (*Sp*) se mostraram bastante baixos. Já as demais subpopulações apresentaram distribuição aleatória dos alelos, sugerindo que o fluxo de pólen e a dispersão de sementes ocorrem de maneira semelhante entre elas, ao menos na escala de amostragem realizada. A ausência de estruturação genética espacial também foi reportada para os adultos da palmeira *Geonoma schottiana* (SILVA *et al.*, 2011). Esta espécie, de menor porte, ocorre no sobosque da mata atlântica em regiões paludosas e possui história de vida bastante semelhante à de *E. edulis* (SAMPAIO & SCARIOT, 2008).

Mesmo quando são consideradas distâncias geográficas maiores, como as encontradas dentro da região CDEF ou em relação ao total dos indivíduos amostrados,

são observados baixos coeficientes de regressão e de estrutura. Porém, a despeito destes resultados, a análise visual dos correlogramas (Fig. 6) permite evidenciar um padrão de diferenciação em longas distâncias. São observados altos coeficientes de parentescos nos primeiros intervalos de distância, correspondentes àqueles encontrados no interior de uma mesma subpopulação, e coeficientes negativos nos últimos intervalos, indicando que os indivíduos distantes são menos relacionados do que o esperado ao acaso.

Considerando as características da espécie, não era de se esperar grande estruturação espacial em *E. edulis*, já que as espécies arbóreas, autoincompatíveis e polinizadas e dispersas por animais tendem a apresentar menores níveis de estruturação (HARDY *et al.*, 2006; VEKEMANS & HARDY, 2004). Além disso, a alta densidade populacional possibilita a maior homogeneidade genética em pequena escala, devido à maior vizinhança genética (VEKEMANS & HARDY, 2004; LUNA *et al.*, 2005).

Ao nível das subpopulações, embora a estrutura genética em *E. edulis* tenha sido baixa, ela é relevante considerando-se a escala geográfica reduzida, o contínuo populacional a partir do qual as subpopulações foram amostradas e os demais estudos já realizados para a espécie. Quando se considera o estimador θ' , índice corrigido para o alto polimorfismo dos microssatélites, nota-se que a estrutura genética é ainda mais forte. Em todos os casos, observa-se que a subpopulação E é a mais diferenciada, embora os padrões de diferenciação sejam ligeiramente distintos de acordo com os estimadores analisados (θ e R_{ST}).

Ainda que não tenha sido possível definir com clareza o número de grupos genéticos existentes na população total, uma vez que as probabilidades de três, quatro e cinco grupos foram muito próximas, a estruturação genética foi corroborada pelo teste de atribuição dos indivíduos. Em todos os casos tais grupos se mostraram bastantes coesos e coincidentes com os limites das subpopulações. Paralelamente, os resultados da AMOVA hierárquica sugerem a presença de cinco grupos genéticos distintos, confirmando novamente o grau de diferenciação das subpopulações.

Estes resultados, obtidos para uma escala geográfica tão reduzida dentro de um contínuo florestal, são inesperados e surpreendentes quando se considera a baixa estruturação já relatada para a espécie em escalas geográficas maiores e para populações isoladas em fragmentos florestais. Embora Reis (1996) tenha reportado uma pequena estruturação dentro de um contínuo florestal, tal resultado é de difícil comparação, pois foram utilizados marcadores moleculares diferentes dos aqui utilizados. Quando são considerados apenas marcadores microssatélites, a diferenciação entre as regiões AB e CDEF é similar à encontrada por Gaiotto *et al.* (2003) em duas matas ciliares separadas pela mesma distância, mas imersas em uma matriz altamente antropizada. Além disso, a estruturação observada no presente estudo é duas vezes mais alta do que a observada por Conte *et al.* (2008), que amostraram fragmentos florestais com distâncias até 5 vezes superiores à distância máxima aqui amostrada, entre as regiões AB e CDEF.

Tal estruturação genética mostrou-se fortemente correlacionada ao distanciamento geográfico. O isolamento por distância é comum entre as espécies arbóreas tropicais, uma vez que a capacidade dispersiva dos indivíduos é limitada em

relação à amplitude de distribuição. Porém o padrão de isolamento é mais frequentemente observado em escalas geográficas muito mais extensas (HARDESTY, *et al.*, 2010; LE GUEN *et al.*, 2009; HARDY *et al.* 2006; FUCHS & HAMRICK, 2010). Embora o presente estudo não tenha avaliado o fluxo gênico propriamente dito, uma vez que apenas adultos foram amostrados, sugere-se que *E. edulis* esteja experimentando forte limitação do movimento de pólen e sementes em longas distâncias naquela região. Este fato pode estar relacionado à alta densidade populacional de *E. edulis* que induz o comportamento sedentário de polinizadores e dispersores de sementes. Diversos estudos revelam que os polinizadores tendem a realizar deslocamentos em menores distâncias nas áreas de alta densidade de indivíduos e onde as fontes de recurso se encontram agregadas (HARDER, 1990; STACY *et al.* 1996; FENSTER, 1991; DICK *et al.* 2003). Tal comportamento restringe o fluxo gênico e permite a diferenciação em pequena escala (JOLIVET *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2005; GENG *et al.*, 2008).

O isolamento ainda é exacerbado pelo efeito aditivo do distanciamento altitudinal, conforme já sugerido por Reis (1996). A variação das condições ambientais ao longo do gradiente ambientais provocam mudanças na dinâmica das populações e, conseqüentemente, influenciam a dinâmica genética local. As divergências fenológicas, por exemplo, são comuns ao longo de gradientes altitudinais (RUSCH, 1993; VITASSE, *et al.*, 2009; BRITO, 2010) e a assincronia das fenofases reprodutivas pode reduzir o tamanho efetivo total e potencializar a deriva genética, conduzindo à diferenciação genética entre as diferentes altitudes (JORDANO & GODOY, 2000; PREMOLI, 2003; YAMAGISHI *et al.*, 2005). Em *E. edulis* as fenofases

reprodutivas nas regiões elevadas costumam ocorrer atrasadas em relação às regiões de baixada, e o mesmo padrão é encontrado nas latitudes maiores em relação às latitudes menores (FAVRETO, 2010). No litoral sul de São Paulo, por exemplo, o período de floração de *E. edulis* na floresta de encosta é menor em relação ao da floresta de planície e o pico de floração ocorre com um mês de diferença entre as duas áreas (CASTRO *et al.*, 2007).

Adicionalmente, a variação da composição da comunidade e do comportamento dos polinizadores e dispersores pode criar padrões distintos de fluxo gênico (JORDANO *et al.*, 2007; SHUPP *et al.*, 2010). A endogamia observada na subpopulação F e a estrutura genética espacial da subpopulação E são indicativos de que o fluxo gênico não ocorre de maneira homogênea no interior da floresta. Karubian *et al.* (2010), por exemplo, reportam o incremento da diversidade genética entre as plântulas da palmeira amazônica *Oenocarpus bataua* nas áreas onde se localizam as arenas fixas de cortejo de *Cephalopterus penduliger*, uma importante ave dispersora de sementes. Este mesmo padrão pode acontecer na Mata Atlântica, onde também são encontradas aves que realizam cortejo em arenas fixas (FRANCISCO *et al.*, 2007)

Embora não tenham sido encontrados estudos avaliando a variação da comunidade de polinizadores da espécie ao longo do gradiente altitudinal, ela provavelmente ocorre, uma vez que são reportadas mudanças nas comunidades de abelhas (GONÇALVES *et al.*, 2012) e outros invertebrados como formigas (SCOTT-SANTOS, 2008) e opiliões (ALMEIDA-NETO *et al.*, 2006) naquela região da Serra do Mar. Já em relação à comunidade de dispersores de *E. edulis*, embora existam espécies que ocupem de maneira uniforme todo o gradiente ou ainda realizem migração

altitudinal acompanhando a frutificação da espécie, como é o caso de jacutingas (*Aburria jacutinga*; GALLETI *et al.*, 1997), sabiás-una (*Platycichla flavipes*; DEVELEY & ENDRIGO, 2004) e arapongas (*Procnias nudicollis*), há estudos que relatam a variação da composição de espécies frugívoras, do padrão de visitação e do número de frutos de *E. edulis* removidos em diferentes altitudes no litoral sul do estado de São Paulo (CÔRTEZ, 2006).

Ainda, é possível sugerir que a estruturação genética observada esteja ligada à adaptação local. Quando a migração ocorre entre populações adaptadas a ambientes distintos, o sucesso reprodutivo dos imigrantes ou dos híbridos pode ser reduzido por seleção natural (NOSIL *et al.* 2005), e a redução do fluxo gênico resultante pode facilitar ou manter a diferenciação, mesmo se tratando de marcadores neutros (GONZALO-TURPIN & HAZARD, 2009; LEE & MITCHELL-OLDS, 2011; WANG & SUMMERS, 2010). No gradiente altitudinal da Serra do Mar, por exemplo, a temperatura do solo cai 0,7 °C para cada 100 m de altitude acrescentados (VIEIRA *et al.*, 2011), totalizando uma diferença de quase 7 °C entre as subpopulações extremas aqui amostradas. Tal hipótese de seleção seria confirmada por análises diretas do fluxo gênico ou mesmo por experimentos de translocação de indivíduos.

Por fim, embora atualmente a região amostrada esteja em condições de conservação relativamente boas, ela foi povoada há algumas centenas de anos e a estrutura genética observada pode refletir atividades humanas passadas de exploração da floresta e o mosaico sucessional em que ela se encontra.

Considerações

Sugere-se que novos estudos, em escala geográfica reduzida, sejam realizados para confirmar se este padrão de estruturação se repete em outras áreas de ocorrência da espécie. Além disso, esta abordagem deveria ser estendida a outras espécies arbóreas, afim de que se avalie se este é um padrão recorrente na Mata Atlântica e nos demais biomas brasileiros.

Ressalta-se que as medidas de manejo de *Euterpe edulis* que vêm sendo implantadas ao longo do Parque Estadual da Serra do Mar e demais unidades de conservação, como o plantio de mudas e a semeadura direta, sejam criteriosas e considerem a alta estruturação genética observada e a influência que o gradiente altitudinal vem a ter.

Ainda, sob o contexto de mudanças climáticas globais, especial atenção deve ser dada às populações localizadas nas regiões mais altas da Serra do Mar. No caso do aumento das temperaturas, a perda de diversidade genética é evidente, visto que estas regiões apresentaram o maior número de alelos exclusivos.

Conclusões

As subpopulações de *Euterpe edulis* amostradas apresentaram alta diversidade genética e níveis de endogamia baixos ou ausentes entre os adultos. Todas as elas apresentaram alelos exclusivos, sendo um indicativo de diferenciação populacional. As subpopulações localizadas em altitudes maiores tenderam a apresentar maior número de alelos exclusivos em relação às localizadas em altitudes menores.

Não houve estruturação espacial genética nas subpopulações amostradas, exceto em E. Na população total amostrada e dentro da região CDEF detectou-se pequena estruturação espacial.

Embora a estruturação genética populacional tenha sido baixa, ela é relevante considerando-se a escala da amostragem, o contínuo florestal e os estudos já realizados para a espécie. Grande parte da estrutura genética observada está relacionada ao distanciamento geográfico e pequena parte ao distanciamento altitudinal. Tal estruturação pode estar relacionada ao comportamento sedentário de polinizadores e dispersores de sementes.

Referências Bibliográficas

- ALCÂNTARA, S.F., SEMIR, J. & SOLFERINI, V. N. (2006). Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic Rainforest of south-eastern Brazil. *Annals of Botany*, 98:1207-1213.
- ALMEIDA, F. F. M. & CARNEIRO, C. D. R. (1998). Origem e evolução da Serra do Mar. *Revista Brasileira de Geociências*, 28(2), 135-150.
- ALMEIDA-NETO, M., MACHADO, G., PINTO-DA-ROCHA, R., & GIARETTA, A. A. (2006). Harvestman (Arachnida: Opiliones) species distribution along three neotropical elevational gradients: an alternative rescue effect to explain Rapoport's rule? *Journal of Biogeography*, 33, 361-375.
- ASSIS, M. A. (1999). Florística e caracterização das comunidades vegetais da planície costeira de Picinguaba, Ubatuba - SP. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- ASSIS, M. A., MAGALHÃES, E., PRATA, B., PEDRONI, F. & SANCHEZ, M. (2011). Florestas de restinga e de terras baixas na planície costeira do sudeste do Brasil: vegetação e heterogeneidade ambiental. *Biota Neotropica*, 11(2), 103-121.
- AVISE, J. C. (2004). Molecular markers, natural history and evolution. 2a ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- BERTONCELLO, R. (2009). A vegetação arbórea em um gradiente altitudinal no Morro do Cuscuzeiro, Ubatuba (SP): uma análise florística, fitossociológica e fitogeográfica. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- BLUM, C. T., RODERJAN, C. V. & GALVÃO, F. (2011a). O clima e sua influência na distribuição da floresta ombrófila densa na Serra da Prata, Morretes, Paraná. *Floresta*, 41(3), 589-598.
- BLUM, C. T., RODERJAN, C. V. & GALVÃO, F. (2011b). Composição florística e distribuição altitudinal de epífitas vasculares da floresta ombrófila densa na Serra da Prata, Morretes, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(4), 0-19.
- BOVI, M. L. A. & CARDOSO, M. (1978). Conservação de sementes de palmiteiro (*Euterpe edulis* Mart.). *Bragantia*, 37, 65-71.
- BRITO, V. L. G. (2010). Biologia da polinização, reprodução e genética de duas populações de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) em um gradiente

- altitudinal no sudeste do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- CALABRESE, P. P., DURRETT, R. T., & AQUADRO, C. F. (2001). Dynamics of microsatellite divergence under stepwise mutation and proportional slippage/point mutation models. *Genetics*, 159(2), 839-52.
- CARDOSO, S. R., ELOY, N. B., PROVAN, J., CARDOSO, M. A. & FERREIRA, P. C. (2000). Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology*, 9, 1753-60.
- CASTRO, E. R., GALETTI, M., & MORELLATO, L. P. C. (2007). Reproductive phenology of *Euterpe edulis* (Arecaceae) along a gradient in the Atlantic rainforest of Brazil. *Australian Journal of Botany*, 55, 725.
- CHUNG, M. Y., EPPERSON, B. K. & CHUNG, M. G. (2003). Genetic structure of age classes in *Camellia japonica* (Theaceae). *Evolution*, 57(1), 62-73.
- CONTE, R., NODARI, R. O., VENCOSKY, R. & REIS, M. S. (2003). Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, 91, 401-6.
- CONTE, R., REIS, M. S., MANTOVANI, A. & VENCOSKY, R. (2008). Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. Populations: a comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. *Journal of Heredity*, 99(5), 476-82.
- COOMBS, J. A., B. H. LETCHER, AND K. H. NISLOW. 2008. CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology Resources*, 8:578-580.
- CÔRTEZ, M. C. (2006). Variação espacial nas interações entre o palmito *Euterpe edulis* e as aves frugívoras: implicações para a dispersão de sementes. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.
- DEVELEY, P. F., ENDRIGO. E. (2004). Guia de campo aves da Grande São Paulo. Ed. São Paulo. São Paulo, 295p.
- Di RIENZO, A., DONNELLY, P., TOOMAJIAN, C., SISK, B., HILL, A., PETZL-ERLER, M. L., HAINES, G. K., *et al.* (1998). Heterogeneity of microsatellite mutations within and between loci, and implications for human demographic histories. *Genetics*, 148(3), 1269-84.
- DIAS, A. C. (2005). Composição florística, fitossociologia, diversidade de espécies arbóreas e comparação de métodos de amostragem na floresta ombrófila densa do Parque Estadual Carlos Botelho/SP - Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

- DIAS-FILHO, C. R. (2006). Alterações na variabilidade genética de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- DICK, C. W., ETCHELECU, G., & AUSTERLITZ, F. (2003). Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and african honeybees in pristine and fragmented amazonian rainforest. *Molecular Ecology*, 12, 753-64.
- EARL, D. A. & VONHOLDT, B. M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2):359-361
- EGUIARTE, L. E., PEREZ-NASSER, N., & PIJERO, D. (1992). Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Enzyme*, 69, 217-228.
- ELLEGREN, H. (2000). Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 16(12), 551-558.
- ELLEGREN, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews. Genetics*, 5(6), 435-45.
- EVANNO, G., REGNAUT, S., & GOUDET., J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2630.
- EXCOFFIER L. 2001. Analysis of population subdivision. In: BALDING, D.J., BISHOP, M., & CANNINGS, C., *Handbook of statistical genetics*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Research*, 10, 564-567.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E., & QUATTRO, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application. *Genetics*, 131: 479-491.
- FAVRETO, R. (2010). Aspectos etnoecológicos e ecofisiológicos de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.
- FENSTER, C. B. (1991). Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae) I. Gene dispersal. *Evolution*, 45(2), 398-409.

- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3a. ed. Embrapa-Cenargen, Brasília, DF. 220p.
- FISCH, S. T. V., NOGUEIRA-JR, L. R. & MANTOVANI, W. (2000). Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. na Mata Atlântica (Reserva Ecológica do Trabiju, Pindamonhangaba - SP). *Revista de Biociências*, 6(2), 31-37.
- FRANCESCHINELLI, E. V., VASCONCELOS, G., LANDAU, E. C., SANTOS, F. A. M. & ONO, K. Y. (2007). The genetic diversity of *Myrciaria floribunda* (West ex Willdenow) Berg. (cambuí) in Atlantic forest fragments of different sizes. *Journal of Tropical Ecology*, 23:361-367.
- FRANCISCO, M. R., GIBBS, H. L., GALETTI, M., LUNARDI, V. O. & GALETTI, P. M. (2007). Genetic structure in a tropical lek-breeding bird, the blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology*, 16(23), 4908-18.
- FUCHS, E. J., & HAMRICK, J. L. (2010). Genetic diversity in the endangered tropical tree, *Guaicum sanctum* (Zygophyllaceae). *The Journal of Heredity*, 101(3), 284-91.
- GAIOTTO, F. A., BRONDANI, P. V. & GRATTAPAGLIA, D. (2001). Microsatellite markers for heart of palm — *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes*, 1, 86-88.
- GAIOTTO, F. A., GRATTAPAGLIA, D. & VENCOSKY, R. (2003). Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity*, 94(5), 399-406.
- GALETTI, M., MARTUSCELLI, P., OLMOS, F., & ALEIXO, A. (1997). Ecology and conservation of the jacutinga *Pipile jacutinga* in the atlantic forest of Brazil. *Biological Conservation*, 82, 31-39.
- GALETTI, M., ZIPPARRO, V. & MORELLATO, L. P. C. (1999) Fruit phenology and frugivory on the palm *Euterpe edulis* in a lowland atlantic forest of Brazil. *Ecotropica*, 5: 115-122.
- GARCÍA, C., ARROYO, L. M., GODOY, J. A., & JORDANO, P. (2005). Mating patterns, pollen dispersal, and the ecological maternal neighbourhood in a *Prunus mahaleb* L. population. *Molecular Ecology*, 14(6):1821-30.
- GENG, Q., LIAN, C., GOTO, S., TAO, J., KIMURA, M., ISLAM, M. S., & HOGETSU, T. (2008). Mating system, pollen and propagule dispersal, and spatial genetic structure in a high-density population of the mangrove tree *Kandelia candel*. *Molecular Ecology*, 17(21), 4724-39.

- GOERCK, J. M. (1999). Distribution of birds along an elevational gradient in the Atlantic forest of Brazil: implications for the conservation of endemic and endangered species. *Bird Conservation International*, 9, 235-253.
- GOMES, J. A. M. A., BERNACCI, L. C. & JOLY, C. A. (2011). Diferenças florísticas e estruturais entre duas cotas altitudinais da floresta ombrófila densa submontana atlântica, do Parque Estadual da Serra do Mar, município de Ubatuba / SP, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(2), 123.
- GONÇALVES, R. B., SANTOS, E. F., & SCOTT-SANTOS, C. F. (2012). Bees (Hymenoptera : Apoidea: Apidae) captured with Malaise and pan traps along an altitudinal gradient in the Parque Estadual da Serra do Mar, Ubatuba, São Paulo, Brazil. *Chek List*, 8(1), 53-56.
- GONZALO-TURPIN, H. & HAZARD, L. (2009). Local adaptation occurs along altitudinal gradient despite the existence of gene flow in the alpine plant species *Festuca eskia*. *Journal of Ecology*, 97(4), 742–751.
- GOUDET, J. (2002). FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution.
- GRUBB, P. J. (1977). Control of forest growth and distribution on wet tropical mountains: with special reference to mineral nutrition. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 8(41), 83-107.
- HARDER, L. D. (1990) Responses by bumble bees to variation in pollen availability. *Oecologia*, 85(1): 41-47.
- HARDESTY, B. D., DICK, C. W., HAMRICK, J. L., DEGEN, B., HUBBELL, S. P., & BIRMINGHAM, E. (2010). Geographic influence on genetic structure in the widespread neotropical tree *Simarouba amara* (Simaroubaceae). *Tropical Plant Biology*, 3(1), 28-39.
- HARDY, O. J., & VEKEMANS, X. (2002). Spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618-620.
- HARDY, O. J., MAGGIA, L., BANDO, E., BREYNE, P., CARON, H., CHEVALLIER, M.-H., DOLIGEZ, A., *et al.* (2006). Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. *Molecular Ecology*, 15(2), 559-71.
- HEDRICK, P. W. (2005). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59(8): 1633–8.

- HENDERSON, A. & GALEANO, G. (1996). Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae). New York: New York Botanical Garden Press, v72, 89p.
- HERRERA, C. M. & BAZAGA, P. (2008). Adding a third dimension to the edge of a species' range: altitude and genetic structuring in mountainous landscapes. *Heredity*, 100(3), 275-85.
- HIROTA, M. M. (2005) Monitoramento da cobertura da Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C. & CÂMARA, I.G. (Eds) Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, 60-65.
- HUFFORD, K. M. & MAZER, S. J. (2003). Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(3), 147-155.
- INSTITUTO FLORESTAL DE SÃO PAULO. (2006). Plano de Manejo do Parque Estadual a Serra do Mar.
- JARENKOW, J. A. & WAECHTER, L. (2001). Composição, estrutura e relações florísticas do componente arbóreo de uma floresta estacional no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 24(3), 263-272.
- JOLIVET, C., HÖLTKEN, A. M., LIESEBACH, H., STEINER, W. & DEGEN, B. (2011). Spatial genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.): I. variation among natural populations of different density. *Tree Genetics & Genomes*, 7(2), 271–283.
- JORDANO, P., & GODOY, J. A. (2000). RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal-dispersed tree. *Molecular Ecology*, 9, 1293-305.
- JORDANO, P., GARCIA, C., GODOY, J. A., & GARCIA-CASTAÑO, L. (2007). Differential contribution of frugivores to complex seed dispersal patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3278-3282.
- KARUBIAN, J., SORK, V. L., ROORDA, T., DURÃES, R., & SMITH, T. B. (2010). Destination-based seed dispersal homogenizes genetic structure of a tropical palm. *Molecular Ecology*, 19(8), 1745-53.
- KIMURA, M., & CROW, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49, 725-738.
- KIMURA, M., & OHTA, T. (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(6), 2868-2872.
- KÖRNER, C. (2007). The use of “altitude” in ecological research. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(11), 569-74.

- KRUGLYAK, S., DURRETT, R. T., SCHUG, M. D., & AQUADRO, C. F. (1998). Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10774-8.
- LACERDA, M. S. (2001). Composição florística e estrutura da comunidade arbórea num gradiente altitudinal da Mata Atlântica. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- LE GUEN, V., DOARÉ, F., WEBER, C., & SEGUIN, M. (2009). Genetic structure of amazonian populations of *Hevea brasiliensis* is shaped by hydrographical network and isolation by distance. *Tree Genetics & Genomes*, 5(4), 673-683.
- LEE, C.-R., & MITCHELL-OLDS, T. (2011). Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. *Molecular Ecology*, 20(22), 4631-42.
- LEWIS, P. O., AND ZAYKIN, D. (2001). Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- LI, Y.-C., KOROL, A. B., FAHIMA, T., BEILES, A. & NEVO, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11(12), 2453-65.
- LINHART, Y. B. & GRANT, M. C. (1996). Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27(1), 237-277.
- LOISELLE, B. A., SORK, V.L., NASON, J., & GRAHAM, C. (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 82, 1420-1425.
- LOVELESS, M. D. & HAMRICK, J. L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15(1), 65-95.
- LUNA, R., EPPERSON, B. K., & OYAMA, K. (2007). High levels of genetic variability and inbreeding in two Neotropical dioecious palms with contrasting life histories. *Heredity*, 99(4), 466-76.
- MANTOVANI, A. & MORELLATO, L. P. C. (2000) Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral do palmitreiro. In: REIS, M.S., & REIS, A. (2000). *Euterpe edulis* Martius – (Palmitreiro): biologia, conservação e manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 335p.

- MANTOVANI, A. (1998) Fenologia e aspectos da biologia floral de uma população de *Euterpe edulis* Martius (Palmae) em uma floresta ombrófila densa montana da encosta atlântica em Blumenau, SC. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- MARQUES, R. M. (2004) Diagnóstico das populações de aves e mamíferos cinegéticos do Parque estadual da Serra do Mar, SP, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- MARTINS-CORDER, M. P., FIALHO, L. E. B., ZAMBIAZI, D. C. & KONZEN, E. R. (2009). Análise da diversidade genética de populações de palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius) através de marcadores isoenzimáticos. *Ceres*, 56(2), 204–212.
- MEIRMANS, P. G. (2006). Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 60(11): 2399-2402.
- MMA (2008). Lista Nacional das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Instrução Normativa MMA nº 06, de 23 de setembro de 2008.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A. B. & KENT, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772): 853-8.
- NOSIL, P., VINES, T. H., & FUNK, D. J. (2005). Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. *Evolution*, 59(4), 705-719.
- OHSAWA, T. & IDE, Y. (2008). Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography*, 17, 152-163.
- OUBORG, N. J., PIQUOT, Y. & VAN GROENENDAEL, J. M. (1999). Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology*, 87(4), 551-568.
- PADGURSCHI, M. C. G., PEREIRA, L. S., TAMASHIRO, J. Y. & JOLY, C. A. (2011). Composição e similaridade florística entre duas áreas de floresta atlântica montana, São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(2), 139-152.
- PINHEIRO, P. S., & GEISE, L. (2008). Non-volant mammals of Picinguaba, Ubatuba, state of São Paulo, southeastern Brazil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 23, 51-59.
- PRATA, E. M. B., ASSIS, M. A. & JOLY, C. A. (2011). Composição florística e estrutura da comunidade arbórea na transição da floresta ombrófila densa das terras baixas - floresta ombrófila densa submontana do Núcleo Picinguaba / PESM, Ubatuba, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, 11(2), 285-299.

- PREMOLI, A. C. (2003). Isozyme polymorphisms provide evidence of clinal variation with elevation in *Nothofagus pumilio*. *Journal of Heredity*, 94(3), 218-226.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., & DONNELLY, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- REIS, A. & KAGEYAMA, P. Y. (2000) Dispersão de sementes do palmitheiro (*Euterpe edulis* Martius – Palmae). In: REIS, M.S., & REIS, A. (2000). *Euterpe edulis* Martius – (Palmitheiro): biologia, conservação e manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 335p.
- REIS, A. (1995). Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius - (Palmae) em uma floresta ombrófila densa montana da encosta atlântica em Blumenau, SC. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- REIS, M. S., GUERRA, M. P., NODARI, R. O., RIBEIRO, R. J. & REIS, A. (2000). Distribuição geográfica e situação atual das populações na área de ocorrência de *Euterpe edulis* Martius. In: REIS, M.S., & REIS, A. (2000). *Euterpe edulis* Martius – (Palmitheiro): biologia, conservação e manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 335p.
- REIS, M. S., GUIMARÃES, E. & OLIVEIRA, G. P. (1993). Estudos preliminares da biologia reprodutiva do palmitheiro (*Euterpe edulis*) em mata residual do estado de São Paulo. In: 7º Congresso Florestal Brasileiro. Anais. Embrapa. Curitiba, PR. p.358-360.
- REIS, M.S. (1996). Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitheiro (*Euterpe edulis* Martius). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- REITZ, R. (1974). Palmeiras. (Flora Ilustrada Catarinense-PALM). Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 189p.
- RIBEIRO, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., & Hirota, M. M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142(6), 1141–1153.
- ROUSSET, F. (2008). Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103-6.
- RUSCH, V. E. (1993). Altitudinal variation in the phenology of *Nothofagus pumilio* in Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 66, 131-141.

- SAMPAIO, M. B., & SCARIOT, A. (2008). Growth and reproduction of the understory palm *Geonoma schottiana* Mart. in the gallery forest in central Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, 31(3), 433-442.
- SANCHEZ, M., PEDRONI, F., LEITÃO-FILHO, H. DE F., & CESAR, O. (1999). Composição florística de um trecho de floresta ripária na Mata Atlântica em Picinguaba, Ubatuba, SP. *Revista Brasileira de Botânica*, 22(1), 31-42.
- SCHUELKE, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nature Biotechnology*, 18, 233-234.
- SCHUPP, E. W., JORDANO, P. & GÓMEZ, J. M. (2010). Seed dispersal effectiveness revisited: a conceptual review. *The New Phytologist*, 188(2), 333-53.
- SCHUPP, E. W., JORDANO, P., & GÓMEZ, J. M. (2010). Seed dispersal effectiveness revisited: a conceptual review. *The New phytologist*, 188(2), 333-53.
- SCHWARCZ, K. D., PATACA, C. L., ABREU, A. G., BARIANI, J. M., MACRINI, C. M. T. & SOLFERINI, V. N. (2010). Genetic diversity in Atlantic Forest trees: fragmentation effects on *Astronium graveolens* (Anacardiaceae) and *Metrodorea nigra* (Rutaceae), species with distinct seed dispersal strategies. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164:326-336.
- SCOTT-SANTOS, C. P. (2008). Distribuição e diversidade de formigas de serapilheira (Hymenoptera: formicidae) ao longo de um gradiente elevacional no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Picinguaba, São Paulo, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- SELKOE, K. A, & TOONEN, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615-29.
- SEOANE, C. E. S. (2007). Efeitos da fragmentação florestal sobre o sistema de reprodução e a imigração de sementes *Euterpe edulis* Martius. Embrapa Florestas. Colombo, PR. 88p.
- SEOANE, C. E. S., SEBBENN, A. M., & KAGEYAMA, P. Y. (2005). Sistema de reprodução em duas populações naturais de *Euterpe edulis* M. sob diferentes condições de fragmentação florestal. *Scientia Florestalis*, 69, 13-24.
- SETZER, J. Atlas Climático e Ecológico do Estado de São Paulo. Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai, 1966. 61p.
- SILVA, D. M. (1991). Estrutura de tamanho e padrão espacial de uma população de *Euterpe edulis* em mata mesófila semidecídua no município de Campinas. Dissertação de Mestrado. Universidade de Campinas, Campinas, SP.

- SILVA, M. DE S., VIEIRA, F. A., & CARVALHO, D. (2011). Diversity and genetic structure in natural populations of *Geonoma schottiana* Mart. (Arecaceae): implications for conservation. *Cernea*, 17(2), 195-201.
- SLATKIN, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236, 787-792.
- SLATKIN, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139, 457-462.
- SOUSA NETO, E., CARMO, J. B., KELLER, M., MARTINS, S. C., ALVES, L. F., VIEIRA, S. A., PICCOLO, M. C., *et al.* (2011). Soil-atmosphere exchange of nitrous oxide, methane and carbon dioxide in a gradient of elevation in the coastal Brazilian Atlantic forest. *Biogeosciences*, 8, 733-742.
- STACY, E. A., HAMRICK, J. L., NASON, J. D., HUBBEL, S. P., FOSTER, R. B., & CONDIT, R. (1996). Pollen dispersal in low-density populations of three neotropical tree species. *The American Naturalist*, 148(2), 275-298.
- TABARELLI, M., & MANTOVANI, W. (1999). A regeneração de uma floresta tropical montana após o corte e queima (São Paulo-Brasil). *Revista Brasileira de Biologia*, 59(2), 239-250.
- TABARELLI, M., 1997, A regeneração da floresta atlântica montana. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- TABARELLI, M., VILLANI, J. P., & MANTOVANI, W. (1994). Estudo Comparativo da vegetação de dois trechos de floresta secundária no núcleo Santa Virginia, Parque estadual da Serra do Mar, SP. *Revista do Instituto Florestal*, 6, 1-11.
- TAUTZ, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17(16): 6463-6471.
- TEIXEIRA, A. P. & ASSIS, M. A. (2005). Caracterização florística e fitossociológica do componente arbustivo-arbóreo de uma floresta paludosa no município de Rio Claro (SP), Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 28(3): 467-476.
- VEKEMANS, X., & HARDY, O. J. (2004). New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13(4), 921-935.
- VIEIRA, S. A, ALVES, L. F., DUARTE-NETO, P. J., MARTINS, S. C., VEIGA, L. G., SCARANELLO, M. A, PICOLLO, M. C., *et al.* (2011). Stocks of carbon and nitrogen and partitioning between above- and belowground pools in the Brazilian coastal Atlantic Forest elevation range. *Ecology and Evolution*, 1(3), 421-34.

- VITASSE, Y., DELZON, S., BRESSON, C. C., MICHALET, R., & KREMER, A. (2009). Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(7), 1259-1269.
- WANG, I. J., & SUMMERS, K. (2010). Genetic structure is correlated with phenotypic divergence rather than geographic isolation in the highly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Molecular Ecology*, 19(3), 447-58.
- WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. (1984). Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- WHITTAKER, J. C.; HARBORD, R. M.; BOXALL, N.; MACKAY, I.; DAWSON, G.; SIBLY, R. M. (2003). Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics*, 164, 781-787.
- WRIGHT, S. (1931). Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97-159.
- WRIGHT, S. (1938). Size of population and breeding structure in relation to evolution. *Science*, 87(2263), 430-2264.
- WRIGHT, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28, 114-38.
- WRIGHT, S. (1946). Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics*, 31: 39-59.
- WRIGHT, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 223-354.
- YAMAGISHI, H., ALLISON, T. D., & OHARA, M. (2005). Effect of snowmelt timing on the genetic structure of an *Erythronium grandiflorum* population in an alpine environment. *Ecological Research*, 20(2), 199-204.
- YOUNG, A., BOYLE, T. & BROWN, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 413-418.