
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CAROLINA DA SILVA CARVALHO

**ESTRUTURA ESPACIAL GENÉTICA DE UMA
POPULAÇÃO DE PALMITO JUÇARA (*Euterpe
edulis*) EM UM FRAGMENTO FLORESTAL
DEFAUNADO**



Rio Claro
2010

CAROLINA DA SILVA CARVALHO

ESTRUTURA ESPACIAL GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE
PALMITO JUÇARA (*Euterpe edulis*) EM UM FRAGMENTO
FLORESTAL DEFAUNADO

Orientador: Alexandra Sanches

Co-orientador: Mauro Galetti Rodrigues

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharel.

Rio Claro
2010

582.0467 Carvalho, Carolina da Silva
C331e Estrutura espacial genética de uma população de palmito
juçara (*Euterpe edulis*) em um fragmento florestal defaunado /
Carolina da Silva Carvalho. - Rio Claro : [s.n.], 2010
44 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro

Orientador: Alexandra Sanches

Co-Orientador: Mauro Galetti Rodrigues

1. Sementes - Dispersão. 2. Microssatélite. 3. Parentesco.
I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu priminho Thomas Nanini, de 6 anos, que já sonha em ser um biólogo. Sempre foi muito interessado no meu trabalho e teve muito orgulho de mim, espero que um dia ele possa ler e entender tudo o que eu fiz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos órgãos financiadores, Fapesp e Fundunesp, pelo apoio financeiro, que foi crucial para a realização deste trabalho.

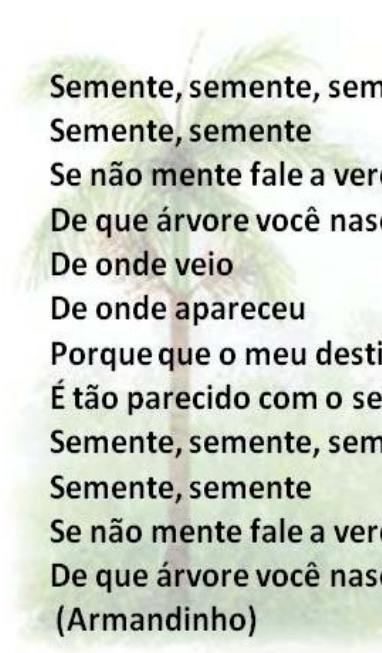
Agradecer as pessoas que me deram suporte durante a realização deste trabalho às vezes parece uma forma singela de dizer a essas pessoas, obrigada. A Lele (Alexandra Sanches), que conheci por acaso em São Carlos e que tornou uma grande amiga e orientadora. Sempre compreensiva e conselheira, porém dura e exigente nas horas necessárias. Ao Mauro, que me deu a oportunidade de aprender muito neste ano de convivência, sempre me incentivando e abrindo portas para crescer na vida acadêmica. A Cibele, que animava todas as manhãs, tardes e noites o laboratório. Sempre ajudando nas minhas dúvidas, além de sempre me deixar para cima com suas frases, porque tudo vai dar certo! Um agradecimento especial ao Pedro Jordano que me auxiliou na elaboração da metodologia e na análise de alguns resultados.

A Cris, que sempre me deu força no laboratório e no campo, dando conselhos e me animando nas horas de desânimo, além da amizade que nos acompanhou por todos esses anos. A todo o pessoal do Labic, mas principalmente a Rubi, Reto, Eveline, Javier e Abraão que sempre me ajudaram no campo. Ao pessoal da Esalq que me receberam de braços abertos e me ensinaram as técnicas para que eu realizasse este trabalho. E ao pessoal da UFG, principalmente a Fer, a Su e o Felipe que me ajudaram na etapa final do trabalho. A Clara, minha companheira de casa, que sempre me entendeu nas horas que não podia fazer os afazeres domésticos porque estava cansada, trabalhando ou viajando. A Jú, pelas noites de domingos mal dormidas porque queríamos colocar os assuntos em dia, sempre ouvindo minhas empolgações sobre meu projeto. Ao Quase, que foi um amigo de todas as horas durante toda a vida universitária.

A minha família, mãe, pai, Natália e Paula, que por mais que não entendessem do meu trabalho, sempre se mostravam interessados e me deram toda a força necessária. Tanto na parte financeira (congressos, cursos) como na emocional, dando carinho e acreditando no meu potencial. E a minha vó, que sempre rezou por mim para que tudo desse certo.

Cada uma dessas pessoas me ajudou de uma força única na aprendizagem e na elaboração deste trabalho. Muito obrigada!!

EPÍGRAFE



Semente, semente, semente
Semente, semente
Se não mente fale a verdade
De que árvore você nasceu?
De onde veio
De onde apareceu
Porque que o meu destino
É tão parecido com o seu?
Semente, semente, semente
Semente, semente
Se não mente fale a verdade
De que árvore você nasceu?
(Armandinho)

RESUMO

Tanta a fragmentação com a defaunação tem afetado uma guilda de dispersores não aleatória, grandes aves e mamíferos são os primeiros a desaparecerem. A extinção local de grandes frugívoros deve afetar a estrutura espacial e demográfica de muitas espécies de plantas que possuem frutos carnosos, porém a maioria dos estudos tem focado em espécies com poucos dispersores. Nós estudamos as possíveis consequências da extinção de grandes frugívoros sobre a distribuição espacial e genética de uma palmeira tropical, o palmito juçara (*Euterpe edulis*), que possui uma alta diversidade de dispersores de sementes. Utilizando marcadores microsatélites e analisando dados através do grau de parentesco e autocorrelação espacial, observamos que a falta dos grandes dispersores nesta área pode estar limitando a dispersão de *E. edulis*, acarretando na agregação de indivíduos, alta porcentagem de indivíduos aparentados, possível ocorrência de endocruzamento na população e uma possível estruturação genética espacial até a distância de 10-12 metros. Além disso, o padrão de distribuição espacial observado nas plântulas dentro de uma subparcela pode estar refletindo o padrão de deposição de sementes realizado pelos *Turdus* spp., o qual regurgita sementes uma a uma; assim, a dispersão esparsa realizada por esses animais pode estar diminuindo a probabilidade de sementes vindas de um mesmo adulto se estabeleçam num mesmo m². No entanto, é necessário que estudos similares sejam realizados em áreas onde há a ocorrência em altas densidades de outros dispersores a fim de comprovar que a distribuição do *E. edulis*, encontrada nesta população, não será encontrada em áreas onde estes animais estão presente.

Key words: seeds dispersal, kinship, defaunation, heart of palm, microsatellites.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	7
OBJETIVOS.....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
Espécie em Estudo.....	11
Área de Estudo.....	14
Método de Amostragem.....	15
Análise Genética.....	16
Extração de DNA:.....	17
PCR.....	18
Genotipagem.....	19
Análise Estatística.....	19
RESULTADOS.....	21
Distribuição espacial do <i>E.edulis</i>	21
Caracterização genética dos marcadores utilizados na análise populacional de <i>E.edulis</i>	22
Caracterização da diversidade genética intrapopulacional.....	23
Análise de Parentesco.....	25
Parcela - análise em macroescala.....	25
Sub-parcela - análise em microescala.....	26
Coancestria.....	28
DISCUSSÃO.....	30
Caracterização genética populacional.....	30
Parentesco genético intrapopulacional.....	31
Coancestria.....	33
Perspectivas futuras.....	35
CONCLUSÃO.....	36
LITERATURA CITADA.....	37

1. INTRODUÇÃO

Atividades humanas vêm transformando florestas tropicais ao redor do mundo em fragmentos isolados e empobrecidos biologicamente (LAURANCE et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2007). A fragmentação pode afetar a riqueza de espécies, a composição e dinâmica populacional (SAUNDERS et al., 1991). Além disso, como resultado principalmente do efeito gargalo e da interrupção do fluxo gênico, pode ocorrer redução da variabilidade genética e aumento da endogamia (ANDRIANOELINA et al., 2009; HAMRICK, 2004; JORDANO et al., 2006; BIERREGARD et al., 1992).

A fragmentação, assim como a defaunação (a extinção local da fauna de médio e grande porte; DIRZO & MIRANDA, 1991), tem afetado uma guilda de forma dispersores não aleatória (REDFORD, 1992). Grandes aves (como jacus, *Penelope spp.*; jucutingas, *Aburria jacutinga*; e tucanos, *Ramphastos spp.*) e mamíferos (antas, *Tapirus terrestris*; queixadas, *Tayassu pecari*; macacos atelídeos) são os primeiros animais a sofrerem com a fragmentação e a defaunação (REDFORD, 1992; WRIGHT, 2003). A perda desses animais de grande porte representa uma ameaça à interação animal-planta e à biodiversidade, já que mais de 90% das plantas tropicais são dispersas por animais (JORDANO, 1992; ALMEIDA-NETO et al., 2008). Portanto, uma mudança na comunidade de frugívoros pode ter influências diretas sobre a comunidade vegetal local, pois processos como a predação de sementes, o pisoteio de plântulas e a dispersão de sementes são alterados (WRIGHT, 2003).

A dispersão de sementes é o primeiro passo para a regeneração de populações naturais de plantas, influenciando na demografia, estrutura genética e distribuição espacial das futuras gerações (WANG & SMITH, 2002). Os grandes frugívoros são importantes na dispersão de sementes, principalmente à longa distância, pois frutos retirados podem ter suas sementes depositadas a centenas de metros longe da planta mãe, podendo conectar populações fragmentadas e colonizar novas áreas, promovendo fluxo gênico entre populações; enquanto que animais de pequeno e médio porte depositam sementes próximo à planta-mãe (NATHAN et al., 2003; GARCIA et al., 2007; JORDANO et al., 2007). Portanto, grandes animais são os maiores responsáveis

pela dispersão de sementes entre populações. Antas e tucanos, por exemplo, são importantes dispersores de longas distâncias, levando sementes até vários quilômetros da origem (FRAGOSO, 1997, HOWE, 1977, HOLBROOK, 2006); enquanto roedores levam sementes a curtas distâncias (GALETTI et al., 2010, DONATTI et al., 2009). Um estudo sobre a contribuição relativa de aves de pequeno e médio porte e mamíferos carnívoros na chuva de sementes de *Prunus mahaleb* (Rosaceae) apontou que poucas espécies contribuem para a dispersão à longa distância, sendo que as aves de pequeno porte contribuem para a dispersão à curta distância e aves maiores contribuem para a dispersão à longa distância (JORDANO et al., 2007).

Assim, a perda dos frugívoros pode levar à redução da dispersão de sementes de uma determinada espécie, pois a chance de uma semente ser dispersa diminui devido ao baixo número de dispersores, o que pode levar ao aumento da deposição de sementes sob a planta mãe, aumentar a proximidade entre indivíduos aparentados levando a uma possível endogamia biparental, e diminuir a colonização de novos ambientes e, conseqüentemente, fluxo gênico. (WANG et al., 2007, WRIGHT et al., 2000, FORGET & JANSEN, 2007). Wright et al. (2000), estudando duas espécies de palmeiras (*Attalea butyraceae* e *Atrocaryum standleyanum*), verificaram que em áreas onde a abundância de grandes mamíferos era alta, as sementes dessas plantas eram dispersas longe e não eram comidas por roedores; enquanto que nas áreas onde a abundância de grandes mamíferos era baixa, as sementes se acumularam embaixo da planta-mãe e poucas sementes escaparam da ação dos roedores. Além disso, a diminuição do movimento de sementes entre populações intensifica o isolamento das mesmas, podendo levar a uma redução da variabilidade genética intrapopulacional e até da diversidade de espécies vegetais (LOISELLE & BLAKE, 2002).

As espécies de plantas mais afetadas pela defaunação são aquelas que possuem frutos e sementes grandes, pois dependem de animais de grande porte para a sua dispersão, já que pequenos animais não são muito eficientes em dispersá-las (CHAPMAN & ONDERDONK, 1998; PIZO, 2004; SILVA & TABARELLI, 2000; PERES & VAN ROOSMALEN, 2002). Portanto, espécies de frutos carnosos que dependem de grandes frugívoros para dispersar suas sementes são particularmente vulneráveis e

podem ter mudança na estrutura espacial, demográfica e genética (JORDANO et al., 2007).

Apesar de existir diversos trabalhos enfocando as conseqüências demográficas das plantas afetadas pela defaunação (FRAGOSO, 1997; HULME, 1998), existe uma lacuna em nosso conhecimento sobre o papel dos dispersores de sementes e sua extinção na estruturação genética das populações de plantas (WANG & SMITH, 2002; PACHECO & SIMONETTI, 2000, HOOLBROOK et al., 2002). Todos os estudos que avaliaram as conseqüências genéticas advindas da perda de dispersores de sementes enfocaram sementes dispersadas por grandes frugívoros. Hoolbrook & Loiselle (2009) encontraram uma redução de 22,6% na dispersão de sementes de *Virola flexuosa*, uma árvore com frutos grandes dispersado por grandes aves frugívoras e primatas, nas áreas de caça; e, ainda, uma redução de aproximadamente 50% na distância de dispersão nessa mesma área. Pacheco & Simonetti (2000) observaram um menor número de alelos comuns em plântulas localizadas abaixo das árvores de *Inga ingoides*, quando comparadas com plântulas oriundas de sementes dispersas por *Ateles* sp. Portanto, a maioria desses estudos foca espécies de plantas que possuem um número restrito de dispersores; no entanto, a grande maioria das plantas possui uma alta diversidade de dispersores.

Utilizando análises genéticas de parentesco, podemos quantificar o número de mães que contribuem para uma determinada população, além da relação genética entre plântulas, entre mães e entre plântulas e mães (JONES & ARDREN, 2003). Por exemplo, através de estudos com *Simarouba amara*, foi observado que 74% das plântulas se estabeleceram em distâncias maiores que 100m do adulto coespecífico (HARDESTY et al., 2006). Isso mostra que essas sementes se estabelecem longe da planta mãe, resultando numa maior chance de sobrevivência (HARDESTY et al., 2006). Portanto, análises genéticas de sementes, plântulas e adultos, podem redirecionar estudos da ecologia de dispersão de sementes, principalmente em relação à estrutura espacial entre os indivíduos, como distância, agregação entre plantas-mãe e propágulos, entre outros (JORDANO & GODOY, 2002).

2. OBJETIVOS

Esse trabalho buscou entender as possíveis conseqüências da extinção de grandes frugívoros sobre a distribuição espacial e genética de uma palmeira tropical, o palmito juçara (*Euterpe edulis*), que possui uma alta diversidade de dispersores de sementes (GALETTI et al., 1999). Nesse trabalho, nós buscamos entender a distribuição espacial dos adultos e plântulas e se o padrão de distribuição de adultos e plântulas pode ser explicado pela perda de dispersores à longa distancia (Figura 1). Através de análises de parentesco entre adultos e plântulas nós discutimos se a distância genética entre os indivíduos pode ser um reflexo da perda de dispersores de sementes.

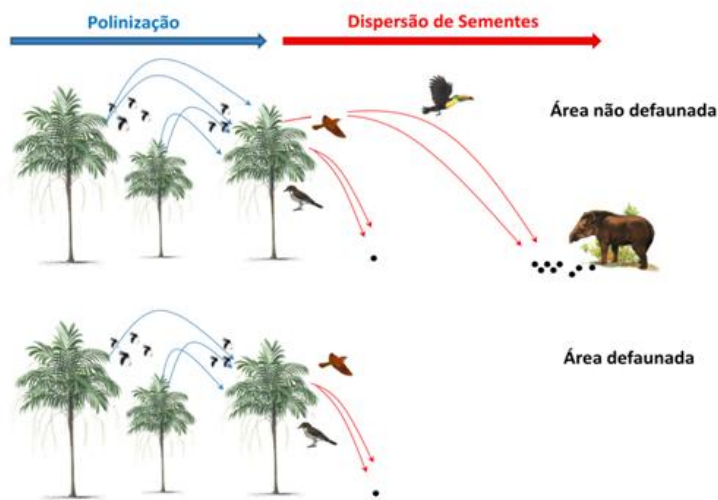


Figura 1: Processo de dispersão de sementes de *E. edulis*, onde animais menores dispersam próximo a planta-mãe e em quantidades baixas e animais maiores são capazes de depositar as sementes a longas distâncias, em densidades maiores (Adaptado de SHEA, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Espécie em estudo

O palmito juçara (*Euterpe edulis*) é uma palmeira que pode atingir de 10 a 15 metros de altura. É distribuída desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (HENDERSON et al., 1995, Figura 2A) e ao longo de sua distribuição pode chegar a 56 adultos/ha (REIS, 1995). Nas florestas semidecíduas, os palmitos se encontram em solos encharcados sazonais ou permanentes (TEIXEIRA & ASSIS, 2005). Já nas florestas ombrófilas essa espécie está relacionada a clareiras nos fundos de vale e médias-encostas (TABARELLI & MANTOVANI, 1997).

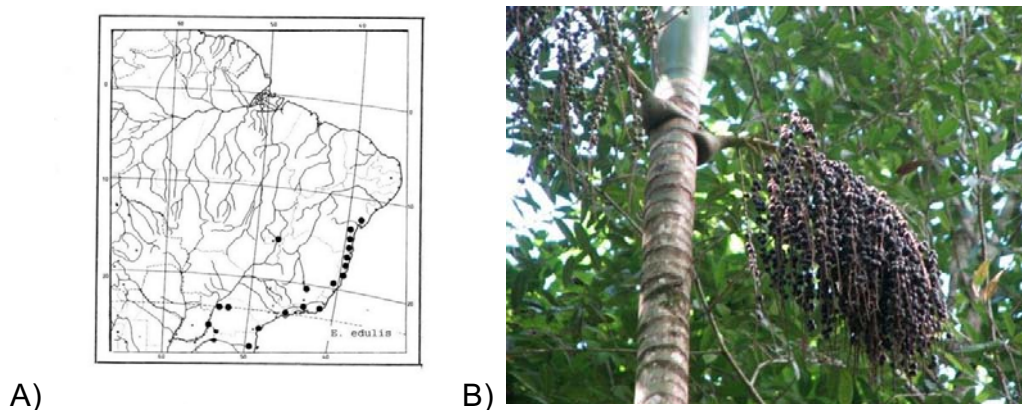


Figura 2: A) Distribuição do *E. edulis* América do Sul (REIS & KAGEYAMA, 2000). B) Infrutescência do palmito juçara (*E. edulis*) (Rodrigo Castro).

A espécie possui estipe único e folhas no ápice, sendo estas alternas, compostas e pinadas; providas de bainha que protege o meristema apical (palmito). É uma espécie monóica, com flores femininas e masculinas constituindo inflorescências do tipo espiga, na qual possui em torno de 200 flores, dentre as quais 40-50 são femininas (LAPS, 1996, REITZ, et al., 1983) (Figura 2B). Possui frutos do tipo drupa, e o diâmetro pode variar entre 8,3 mm à 14,1 mm (PIZO et al., 2006), esta variação permite que o palmito

seja disperso por uma variedade considerável de aves, entre elas as grandes aves frugívoras (*Procnias* spp. , *Penelope* spp., *Ramphastos* spp.) e as pequenas como os sabiás (*Turdus* spp.) (GALETTI et al., 1999). A espécie é dispersa por mais de 47 espécies de aves e 30 de mamíferos (GALETTI et al., 1999; GALETTI et al. dados não publicados).

Fadini et al. (2009) observaram que numa área degradada, onde só ocorriam espécies de *Turdus*, a taxa de remoção de sementes de *E. edulis* era 1,7 vezes menor do que numa área mais conservada e a abundância de plântulas e jovens era 14 vezes menor. Neste mesmo estudo, os autores mostraram que a taxa de remoção de frutos depende, muitas vezes, dos dispersores que estão presentes numa determinada área. As espécies que dispersam *E. edulis* apresentam os mais diversos comportamentos, desde grandes aves que defecam ou regurgitam grandes quantidades de sementes, até pequenas aves dispersoras que regurgitam sementes uma a uma (LAPS, 1996, Tabela 1, Figura 3). Essa diferença de comportamento e estratégia de forrageamento pode interferir ou moldar a distribuição dos genótipos espacialmente na população (Figura 4).

Tabela 1. Comportamento e tratamento dos frugívoros dispersores de *E. edulis* e suas implicações para a distribuição espacial das plântulas. Representação dos gêneros *Turdus*, *Penelope*, *Ramphastos* e *Procnias*(LAPS, 1996).

Espécie	Tamanho (g)	Tratamento	Média de deposição das sementes
<i>Turdus</i> spp.	70g	Regurgitador	Esparsa (1,5 frutos/visita)
<i>Aburria</i> spp.	1300g	Defecador	Agregada (8 frutos/visita)
<i>Ramphastos</i> spp.	400g	Regurgitador	Agregada (5 frutos/visita)
<i>Procnia</i> spp.	190g	Regurgitador	Agregada (2 frutos/visita)
<i>Pteroglossus</i> spp.	130g	Regurgitador	Agregada (5frutos/visita)
<i>Selenidera</i> spp.	140g	Regurgitador	Agregada (9,8 frutos/visita)
<i>Penelope</i> spp.	1200g	Defecador	Agregada (8 frutos/visita)

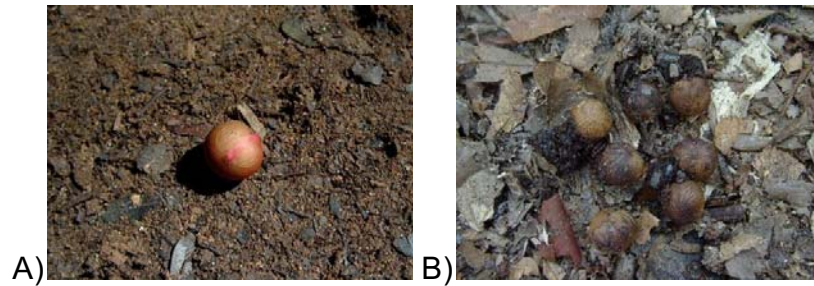


Figura 3: Sementes de *E. edulis* regurgitadas por *Turdus*, mostrando um padrão de deposição espalhado (A) e defecada por jacus, mostrando um padrão agregado (B). Fotos de Marina Côrtes.

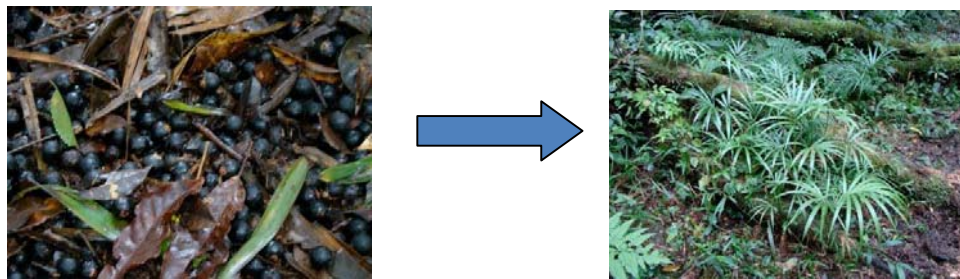


Figura 4: Sementes agregadas de *E. edulis*, levando a um aglomerado de plântulas. Fotos de Mauro Galetti.

Ao longo da distribuição de *E. edulis*, 80% dos fragmentos florestais são menores que 50 ha (RIBEIRO et al., 2009), um tamanho de área que não comporta populações de grandes frugívoros (WILLIS, 1979; BIERREGARD et al., 1992; SILVA & TABARELLI, 2000). Portanto, a extinção local dessas espécies pode afetar a demografia e genética das populações remanescentes de palmito na Mata Atlântica. Estudos demonstraram que em áreas muito isoladas e com alta exploração, as populações de *E. edulis* apresentam maiores taxas de endogamia, menores heterozigosidades e redução do fluxo gênico quando comparadas com populações menos isoladas e em áreas não exploradas (SEOANE et al., 2005; CONTE, 2004).

Área de Estudo

O trabalho foi realizado na Fazenda São José, localizada entre os municípios de Rio Claro e Araras (22°21'S e 47°28'W, Figura 5). O fragmento é constituído de mata semidecídua com um dossel mais ou menos denso e com presença de muitas lianas devido o alto grau de perturbação. Abrange uma área de 230 ha, cercada por monocultura de cana-de-açúcar. A área de solo encharcado, onde o *E. edulis* é encontrado, não ultrapassa 8 ha e a abundância da espécie neste ambiente é de 72% do total de plantas e o valor de importância de 58% (TEIXEIRA & ASSIS, 2005), além disso, os indivíduos adultos desta área representam 1,4% da população total de palmito juçara na área de brejo da Mata São José (FREITAS, 2007).

A região possui clima "Cwa" de acordo com a classificação de Koppen, no qual a temperatura média é 18°C na estação mais fria e 25°C na estação mais quente. A precipitação anual é de 1.456 mm, sendo que 80% ocorre na estação de chuva e 20% na seca. O terreno encontra-se em altitude entre 630 m e 650 m e inclinação de no máximo 10°. A fauna presente na mata é pobre, onde se destacam principalmente espécies de *Turdus rufiventris*, *T. leucomelas* e *T. amaurochalinus* (Labecca, dados não publicados). No entanto, gêneros como *Ramphastos*, *Pipile*, *Procnia*, *Selenidera*, *Pteroglossus*, não são mais encontrados nesta área ou quando presentes estão numa densidade baixíssima (GUSSONI, 2007; WILLIS & ONIKI, 2002; RIBEIRO, dados não publicados).



Figura 5: Mapa do Estado de São Paulo, destacando o município de Rio Claro (em vermelho), onde está localizado a Mata São José (Fonte: Raphael Lorenzeto de Abreu)

Método de Amostragem

Uma parcela de 25 x 50 m foi estabelecida nesta área, onde todos os adultos foram mapeados e amostras das raízes e caule coletados. A parcela foi dividida em 1.250 sub-parcelas de um m². Destas sub-parcelas, foram sorteadas 32 para a amostragem foliar das plântulas. Dentre essas sub-parcelas, 22 apresentaram apenas uma plântula e 10, mais do que duas plântulas (Figura 6).

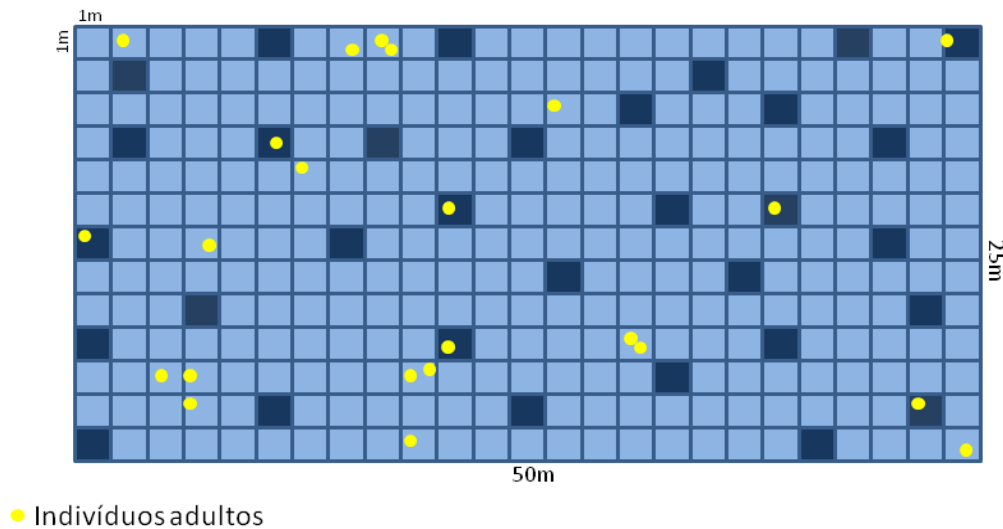


Figura 6: Esquema da parcela para a amostragem dos indivíduos de *E. edulis* para a análise genética. Sendo os quadrados azuis escuros as subparcelas sorteadas, onde amostras foliares de todas as plântulas foram coletadas, os círculos amarelos representam os indivíduos adultos coletados com amostra de raiz e caule.

Todos os indivíduos, plântulas e adultos, foram mapeados e contados em cada subparcela; folhas, caules e raízes coletados foram conservados em sílica em gel para a desidratação e armazenados em temperatura ambiente.

Análise Genética

Marcadores moleculares são segmentos de DNA que fornecem informações úteis sobre a distinção de populações, táxons, ou até indivíduos. As informações podem vir de aloenzimas, DNA, cromossomos ou caracteres morfolologicamente herdáveis (FRANKHAM et al., 2008). Para este trabalho foi utilizado o microsatélite como marcador molecular.

Microsatélites, também denominados de sequências simples repetitivas (SSR), são pequenas sequências de DNA, constituídas de unidades nucleotídicas repetidas em tandem (1-6 nucleotídeos cada unidade) (TAUTZ & RENZ, 1984; TAUTZ, 1989). Estes estão presentes tanto em regiões codificadoras como não codificadoras e são

altamente polimórficos devido à alta variação no número de repetições (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores de microssatélites são muito utilizados, pois são abundantes na maioria dos genomas; são hipervariáveis e codominantes, garantindo a identificação de indivíduos. São analisados por PCR, requerendo pequena quantidade de DNA para sua amplificação (RASFALSKY et al., 1996, FERREIRA & GRATTAPAGLIA., 1998).

Os locos de microssatélites que foram utilizados neste trabalho foram descritos por Gaiotto e colaboradores (2001; Tabela 2).

Tabela 2: Locos de microssatélites de *E. edulis* utilizados neste trabalho (descritos por GAIOTTO et al., 2001).

Locus	Repeat array	Primer sequences (5'3')	Allele size range (bp)	Ta (°C)	GenBank accession no.
EE2	(AG)22	F: CCAAggACgCAATCTCAA R: AgCgAggCAgAACACgTA	82-110	62	AF328879
EE5	(AG)24	F: gAgAACACATAAgCTgC R: gCTTCAgAATTAggACA	102-136	56	AF328882
EE8	(AG)20	F: gTATTCCAATgTgCTCACAg R: gTgCAGTAggCTTCTAgTACC	110-132	58	AF328872
EE25	(AG)26	F: CggATCCTgAgACTgAATTg R: CCACACAgATTCAgAgCAC A	156-190	58	AF328878
EE43	(AG)16	F: gCgAAAggCTAACAAAgTTAT R: AgCgAACCAACCAAgAAgAC	118-132	56	AF328886
EE45	(AG)28	F: AAAGAAATTggCgTgACATC R: AACCAgTCTTCTCCCTCTCg	70-154	56	AF328887
EE47	(AG)20	F: CgAAATCAATggTTTCAgTg R: AATTATTgTTgTgggCagC	214-246	56	AF328874
EE52	(AG)22	F: TTCTgTggAgAgTCAATCATC R: AATCTgACAAggCCTCAAC	230-260	56	AF328888
EE63	(AG)18	F: CCgATATgCTCAAATCAATg R: ACgAgAggAATCAAAGAACCC	106-132	56	AF328889

Extração de DNA:

O material coletado foi macerado com nitrogênio líquido e o DNA foi extraído pela técnica de Doyle & Doyle (1987): adição de 700µl de tampão de extração (100mM TRIS-HCl; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% b-mercaptoetanol; 2% PVP 40) à 150mg de material macerado; incubação em banho-maria a 65°C por 1 hora. Posteriormente, a solução foi resfriada e foram acrescentados 600µl de CIA (Clorofórmio álcool isoamílico 24:1). Após a homogenização, seguiu-se a centrifugação por 15 minutos a 15.000 rpm. Foram acrescentados 400µL de Isopropanol (-20°C) ao sobrenadante recuperado e esta solução foi mantida no freezer por 2 horas. Após

centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado por duas vezes em 0,5mL de Etanol 70% (-20°C), seguida da centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm com o descarte do sobrenadante. O mesmo processo de lavagem foi realizado com 0,5 mL de Etanol 95% (-20°C) e após a secagem do pellet (por algumas horas mantido a temperatura ambiente), o mesmo foi suspenso em 20µL de tampão TE contendo RNase, com incubação a 37° C por 1 hora. Todas as amostras de DNA foram conservadas no freezer.

A qualidade bem como a quantidade de DNA resultante das extrações foi analisada através de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com Gel Red (Biotium) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Figura 7).

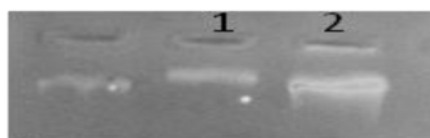


Figura 7: Resultado da Extração de DNA de *E. edulis*: 1-corresponde ao DNA extraído de raiz que encontra-se em torno de 100ng/µL; 2-corresponde ao DNA extraído de folha que encontra-se em torno de 200ng/µL, ambos do mesmo indivíduo.

PCR

Partindo das condições de PCRs propostas por Gaiotto e colaboradores (2001), foram realizados testes e quando necessárias novas padronizações. O volume final da reação foi de 13µl: 1µ de DNA (1,53ng); 1,3µ de Buffer (1mg/ml); 1,3µl de dNTP (0,25mM); 3,25µl de cada primer (0,25mM); 1u de Taq polimerase; 1,3µ de BSA (25µg/ml) e 0,62µl de H₂O. Tanto a concentração de Cloreto de Magnésio, quanto à temperatura foram específicas para cada par de primers (tabela 3).

Tabela 3: Padronização das temperaturas e concentração de Cloreto de Magnésio dos primers descritos para *E. edulis* para plântula e adulto.

Primer	Plântula (folha)		Adulto (caule)	
	Temp °C	[] de MgCl ₂ (mM)	Temp °C	[] de MgCl ₂ (mM)
EE 47	54	0,65	54	0,78
EE 52	54	0,65	54	0,78
EE 5	54	0,78	54	0,78
EE 63	58	0,78	58	0,78
EE 2	60	0,78	62	0,78
EE 8	58	0,78	58	0,78
EE 43	56	0,78	56	0,78
EE 25	58	0,91	58	0,78

Genotipagem

As genotipagens foram realizadas no seqüenciador 3100 da Applied Biosystems, utilizando multiplex de primers fluorescentes FAM, NED e HEX. Os alelos foram identificados com o auxílio do programa GeneMarker v.1.85 Demo (Copyright SoftGenetics LLC).

Análise Estatística

Os genótipos foram submetidos à análise no programa Micro-Checker (OOSTERHOUT et al., 2004), onde erros de genotipagem devido *stuttering*, *dropout* e alelos nulos são identificados.

A variabilidade genética intrapopulacional foi avaliada pelo número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (Ho) e heterozigosidade esperada (He) com a utilização do programa GENEPOP (RAYMOND & ROUSSET, 1995) e Fstat (GOUDET, 1995). E ainda com este programa, foi efetuado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e obtido o coeficiente de endocruzamento. Para todos os testes estatísticos

envolvendo comparações múltiplas, foi adotada a correção de Benjamini & Yekutieli -BY (2001).

Para as análises de parentesco foi utilizado o programa MLRelate (KALINOWSKI et al., 2006), o qual analisa pares de indivíduos, gerando um coeficiente r que varia de 0 a 1, quanto mais próximo de 1, mais aparentados são estes indivíduos. Foram obtidos os valores de parentesco entre todos os indivíduos amostrados na parcela. Ainda utilizando o testes de hipóteses do programa MLRelate foi analisado o grau de parentesco em uma escala menor, entre plântulas de uma mesma sub-parcela.

Além disso, foi analisada a relação entre a similaridade genética e a distância geográfica entre pares de indivíduos (coeficiente de coancestria) pelo autocorrelograma espacial. O coeficiente de coancestria (f_{ij}) (estimador Loiselle) mede a correlação entre pares de indivíduos mapeados utilizando a frequência dos alelos nos locos (KALISZ et al., 2001). Para isso, foi utilizado o software SPAGeDi, o qual foi desenvolvido para caracterizar a estrutura genética espacial de indivíduos mapeados usando dados de genótipos de marcadores codominantes. O programa requer, de cada indivíduo, as seguintes características: uma das três coordenadas espaciais (também permite usar distância Euclidiana) e o genótipo de cada loco do marcador codominante (HARDY & VEKEMANS, 2002). Com os dados gerados pelo programa foi calculado o intervalo de confiança (95%) e gerado gráficos com o programa Excel. Foi realizado teste de significância do padrão obtido através do bootstrapping com 1000 permutações.

4. RESULTADOS

Distribuição espacial do *E. edulis*

A figura 8 abaixo é referente ao mapeamento de plântulas e adultos dentro da parcela 25x50. Foram caracterizados como adultos apenas os indivíduos que apresentavam inflorescência/infrutescência ou cicatriz da inflorescência. Como é possível observar, o grande adensamento de plântulas está associado à proximidade de um adulto, sendo que a quantidade de plântulas diminui drasticamente com o aumento da distância dos adultos.

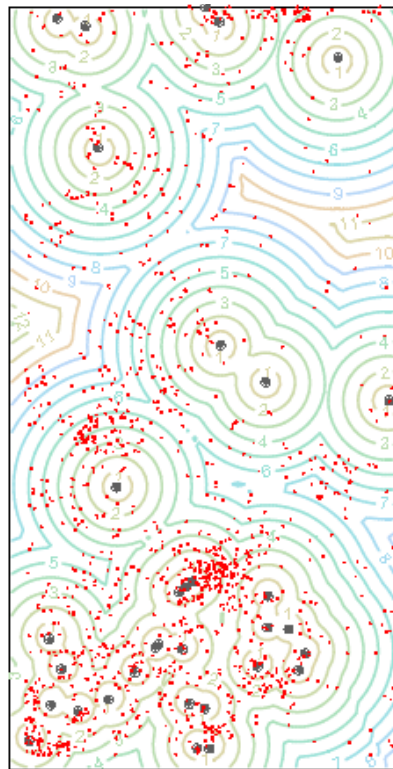


Figura 8: Distribuição espacial de adultos e plântulas na parcela de 25x50m amostrada de *E. edulis* Mata São José. Os círculos pretos representam os adultos e os pontos em vermelhos, as plântulas.

Caracterização genética dos marcadores utilizados na análise populacional de *E. edulis*

Foram extraídos DNA de amostras foliares de 48 plântulas, pertencentes a 32 subparcelas, e amostras radiculares de 34 adultos. Todas as extrações obtiveram sucesso (Figura 9). Na etapa seguinte, obteve-se 100% de sucesso na amplificação de DNA obtidos de amostras foliares, por outro lado, houve insucesso na amplificação de DNA das amostras de raízes (Figura 10). Este insucesso acredita-se ser devido a inibidores de PCR existentes neste órgão vegetal, como por exemplo, excesso de substâncias fenólicas (BOER et al., 1995). Na tentativa de solucionar este problema, foram coletadas amostras caulinares dos mesmos indivíduos adultos; extraído o DNA e realizado as amplificações. Dos nove locos de microssatélites testados, oito tiveram sucesso na amplificação.

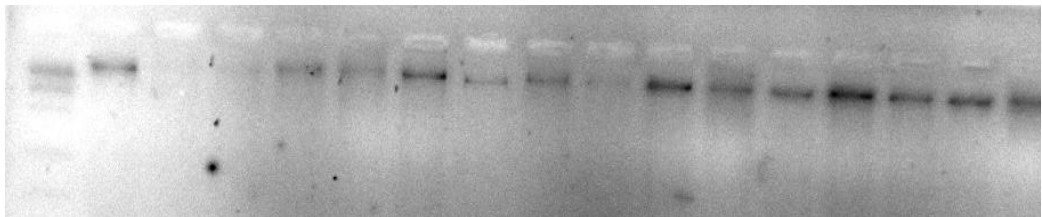


Figura 9: Gel de Agarose 1% da quantificação de DNA das amostras foliares de *E. edulis*.

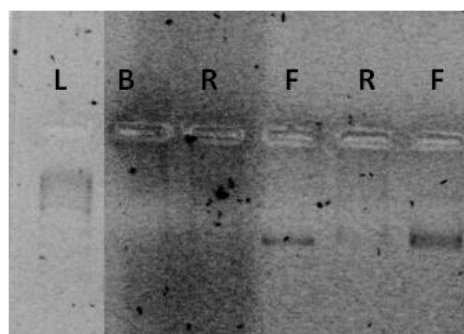


Figura 10: Comparação das amplificações em amostras foliares (F) de *E. edulis* e radiculares (R), sem êxito na amplificação. B (branco) e L (ladder de 100pb).

A genotipagem foi bem sucedida para sete dos oito locos genotipados. O loco EE2 não foi utilizado devido ao excesso de picos inespecíficos e à conseqüente dificuldade em determinar corretamente os alelos (Figura 11).

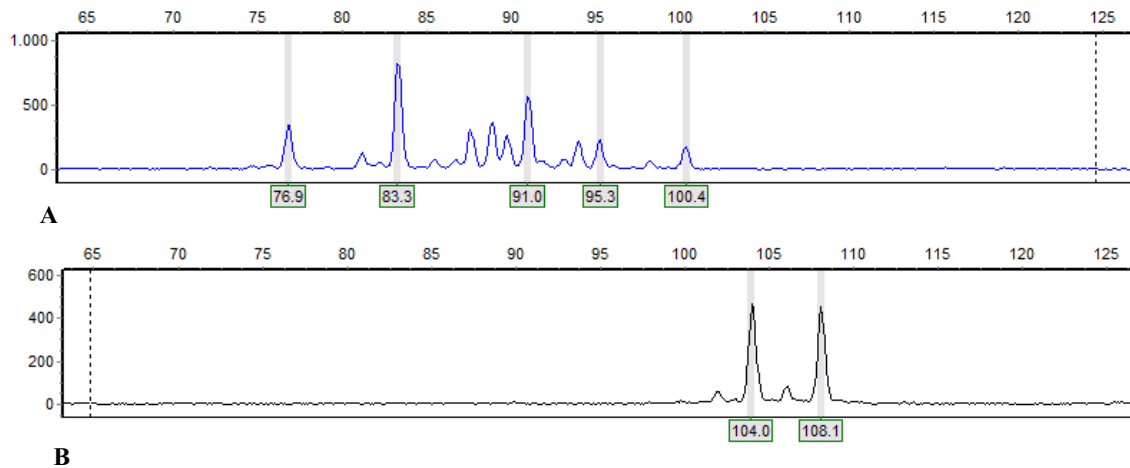


Figura 11: Eletroferogramas de dois dos 7 locos de microsatélite descrito para *E. edulis* analisados com o uso do programa GeneMarker: A. loco EE2 apresentando múltiplos picos; B. loco EE43 com dois picos, indicativo de heterozigoto.

Todos os sete locos amplificados e analisados obtiveram fragmentos de tamanho esperado e foram polimórficos. Dois locos (EE8 e EE43) apresentaram desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Por meio do programa Micro-Checker, foi verificado que esses dois locos (EE8 e EE43) apresentaram problemas de alelos nulos que justifica o déficit de heterozigotos observados (Tabela 4).

Caracterização da diversidade genética intrapopulacional

Considerando o conjunto de locos, foi identificado um total de 105 alelos e valores de heterozigosidade esperada e observada de 0,84 e 0,857; respectivamente (Tabela 4). Além disso, o teste de desequilíbrio de ligação mostrou que nenhum dos pares de locos são ligados podendo ser considerados como caracteres genéticos independentes (Tabela 5).

Tabela 4: Dados genéticos obtidos da população de *E. edulis* na Mata São José, sendo N, número de indivíduos; Na, número de alelos; He, heterozigosidade esperada; Ho, heterozigosidade observada; PHW é o valor de significância para o teste de Hardy-Weinberg; Fis, coeficiente de endocruzamento. Os valores de P ajustados pela correção BY é 0,01928.

Locus	N	Tamanho do fragmento (pb)	Na	Riqueza alélica	Ho	He	P HW	Fis
EE5	74	86-124	17	16,918	0,865	0,891	0,1571	0,0361
EE8	75	88-122	16	15,68	0,373	0,78	0,0071	0,5132
EE43	72	98-122	9	9	0,667	0,81	0,0071	0,1837
EE52	74	212-260	16	15,891	0,824	0,872	0,0857	0,0617
EE63	74	96-128	13	12,973	0,811	0,812	0,5214	0,008
EE25	75	146-198	18	17,836	0,813	0,876	0,0714	0,0786
EE47	75	230-262	16	15,799	0,787	0,842	0,0786	0,0723
Total	82		105		0,857	0,84	0,0071	0,132

Tabela 5: Valores de P gerados pelo teste de Desequilíbrio de Ligação (P ajustado pela correção BY =0,01372).

Locos	P
EE5 X EE8	0.29286
EE5 X EE43	0.30476
EE5 X EE52	0.05476
EE5 X EE63	0.63095
EE5 X EE25	0.13333
EE5 X EE47	0.22857
EE8 X EE43	0.92619
EE8 X EE52	0.50000
EE8 X EE63	0.21905
EE8 X EE25	0.03571
EE8 X EE47	0.18333
EE43 X EE52	0.09048
EE43 X EE63	0.46190
EE43 X EE25	0.59524
EE43 X EE47	0.21667
EE52 X EE63	0.25476
EE52 X EE25	0.43571
EE52 X EE47	0.52619
EE63 X EE25	0.15952
EE63 X EE47	0.22143
EE25 X EE47	0.04286

As mesmas análises foram realizadas para apenas os cinco locos que não apresentavam alelos nulos e para seis locos (alternando a exclusão do loco EE8 ou EE43). No entanto, não houve diferença significativa nas taxas de heterozigosidade observada e esperada quando os locos EE8 e EE43 foram excluídos da análise.

Análise de Parentesco

Parcela: análise em macroescala

Como os locos EE8 e EE43 apresentaram alelos nulos e estavam em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, as análises de parentesco foram realizadas com a utilização de diferentes conjuntos de locos: todos os locos, excluindo-se o loco EE8, excluindo-se o loco EE43, e excluindo-se ambos os locos EE8 e EE43.

Nesta análise é obtido um valor de R (coeficiente de parentesco) variando de 0 a 1, sendo 0 indivíduos não relacionados e 1 indivíduos altamente relacionados (Anexo 1). Através desses valores, foi calculada a porcentagem de indivíduos que possuíam algum grau de parentesco ($R > 0$) (tabela 6). Como não foi observada diferença entre os resultados gerados pelos diferentes tratamentos, serão mostrados no presente trabalho somente os dados resultantes da utilização do conjunto completo de locos.

Tabela 6: Porcentagem de indivíduos que são aparentados entre plântula-plântula, adulto-adulto e todos indivíduos.

% de Parentesco	7 locos	6 locos sem EE8	6 locos sem EE43	5 locos
Plântula – Plântula	40,23%	41,22%	40,52%	39,78%
Adulto-Adulto	37%	37,95%	32,99%	35,26%
Todos	41,89%	41,04%	39,24%	36,90%

Dentre todas as relações possíveis, entre plântulas, entre adultos e considerando ambas as classes, em torno de 40% dos pares analisados apresentaram algum grau de parentesco ($R>0$).

Ainda utilizando os dados obtidos pelo programa MLrelate, foi agrupado todos pares de plântulas-adultos que apresentaram $R=0$ e os que apresentaram R entre 0,4 e 1, ou seja, indivíduos não relacionados e indivíduos fortemente relacionados, respectivamente e tirado a média relativa. Essas duas categorias foram agrupadas em classes de distância, e o resultado foi ilustrado na figura 12.

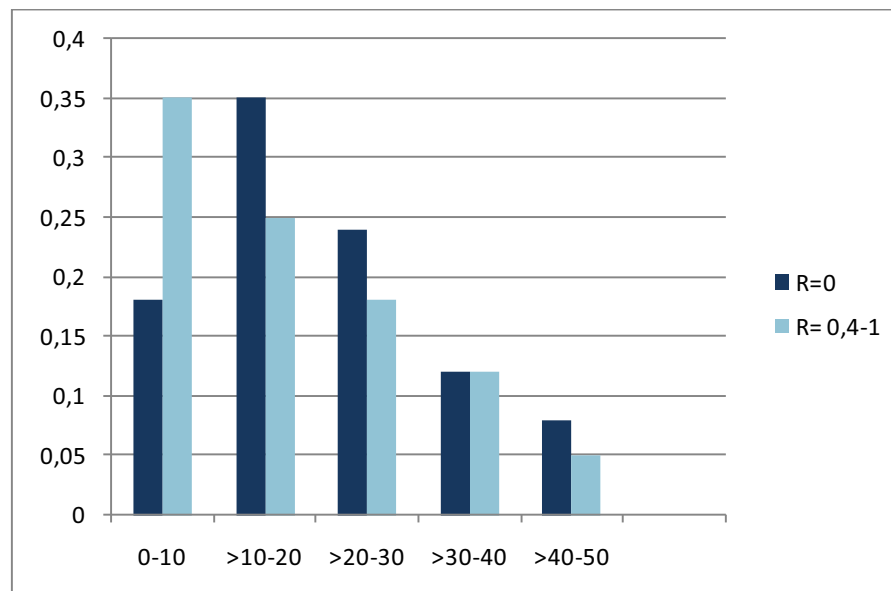


Figura 12: Relação entre frequência de indivíduos (eixo y) e distância geográfica (eixo x) observada entre plântulas e adultos de *E. edulis*. Os indivíduos foram divididos em dois grupos segundo o coeficiente de parentesco, indivíduos não relacionados ($R=0$) e indivíduos fortemente aparentados ($R>0,399$). Foram também separados em classes de distância (entre 0-10 m, >10-20 m, >20-30 m, >30-40 m, >40-50 m).

Sub-parcela – análise em microescala

Quando foi realizada a análise de parentesco em uma escala menor, dentro de cada sub-parcela, o teste da hipótese de parentesco entre pares de plântulas nos

mostrou que a grande maioria dos pares não tinham nenhum grau de parentesco (Tabela 7).

Tabela 7: Teste de hipótese do parentesco entre pares de plântulas de *E. edulis* dentro de cada sub-parcela.

Subparcela	Pares	Classificação
B26	B26A-B26B	Não aparentados
	B26B-B26C	Não aparentados
	B26A-B26C	Não aparentados
D12	D12A-D12B	Não aparentados
E3	E3A-E3B	Não aparentados
G5	G5A-G5B	Não aparentados
	G5B-G5C	Não aparentados
	G5C-G5A	Não aparentados
	G5D-G5A	Não aparentados
	G5D-G5B	Não aparentados
	G5D-G5C	Não aparentados
G22	G22A-G22B	Não aparentados
	G22B-G22C	Não aparentados
	G22C-G22A	Não aparentados
I14	I14A-I14B	Não aparentados
R21	R21A-R21B	Não aparentados
S19	S19A-S19B	Não aparentados
V20	V20A-V20B	Aparentados
	V20B-V20C	Não aparentados
	V20C-V20A	Não aparentados
	V20D-V20A	Não aparentados
	V20D-V20C	Não aparentados
	V20D-V20B	Aparentados
W13	W13A-W13B	Não aparentados

Das dez subparcelas analisadas apenas uma apresentou plântulas com algum grau de parentesco.

Coancestria

Foi gerado um autocorrelograma espacial com dados de coeficiente de coancestria e classes de distância entre todos os indivíduos da população (Figura 13), entre adultos (Figura 14) e entre plântulas (Figura 15); para verificar se ocorre ou não estruturação genética espacial desses grupos quando é analisado o parentesco entre eles.

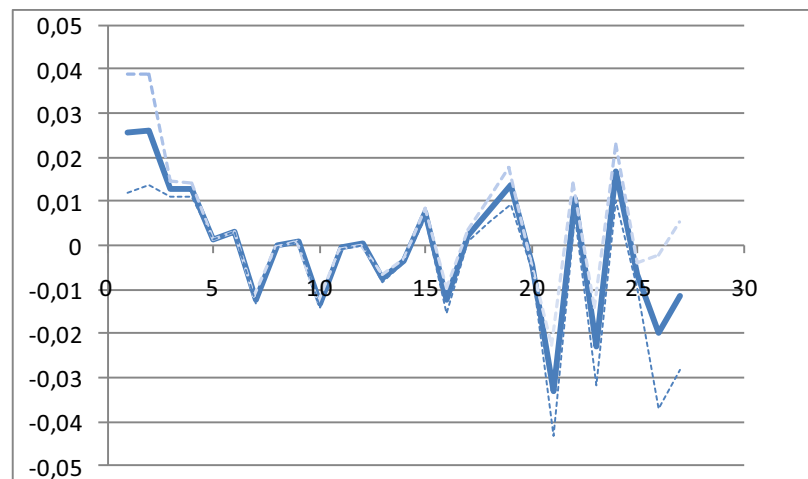


Figura 13: Autocorrelograma espacial de todos os indivíduos de *E. edulis* dentro da parcela 25x50 m da população da Mata São José. O eixo x representa as classe de distâncias, as quais estão divididas de 2m em 2m; e o eixo y representa o coeficiente de coancestria entre pares de indivíduos. Intervalo de Confiança de 95%. Os dados não obtiveram valores significativos ($p > 0,05$ para todas as classes de distância).

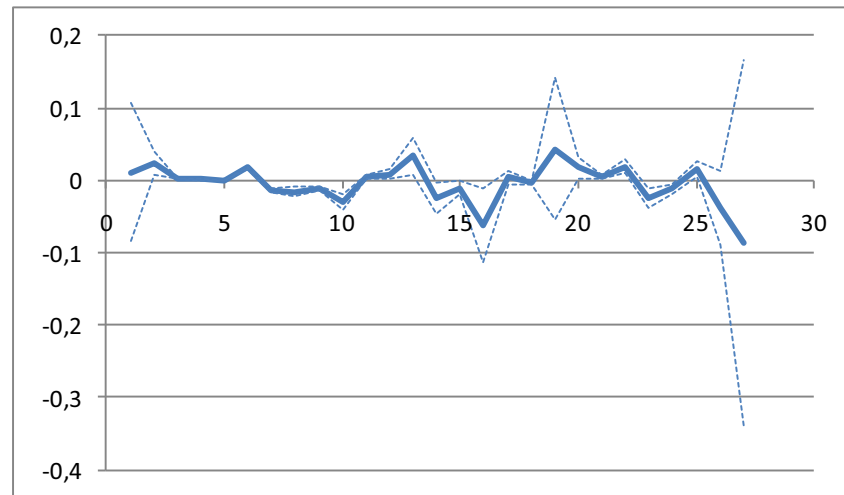


Figura 14: Autocorrelograma espacial dos adultos de *E. edulis* da parcela 25x50 m da população da Mata São José. O eixo x representa as classe de distâncias, as quais estão divididas de 2m em 2m; e o eixo y representa o coeficiente de parentesco entre pares de indivíduos. Intervalo de Confiança de 95%. Os dados não obtiveram valores significativos ($p > 0,05$ para todas as classes de distância).

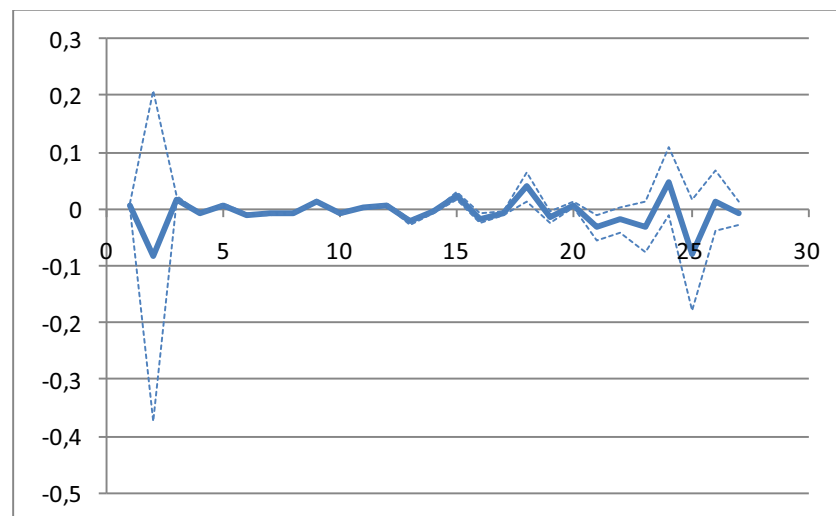


Figura 15: Autocorrelograma espacial das plântulas de *E. edulis* da parcela 25x50 m da população da Mata São José. O eixo x representa as classe de distâncias, as quais estão divididas de 2m em 2m; e o eixo y representa o coeficiente de parentesco entre pares de indivíduos. Intervalo de Confiança de 95%. Os dados não obtiveram valores significativos ($p > 0,05$ para todas as classes de distância).

5. DISCUSSÃO

Caracterização genética populacional

Os locos utilizados foram altamente polimórficos, o que corrobora com os dados de Conte (2004), onde as populações estudadas apresentaram número de alelo por loco que variou de 14,1 a 14,7, no qual o mais polimórfico foi EE47, com 26 alelos e o menos EE 5 com 13 alelos. A população de *E. edulis* estudada neste trabalho, apresentou média de 15 alelos por loco, variando de 9 a 18 alelos.

Através do programa MicroChecker foi identificado alelos nulos nos locos EE8 e EE43, o que explica o déficit de heterozigotos e desequilíbrio de Hardy-Weinberg dos mesmos. No entanto, Gaiotto et al. (2001) não verificaram desequilíbrio de Hardy-Weinberg nem alelos nulos nesses mesmos locos.

Entretanto, todos os locos apresentaram-se em equilíbrio de ligação, ou seja, os locos não estão ligados, portanto suas frequências são independentes. No entanto, quando foram realizados diferentes testes com a exclusão dos locos com alelos nulos, não houve diferenças significativas nos resultados, com isso eles foram utilizados nas análises de parentesco e coancestria.

A população apresentou um coeficiente de endogamia significativamente maior de zero ($F_{is} = 0,132$; $P = 0,0071$) o que reflete em um excesso de homozigotos na população. Uma população que passe por um longo processo de endogamia, em gerações sucessivas, pode apresentar uma redução da heterozigosidade e perda de diversidade genética, com a consequente redução do *fitness*, do sucesso reprodutivo e da sobrevivência, levando ao risco de extinção. (FRANKHAM et al., 2008). No entanto, vale ressaltar que este excesso de homozigotos também pode ocorrer devido à presença de alelos nulos, como o observado para os locos EE8 e EE43. Porém, analisando o coeficiente de endogamia com um conjunto de cinco locos e seis locos, não houve diferenças nos resultados.

Parentesco genético intrapopulacional

Através de observações focais dos frugívoros dispersores de sementes de *E. edulis* na Mata São José; *Turdus spp.* apareceram como as espécies com maior número de visitas e que ingeriram maior quantidade de frutos da espécie (T. RIBEIRO, dados não publicados). Fezes com 6-8 sementes de *E. edulis* de *Penelope superciliaris*, um frugívoro de grande porte, também foram encontrado na área de estudo (M. GALETTI, dados não publicados). Os sabiás, *Turdus spp.*, ingerem em média um fruto por visita e dispersam a mesma em um padrão esparso, ou seja, depositam sementes uma a uma no ambiente (LAPS, 1996; PIZO & SIMÃO, 2001). Entretanto, essas aves são consideradas dispersores de curta distância,(JORDANO et al.,2007). Em contrapartida, os jacus ingerem grande quantidade de frutos em cada vez que visita um indivíduos adulto de *E. edulis* (aproximadamente 8 frutos/visita). É considerado um animal defecador, dispersando as sementes de forma agregada (LAPS, 1996; PIZO & SIMÃO, 2001).

Analisando experimentalmente essas duas espécies, foi verificado que a taxa de germinação em sementes regurgitadas por *Turdus* foi maior que em sementes defecadas por cracídeos (A. LEITE dados não publicados; PIZO & SIMÃO, 2001). Portanto, a efetividade da dispersão de uma espécie de planta, entre inúmeros fatores, é dependente da diversidade de frugívoros, do comportamento pós-alimentação do dispersor no diz respeito a manipulação do fruto pelo animal (regurgitador ou defecador), padrão de movimentação do dispersor (ex. voam longas ou curtas distâncias), do lugar que essas sementes serão deixadas (diferentes micro-habitats) e do modo como estas sementes serão dispersas no ambiente (agregadas ou esparsas; BLEHER & BÖHNING-GAESE, 2001; FRANCISCO & GALETTI, 2002). A dispersão esparsa, embora possa variar com o comportamento dos frugívoros, resulta no estabelecimento das plântulas de centímetros a metros de distâncias de outras plântulas da mesma espécie ou de espécies diferentes (HOWE,1989). Além disso, esse tipo de dispersão resulta em um alto fluxo gênico e baixo nível de endocruzamento entre os indivíduos (HOWE,1989).

Unindo todas essas informações com os resultados obtidos neste trabalho, podemos sugerir que a distribuição do *E. edulis* na Mata São José pode estar sendo afetada pela presença quase exclusiva dos *Turdus* como dispersores desta espécie e pela ausência dos grandes frugívoros na dispersão. Essa hipótese pode ser evidenciada na alta porcentagem de indivíduos com algum grau de parentesco na população (40% em média), e este grande número de indivíduos aparentados pode ser a justificativa da possível ocorrência de endocruzamento relatada na seção anterior. Em um estudo realizado por Seone et al. (2005) também foi relatado que indivíduos de *E. edulis* de uma área fragmentada eram bastante aparentados, ou seja, 43% das plântulas nesta área tinham pelo menos um dos parentais dentro da parcela, este número caiu para 3% em áreas contínuas.

Outro argumento que pode ser utilizado para comprovar que a distribuição do *E. edulis* esta sendo afetada pela redução da diversidade de dispersores é dado quando analisamos a frequência de pares de adulto-plântula que apresentam forte parentesco em diferentes classes de distâncias. Verificamos que a frequência de indivíduos muito aparentados foi maior até a distância de 10 m e após esta distância a frequência de pares adulto-plântula aparentados foi decaindo. O oposto ocorreu com a frequência de indivíduos não aparentados, onde nas primeiras classes a frequência dos potenciais parentes era baixa e foi aumentando à medida que se distanciavam. Portanto, sugerimos que o comportamento de dispersão dos *Turdus* está reduzindo a distância de a dispersão de *E. edulis*, e, assim, a distribuição da diversidade genética não está sendo aleatória. Este mesmo padrão foi encontrado em outros estudos com espécies de plantas que perderam seus principais dispersores (CHUNG et al. 2005; KALISZ et al., 2001).

Além disso, a influência do comportamento dos *Turdus* no padrão de dispersão de *E. edulis* pôde ser confirmado quando foi analisado o parentesco entre as plântulas dentro das subparcelas. Foi verificado que a maioria das plântulas dentro de 1 m² não tinham relação de meio-irmã ou irmã-completa, ou seja, a dispersão esparsa dos *Turdus* está diminuindo a probabilidade de sementes do vindas de um mesmo adulto se estabeleçam num mesmo m². No entanto, é necessário que estudos similares sejam realizados em áreas onde os Ramphastideos ainda são abundantes a fim de comprovar

que a distribuição do *E. edulis*, encontrada nesta população, não será encontrada em áreas onde estes animais estão presente.

Portanto, em plantas que são visitadas por diferentes espécies de animais, a extinção de um dispersor pode ser compensada por outro, porém a perda dos eventos de dispersão a longas distâncias não é compensada (JORDANO, 2007, SETHI & HOWE, 2008). Além disso, uma vez que a distribuição de indivíduos de uma espécie de planta em uma população passa a ter um padrão agregado, os frugívoros tendem a se deslocarem menos, limitando mais a dispersão de sementes e a distribuição de plântulas no ambiente (JORDANO et al., 2006).

Coancestria

Estudos similares a este (HARDESTY, 2005; HOLBROOK, 2006), porém com espécies de plantas que são altamente dependentes de grandes frugívoros na sua dispersão, mostraram que em áreas onde a presença desses animais é muito restrita, principalmente devido a caça e redução de habitats, ocorre forte correlação entre o aumento do grau de parentesco com a redução da distância em plântulas, o que pode indicar dispersão limitada nesta área (HARDESTY, 2005; HOLBROOK, 2006). No entanto, em adultos e jovens não foi encontrado correlação significativa, isso pode ser devido, segundo os autores, a inúmeros filtros que essa espécie encara durante a passagem dos estágios de vida, como: estabelecimento da plântula, recrutamento, etc. (HARDESTY, 2005; HOLBROOK, 2006). Por outro lado, Kalisz et al. (2001) encontraram padrões diferentes, onde as plântulas não apresentavam nenhuma correlação entre distância e grau de parentesco; em contrapartida, o oposto foi observado nos adultos. Neste caso, os autores colocam como justificativa a aleatoriedade da reprodução, mortalidade de sementes e plântulas, e a dispersão “moderada” de sementes (KALISZ et al., 2001).

No entanto, os nossos resultados apontaram para um terceiro padrão, no qual não houve estruturação espacial quando foram consideradas isoladamente plântulas e

adultos. O fato de não ter ocorrido um padrão estrutural em plântulas pode ser devido à presença apenas dos *Turdus* e aves de pequeno porte na área, pois, como já dito anteriormente, esses animais dispersam sementes uma a uma (PIZO & SIMÃO, 2001), de maneira que estas ficam espalhadas, proporcionando uma maior combinação de plântulas originadas de indivíduos adultos diferentes. É igualmente interessante observar que os adultos refletem o mesmo padrão observado em plantas, ou seja, refletem o padrão de dispersão realizado por aves pequenas, como *Turdus*.

Quando é analisado o autocorrelograma entre todos os indivíduos, os valores também não são significativos, apesar de ser evidente o padrão de estruturação até aproximadamente dez metros. Esta ausência de significância nesse resultado pode ser devido ao fato de quando consideramos todos os indivíduos para esta análise, estão incluídas as relações adulto-plântula, mas também adulto-adulto e plântula-plântula. Não é possível realizar através do programa SpaGeDi a análise de correlação entre dois grupos ou categorias independentes, plântula *versus* adultos. Portanto, os resultados das relações adulto-adulto e plântula-plântula podem estar mascarando a significância dos dados de adulto-plântula. Podemos inferir isto, pois a análise realizada na figura 12 indicou, utilizando dados de frequência de parentes na relação adulto-plântula, que até dez metros a maioria dos indivíduos apresentaram alto grau de parentesco, quando comparado com pares de adulto-plântula sem relação de parentesco. Portanto, podemos concluir que, mesmo que não ocorra estrutura espacial entre plântulas-plântulas e adultos-adultos devido a dispersão esparsa por *Turdus*, quando analisado uma plântula com o seu adulto mais fortemente relacionado, percebemos que a distância de dispersão está sendo reduzida.

Desta forma, dada à falta dos grandes dispersores nesta área, de um modo geral a dispersão de *E. edulis* dessa população pode estar sendo limitada acarretando, por sua vez, na agregação dos indivíduos (visto no mapeamento), alta porcentagem de indivíduos aparentados (por volta de 40% dos indivíduos possuem algum grau de parentesco numa área de 25x50m), possível ocorrência de endocruzamento na população (Fis significativamente diferente de zero) e uma possível estruturação genética espacial até a distância de 10-12 metros.

Enfim, analisando a distribuição genética espacial do *E. edulis* nesta área, verificamos que é importante a presença de toda a guilda de dispersores dentro da população, pois os dispersores de pequeno tamanho terão um papel importante na distribuição de plântulas pouco aparentadas e os grande no fluxo gênico intra e interpopulacional (LOISELLE & BLAKE, 2002).

Portanto, a distribuição dos indivíduos dentro de uma população e a distância de dispersão de sementes longe da planta-mãe podem ser reflexo do padrão de movimentação de cada dispersor (HARDESTY et al. 2005). Então, entender como uma espécie de planta está distribuída espacialmente quando seus dispersores são extintos é importante para prevenir, reduzir ou mitigar extinções entre espécies (CORDEIRO et al., 2009).

Perspectivas futuras

Através dos dados desse trabalho, vários pontos foram levantados: a extinção de grande frugívoros que promovem a dispersão de sementes à longa distância, como grandes ramphastídeos e cotingídeos, e o fluxo gênico entre fragmentos, poderiam explicar a estruturação genética de *E. edulis* em fragmentos defaunados. Por outro lado, os frugívoros resilientes (como *Turdus* spp.) poderiam deter então, o padrão espacial da chuva de sementes e promover a alta diversidade de genótipos em escala de micro sítio de regeneração.

Portanto, para testarmos esta hipótese, em estudos futuros, pretendemos comparar a estruturação genética de palmito em uma paisagem recém fragmentada e com tucanos que conectem e promovam fluxo genético entre populações. Acreditamos encontrar alta diversidade (beta) regional e alta ou média diversidade genotípica a nível de micro sítio de recrutamento (alfa).

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir deste trabalho que a extinção de grandes dispersores de *E. edulis* na Mata São José, e o processo de dispersão ocorrendo quase exclusivamente por *Turdus*, está afetando a distribuição espacial do palmito juçara nesta área. A importância desse trabalho foi mostrar que espécies, como o *E. edulis*, que possuem uma grande diversidade de dispersores, também pode ser afetadas com a defaunação. No entanto, é extremamente necessário que o aumento do número de áreas defaunadas estudadas, a fim de verificar se isso é um caso pontual, ou se está ocorrendo em outras populações de *E. edulis* na Mata Atlântica. Além disso, é importante estudar também áreas não-defaunadas para podermos ter uma comparação mais exata e precisa do que está acontecendo nas populações de palmito juçara.

LITERATURA CITADA

ALMEIDA-NETO, M., CAMPASSI, F., GALETTI, M., JORDANO, P. & OLIVEIRA-FILHO, A. Vertebrate dispersal syndromes along the Atlantic forest: broad-scale patterns and macroecological correlates. *Global Ecology and Biogeography*. 17, 503–513. 2008.

ANDRIANOELINA, O., FAVREAU, B., RAMAMONJISOA, L. & BOUVET, J. M. Small effect of fragmentation on the genetic diversity of *Dalbergia monticola*, an endangered tree species of the eastern forest of Madagascar, detected by chloroplast and nuclear microsatellites. *Annals of Botany*. 104, 1231–1242. 2009

BENJAMINI, Y. & YEKUTIELI, D. The control of false discovery rate under dependency. *Ann. Stat.* 29, 1165–1188. 2001.

BIERREGAARD, R. O. LOVEJOY, T. E. KAPOV, V. SANTOS, A. A. & HUTCHINGS, R. W. The Biological Dynamics of Tropical Rainforest Fragments. *BioScience*. 42(11), 859–866. 1992.

BLEHER, B. & BÖHNING-GAESE, K. Consequences of frugivore diversity for seed dispersal, seedling establishment and the spatial pattern of seedlings and trees. *Oecologia*. 129, 385–394. 2001.

BOER, S. H. WARD, L. J., LI, X. & CHITTARANJAN, S. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Research*. 23(13), 2567–2568. 1995.

CHAPMAN, C. A. & ONDERDONK, D. A. Forests Without Primates: Primate/Plant Codependency. *American Journal of Primatology*. 45, 127–141. 1998.

CHUNG, M. Y.; KIM, K. J.; PAK, J. H.; PARK, C. W.; SUN, B. Y.; MYERS, E. R. & CHUNG, M. G. Inferring establishment histories in populations of *Quercus dentata* (Fagaceae) from the analysis of spatial genetic structure. *Plant Systematics and Evolution*. 250, 231–242. 2005.

CONTE, R. Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidos a ação antrópicas utilizando marcadores alozimicos e microssatélites. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2004.

CORDEIRO, N. J.; NDANGALASI, H. J.; MCENTEE, J. P. & HOWE, H. F. Disperser limitation and recruitment of an endemic African tree in a fragment landscape. *Ecology*. 90(4), 1030–1041. 2009.

DIRZO, R. & MIRANDA, A. Altered patterns of herbivory and diversity in the forest understory: a case study of the possible consequences of contemporary defaunation. In: *Plant-Animal Interactions: Evolutionary ecology in tropical and temperate regions*. P.W.

- Price, T.M. Lewinsohn, G.W. Fernandes & W.W. Benson (Eds.). Wiley and Sons Pub. 273-287. 1991.
- DONATTI, C. I., GUIMARÃES, P. R. & GALETTI, M. Seed dispersal and predation in the endemic Atlantic rainforest palm *Astrocaryum aculeatissimum* across a gradient of seed disperser abundance. *Ecological Research*. 24(6), 1187-1195. 2009.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 2, 13–15. 1987.
- FADINI, R. F., FLEURY, M., DONATTI, C. I. & GALETTI, M. Effects of frugivore impoverishment and seed predators on the recruitment of a keystone palm. *Acta Oecologica*. 35, 188-196. 2009.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220. 1998.
- FORGET, P. & JANSEN, P. A. Hunting increases dispersal limitation in the tree *Carapa procera*, a nontimber Forest product. *Conservation Biology*. 21(1) 106-113. 2007.
- FRAGOSO, J. M. V. Tapir-Generated Seed Shadows: Scale-Dependent Patchiness in the Amazon Rain Forest. *Journal of Ecology*. 85(4), 519-529. 1997.
- FRANCISCO, M. & GALETTI, M. Aves como potenciais dispersores de *Ocotea pulchella* (Lauraceae) numa área de vegetação de cerrado do sudeste brasileiro. *Revista Brasileira Botânica*. 25, 11–17. 2002.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., BRISCOE, D. A. Introdução. In: Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética. 2008.
- FREITAS, D. V. Variação espacial da estrutura populacional em matas de brejo: Estudo de caso de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) no interior do Estado de São Paulo. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Campinas. 2007.
- GALETTI, M., ZIPPARRO, V. B., MORELLATO, P. C. Fruting phenology and frugivory on the palm *Euterpe edulis* in a lowland Atlantic Forest of Brazil. *Ecotropica*. 5, 115-122. 1999.
- GALETTI, M., DONATTI, C. I., STEFFLER, C., GENINI, J., BOVENDORP, R. S. & FLEURY, M. The role of seed mass on the caching decision by agouti, *Dasyprocta leporine* (Rodentia: Agoutidae). *Zoologia*. 27(3), 472-476. 2010.
- GAIOTTO, F. A., BRONDANI, R. P. V. & GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes*. 1, 86-88. 2001.

- GARCÍA, C., JORDANO, P. & GODOY, J. A. Contemporary pollen and seed dispersal in a *Prunus mahaleb* population: patterns in distance and direction. *Molecular Ecology*. 16, 1947–1955. 2007.
- GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity - Am Genetic Assoc.* 1995.
- GUSSONI, C. O. A. Avifauna de cinco localidades no município de Rio Claro, estado de São Paulo, Brasil. *Atualidades Ornitológicas*. 136. 2007.
- HAMRICK, J. L. Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*. 197, 323–335. 2004.
- HARDESTY, B. D.; DICK, C. W.; KREMER, A.; HUBELL, S.; BERMINGHAM, E. Spatial genetic structure of *Simarouba amara* Aubl. (Simaroubaceae), a dioecious, animal-dispersed Neotropical tree, on Barro Colorado Island, Panama. *Heredity*. 95, 290-297. 2005.
- HARDESTY, B. D.; HUBBELL, S. P.; BERMINGHAM, E. Genetic evidence of frequent long-distance recruitment in a vertebrate-dispersed tree. *Ecology Letters*. 9, 516-525. 2006.
- HARDY, O. J. & VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*. 2: 618-620. 2002.
- HENDERSON, A.; GALEANO, G. & BERNAL, R. Field guide to the palms of the Americas. Princeton University Press, Princeton. 1995.
- HOLBROOK, K. M. Seed Dispersal Limitation in a Neotropical Nutmeg, *Virola flexuosa* (Myristicaceae): an Ecological and Genetic Approach. Tese de doutorado. University of Missouri. Department of Biology Program in Ecology, Evolution and Systematics. 2006.
- HOLBROOK, K. M., SMITH, T. B. & HARDESTY, B. D. Implications of long-distance movements of frugivorous rain forest hornbills. *Ecography*. 25, 745–749. 2002.
- HOLBROOK, K. M. & LOISELLE, B. A. Dispersal in a Neotropical tree, *Virola flexuosa* (Myristicaceae): Does hunting of large vertebrates limit seed removal? *Ecology*. 90, 1449-1455. 2009.
- HOWE, H. F. Scatter- and clump-dispersal and seedling demography: hypothesis and implications. *Oecologia*. 79, 417-426. 1989.
- HOWE, H. F. Bird activity and seed dispersal of a tropical wet forest tree. *Ecology* 58, 539-550. 1977.

- HULME, P. E. Post-dispersal seed predation: consequences for plant demography and evolution. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 1, 32-46. 1998
- LAPS, R. R. Frugivoria e dispersão de sementes de palmito (*Euterpe edulis*, Martius, Arecaceae) na Mata Atlântica, sul do Estado de São Paulo. Tese de mestrado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. 1996.
- LAURANCE, W. F., A. K. M. ALBERNAZ, P. M. FEARNside, H. L. VASCONCELOS, AND L. V. FERREIRA. Deforestation in Amazonia. *Science*. 304, 1109-1109. 2004.
- LOISELLE, B. A. & BLAKE, J. G. Potential consequences of extinction of frugivorous birds for shrubs of tropical wet forest. In Levey D. J., W. R. Silva & M. Galetti (eds.). *Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation*. Wallingford, CABI Publishing. 397-406. 2002.
- JONES, A. G. & ARDREN, W. R. Methods of parentage analysis in natural population. *Molecular Ecology*. 12, 2511-2523. 2003.
- JORDANO, P. Chapter 5: Fruits and frugivory In: Fenner, M. (ed.). *Seeds: the ecology of regeneration in natural plant communities*. Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, Gran Bretaña. 105-156. 1992.
- JORDANO, P. Frugivores, seeds and genes: analysing the key elements of seed shadows. In: Dennis, A., Green, R., Schupp, E.W., and Wescott, D. (eds.). *Frugivory and seed dispersal: theory and applications in a changing world*. Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, UK. 229-251. 2007.
- JORDANO, P., GALETTI, M., PIZO, M. A. & SILVA, W. R. Ligando Frugivoria e Dispersão de sementes à biologia da conservação. pp. 41 1-436, In: Duarte, C.F., Bergallo, H.G., Dos Santos, M.A., and V a, A.E. (eds.). *Biologia da conservação: essências*. Editorial Rima, São Paulo, Brasil. 2006.
- JORDANO, P., GARCIA, C., GODOY, J. A. & GARCIA-CASTANO, J. L. Differential contribution of frugivores to complex seed dispersal patterns. *PNAS*. 104(9). 2007.
- JORDANO, P. & GODOY, J. A. Frugivore-generated seed shadows: a Landscape view of demographic and genetic effects. In: D.J. Levey, W.R. Silva and M. Galetti, Editors, *Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evolution and Conservation*, CABI, Wallingford. 305-321. 2002.
- KALINOWSKI, S. T., WAGNER, A. P. & TAPER, M. L. *ML-Relate*: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*. 6, 576-579. 2006.

- KALISZ, S., NASON, J. D., HANZAWA, F. M. & TORSON, S. J. Spatial population genetic structure in *Trillium gradiflorum*: The roles of dispersal, mating, history, and selection. *Evolution*. 55(8), 1560-1568. 2001.
- MARSHALL, T. C., SLATE, J., KRUUK, L. E. B., PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural population. *Molecular Ecology*. 7, 639-655. 1998.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., FONSECA, G. A. B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403, 853–858. 2000.
- NATHAN, R. , PERRY, G., CRONIN, J. T., STRAND, A. E. & CAIN, M. L. Methods for estimating long-distance dispersal. *Oikos*. 103, 261–273. 2003.
- NOGUEIRA, E. M., FEARNSIDE, P. M., NELSON, B. W. & FRANCA, M. B. Wood density in forests of Brazil's 'arc of deforestation': Implications for biomass and flux of carbon from land-use change in Amazonia. *Forest Ecology and Management*. 248, 119-135. 2007.
- OOSTERHOUT, C. V., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P. M. & SHIPLEY, P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4(3), 535-538. 2004.
- PACHECO, L. F. & SIMONETTI, J. A. Genetic structure of a mimosoid tree deprived of its seed disperser, the spider monkey. *Conservation Biology*. 14(6), 1766-1775. 2000.
- PERES, C. A. & VAN ROOSMALEN, M. Primate frugivory in two species-rich Neotropical forests: implications for the demography of large-seeded plants in overhunted areas In: D.J. Levey, W.R. Silva and M. Galetti, Editors, Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evolution and Conservation, CABI, Wallingford. 407–421. 2002.
- PIZO, M. A. Frugivory and habitat use by fruit-eating birds in a fragmented landscape of southeast Brazil. *Ornitologia Neotropical*. 15, 117–126. 2004.
- PIZO, M. A. & SIMÃO, I. Seed deposition patterns and the survival of seed and seedlings of the palm *Euterpe edulis*. *Acta Oecologica*. 22, 229-233. 2001.
- PIZO, M. A., VON ALLMEN, C. & MORELLATO, P. C. Seed size variation in the palm *Euterpe edulis* and the effects of seed predators on germination and seedling survival. *Acta Oecologica*. 29(3), 311-315. 2006.
- RASFALKY, J. A., VOGEL, J. M., MORGANTE, M., POWELL, W., ANDRÉ, C. & TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In Birren, B. & Lai, E. Nonmammalian genomic analysis: a practical guide. Orlando: Academic Press. 75-134. 1996.

- RAYMOND, M. & ROUSSET, F. Genepop (version 3.4): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995.
- REDFORD, K. H. The Empty Forest. *BioScience*. 42(6), 412-422. 1992.
- REIS, A. & KAGEYAMA, P. Y. Dispersão de sementes do palmitheiro (*Euterpe edulis* Martius-Palmae) In Reis, M. S. & Reis, A. *Euterpe edulis* Martius – (Palmitheiro) Biologia, Conservação e Manejo. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 64-65. 2000.
- REIS, A. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius (Palmae) em uma floresta ombrófila densa Montana da encosta atlântica de Blumenau, SC. Tese de Doutorado. Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas. 1995.
- REITZ, R. R.; KLEIN, R. M. & REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. *Sellowia*. 34-35. 1983.
- RIBEIRO, C. M., METZGER, J. P., MARTENSEN, A. C., PONZONI, F. J. & HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*. 142, 1141–1153. 2009.
- SAUNDERS, D. A., HOBBS, R. J. & MARGULES, C. R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology*. 5,18-32. 1991.
- SEOANE, C. E. S., KAGEYAMA, P. Y., RIBEIRO, A., MATIAS, R., REIS, M. S., BAWA, K., SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. *Rev. Inst. Flor.* 17(1), 25-43. 2005.
- SETHI, P. & HOWE, H. F. Recruitment of hornbill-dispersed trees in hunted and logged forest of the Indian Eastern Himalaya. *Conservation Biology*. 23 (3), 710-718. 2008.
- SHEA, K. How the wood moves. *Science*. 315, 1231-1232. 2007.
- SILVA, J. M. C. & TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic forest of northeast Brazil. *Nature*. 404, 72-74. 2000.
- TABARELLI, M., MANTOVANI, W. A regeneração de uma floresta tropical montana apos corte e queima (São Paulo-Brasil). *Revista Brasileira de Biologia*. 59(2), 239-250.1997.
- TAUTZ, D. & RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 12, 4126-4138. 1984.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 17, 6364-6471. 1989.

- TEIXEIRA, A. P. & ASSIS, M. A. Caracterização florística e fitossociológica do componente arbustivo-arbóreo de uma floresta paludosa no Município de Rio Claro (SP), Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 28, 467-476. 2005.
- WANG, B. C. & SMITH, T. B. Closing the seed dispersal loop. *Trends of Ecology and Evolution*. 17, 379–385. 2002.
- WANG, B. C., SORK, V. L., LEONG, M. T. & SMITH, T. B. Hunting of Mammals Reduces Seed Removal and Dispersal of the Afrotropical Tree *Antrocaryon klaineum* (Anacardiaceae). *Biotropica*. 39(3), 340–347. 2007.
- WILLIS, E. O. The composition of avian communities in remanescent woodlots in Southern Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 33, 1-25. 1979.
- WILLIS, E. O. & ONIKI, Y. Birds of a central São Paulo woodlot: censuses 1982-2000. *Brazilian Journal of Biology*. 62(2), 197-210. 2002.
- WRIGHT, S. J. The myriad consequences of hunting for vertebrates and plants in tropical forests. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 6, 73–86. 2003.
- WRIGHT, S. J., ZEBALLOS, H., DOMÍNGUEZ, I., GALLARDO, M. M., MORENO, M. C. & IBÁÑEZ, R. Poachers alter mammal abundance, seed dispersal and seed predation in a neotropical Forest. *Conservation Biology*. 14 (1), 227-239. 2000.
- YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation. In: Young, A. G., Boshier, D.; Boyle, T. J. Forest conservation genetics: principles and practice. Melbourne: CSIRO Publishing. 123-134. 2000.