

**Universidade Federal do Paraná**

**Departamento de Botânica**

**Projeto de Pesquisa**

*Projeto Palmito: Desenvolvimento de uma base de dados para a  
fiscalização e conservação de uma espécie-chave da Floresta  
Atlântica, no Estado do Paraná*

Responsável técnico: Profa. Dra. Valéria Cunha Muschner

Curitiba, setembro de 2016

## 1 Introdução

### 1.1 Objeto de Estudo

*Euterpe edulis* pertence à subtribo inteiramente Neotropical *Euterpeinae*, família *Arecaceae*. É popularmente conhecida como palmeira juçara, palmito, palmitero, jiçara, içara, ripa, sarova, entre outros (Martins & Lima 1999; Calvi & Piña-Rodriguez 2005), se distribui no Brasil ao longo da Floresta Atlântica, desde o sul da Bahia até o norte do Rio Grande do Sul (Cardoso & Bovi 1974; Reis *et al.* 2000a). Além do Brasil, ocorre também no leste do Paraguai e norte da Argentina (Klein 1974; Carvalho 1994). Na Floresta Atlântica ocorre principalmente em áreas de Floresta Ombrófila Densa (FOD), entre o nível do mar e 1000 metros (m) de altitude (Reitz *et al.* 1988; Reis *et al.* 1996; Henderson 2000; Reis *et al.* 2000b). Compondo o estrato médio de floresta, a espécie possui características ombrófilas e higrófilas (Reitz *et al.* 1988; Reis *et al.* 1996).

Esta espécie possui flores dispostas em ráquias, reunidas em tríades, com duas flores masculinas e uma feminina (Henderson *et al.* 1995; Henderson 2000; Mantovani & Morellato 2000). As flores masculinas são formadas por três pétalas abertas, seis anteras e por um nectário floral no centro da flor (gineceu rudimentar abortivo). Os grãos de pólen são pulverulentos. As flores femininas são menores, possuem três pétalas imbricadas, três estigmas com nectários em sua base e ovário tricarpelar com apenas um óvulo (Reitz *et al.* 1988; Dorneles 2010). Seus frutos pesam cerca de um grama (Reis *et al.* 1994), são drupáceos e quando maduros apresentam coloração púrpura. O mesocarpo carnoso é fino, unisseminado, com embrião lateral e albume abundante e homogêneo (Reitz 1974; Mantovani 1998).

Em geral *E. edulis* é alógama, pois as inflorescências dióicas apresentam protandria acentuada (Cardoso *et al.* 2000; Mantovani & Morellato 2000). Flores masculinas e femininas permanecem abertas por cerca de sete dias. A antese das flores masculinas ocorre dois a quatro dias antes das flores femininas. Contudo, flores masculinas de uma inflorescência podem se tornar reprodutivas em sincronia com as flores femininas de outra panícula do mesmo indivíduo (Reis 1996 *et al.*; Conte 2004) o que permitiria a ocorrência de geitonogamia. Dorneles *et al.* (2009), baseados em um estudo de Mantovani (1998) considera a espécie autocompatível. No entanto, Dorneles (2010), em seu estudo sobre sistema reprodutivo desta palmeira, observou que o tratamento de autopolinização (flores femininas foram polinizadas com pólen de flores masculinas do mesmo indivíduo) apresentou baixo sucesso quando comparado ao experimento de polinização cruzada (flores femininas foram polinizadas com

pólen de flores masculinas de outro indivíduo). Portanto, há a possibilidade da existência de mecanismos de autoincompatibilidade para a espécie.

A reprodução em *E. edulis* é promovida principalmente pela polinização entomófila (Cardoso *et al.* 2000). A abundante produção de néctar e pólen atrai vários visitantes florais, já registrados em *E. edulis*, pertencentes às Ordens Diptera, Hymenoptera, Coleoptera e Lepidoptera (Reis *et al.* 2000a). Dentre estes, moscas (Diptera), abelhas (Hymenoptera: Apidae, Anthophoridae e Halictidae) e vespas (Hymenoptera: Vespidae) são considerados potenciais polinizadores (Mantovani & Morellato 2000; Dorneles 2010). Reis *et al.* (1993) e Reis *et al.* (1996) consideram a espécie de abelha *Trigona spinipes* (Hymenoptera: Apidae, Fabricius 1973) como principal polinizador. Em uma tese de doutorado do nosso grupo (Santos 2016) foram encontrados, no litoral do Paraná, os seguintes visitantes florais: *Polybia paulista*, *Oxytrigona taitara*, *Apis mellifera*, *Trigona spinipes*, euglossini indet., duas espécies de Diptera e duas de Hymenoptera.

Um indivíduo de *E. edulis* pode produzir anualmente de 600 a 3000 frutos (Bovi *et al.* 1987; Silva Matos & Watkinson 1998). Neste período as infrutescências levam de 165 a 270 dias para a maturação (Mantovani & Morellato 2000). Ao amadurecerem, os frutos são dispersos no solo da floresta. Sem o pericarpo carnoso, extraído pelos dispersores ou degradado no próprio solo, as sementes são expostas. Caso haja condições favoráveis de umidade, ou seja, umidade elevada (Reis 1995) e sombreamento (Conte *et al.* 2000), os propágulos germinam lentamente e de forma heterogênea (Reis 1995). Dependendo das condições climáticas que se encontram podem levar de três a seis meses para germinarem (Rede Juçara 2013). Após o início do desenvolvimento do sistema radicular surgem as duas primeiras folhas com formato de bainha, que servem de proteção para a terceira folha. Esta folha é fotossintetizante e sua presença indica que o indivíduo está em fase de plântula. Muitos destes frutos caem muito próximos à planta mãe e a germinação de várias destas sementes permite a formação de um banco de plântulas (Queiroz 2000).

O longo período reprodutivo e a grande produção de frutos fazem com que esta espécie tenha forte interação com frugívoros da Floresta Atlântica, uma vez que fornece grande quantidade de frutos em períodos de escassez (Peres 2000). O fruto desta palmeira serve de alimento para aves e mamíferos (roedores, marsupiais, primatas e morcegos), e estes podem atuar como dispersores de *E. edulis* (Reis & Kageyama 2000).

Os fatores supracitados, que corroboram para a forte relação entre a palmeira *E. edulis* e a fauna, caracterizam-na como uma espécie-chave de alguns ecossistemas da Floresta Atlântica, uma vez que, sua ausência desencadeia o “efeito dominó”, ou seja, a consequente extinção de outras espécies que compõe a mesma teia alimentar (Galleti *et al.* 2003; Andrade 2011). E ainda, esta relação desempenha importante função na recuperação de florestas em estágio secundário de sucessão, pois polinizadores e dispersores que são atraídos pela *E. edulis* atuam como colonizadores e promovem o fluxo gênico entre várias espécies de plantas (Reis & Kageyama 2000).

## 1.2 Ferramentas Genéticas para a Fiscalização

### Importância econômica

Além da importância ecológica, *E. edulis* possui notável importância econômica e social (Reis & Reis 2000), sendo a causa da superexploração desta espécie. Esta relevância está associada principalmente ao meristema apical da espécie, o palmito, sendo este considerado um dos principais produtos florestais não madeiráveis explorados em região de FOD na Floresta Atlântica (Fatini *et al.* 2000; Meyers & Dornelles 2003). O palmito é muito apreciado no Brasil, Estados Unidos e Europa, e para atender a demanda, estimou-se para o ano 2000 a produção de 30.000 toneladas/ano, 85% dessa produção provinda do Brasil (Pereira 2000). Esta palmeira não é estolonífera, ou seja, não possui a capacidade de rebrotar. Este fator em conjunto com sucessivas extrações consumiu com o potencial de regeneração natural da espécie, comprometendo a viabilidade ecológica e econômica de *E. edulis* (Fatini *et al.* 2000).

Depois de um longo período de exploração desregulamentada, somente a partir da década de 1970, ainda que muito superficiais, surgiram as primeiras leis referentes à regularização da exploração do palmito. Leis específicas relativas ao manejo do palmito foram criadas em 1992 no Estado de São Paulo, em 1994 no Paraná e em 1996 em Santa Catarina (Reis *et al.* 2000c). No Paraná, a legislação em vigor se trata da Resolução Conjunta IBAMA/SEMA PR (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais/Secretaria Estadual do Meio Ambiente Paraná) nº 01/2002 (revoga a Resolução Conjunta SEMA/IBAMA nº01/94; BRASIL 2002), que prevê a exploração da espécie sob Plano de Manejo Sustentável. Além da Resolução SEMA nº 031/98 (BRASIL 1998), que resolve “estabelecer requisitos, critérios e procedimentos administrativos referentes a licenciamento ambiental, autorizações ambientais, autorizações florestais e anuência prévia para desmembramento e parcelamento de gleba rural, a serem cumpridos no território do Estado do Paraná”.

Entretanto, o corte ilegal ainda é uma prática muito comum, pois o longo período de exploração irregular do palmito permitiu a consolidação das práticas de produção e comercialização clandestinas, mesmo sendo evidente que o manejo sustentável é lucrativo tanto do ponto de vista ecológico como do econômico (Galetti & Chivers 1995; Nodari & Guerra 1986; Odorizzi & Ribeiro 1998). Diante deste cenário, a espécie foi considerada extinta em grandes áreas que compõe sua distribuição original (Reitz 1974; Nodari & Guerra 1986; Fatini *et al.* 2000), e é nacionalmente declarada ameaçada de extinção (BRASIL 2008).

Alternativamente, são produzidas conservas de palmito de outras espécies de palmeiras (*Bactris gasipaes* - pupunha, *Archontophoenix alexandrea* ou *A. cunninghamiana* - palmeira-real e *Euterpe oleracea* - açaí) cultivadas para esse propósito. Em 1995, foram iniciados os plantios comerciais de palmito no Paraná, com lavouras e pupunha implantadas primeiramente do Litoral e na Região Noroeste do Estado, ampliando-se para a região do Alto Ribeira (Rodrigues & Durigan 2007). Em meados do ano 2000 as atividades foram ampliadas com plantios de palmeira-real no litoral, no Alto Ribeira e em municípios da Região Norte (como Londrina p.ex.). O palmito da palmeira-real é de melhor qualidade ao do pupunha e, portanto, as lavouras desse palmito sobrepujam as de pupunha na região do Litoral paranaense (Rodrigues & Durigan 2007). O palmito de açaí não é cultivado no Paraná, mas é a principal espécie produzida no Brasil, principalmente no Estado do Pará (Rodrigues & Durigan 2007).

Não existem estimativas a respeito, mas ainda há muito palmito de origem clandestina, cuja entrada ocorre via agroindústrias legalizadas, além de fabriquetas ilegais que atendem restaurantes, churrascarias e lanchonetes (Rodrigues & Durigan 2007). Frente a isso, tornam-se necessárias medidas punitivas para a comercialização ilegal de *E. edulis*.

### DNA barcode

No entanto isso não parece fácil em um primeiro momento, sendo que duas perguntas são pertinentes: como identificar se o palmito comercializado é o que realmente aparece no rótulo do vidro? Quando apreendido na forma *in natura*, como saber se é o palmito juçara, o palmito de pupunha, o palmito de palmeira-real ou o palmito de açaí?

Uma metodologia adequada para responder a essas perguntas é o *DNA barcode*. Essa técnica consiste de identificação das espécies a partir de curtas sequências ortólogas de DNA (Consortium for the Barcode of Life - [www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu)).

Essa técnica permite identificar materiais desconhecidos de espécies conhecidas a partir de sequências de DNA de regiões gênicas (DNA *barcode*). Para isso, precisa-se ter uma sequência suficientemente variável para a discriminação das espécies de interesse e uma biblioteca gênica de referência disponível (Dong *et al.* 2015). Em animais a sequência mais utilizada é a do gene da citocromo oxidase 1 (CO1) do DNA mitocondrial (Herbert *et al.* 2003; Herbert *et al.* 2004). Em plantas, as regiões mais utilizadas são os ITS (*Internal Transcribed Spacers*) do DNA ribossomal, espaçador intergênico do DNA do cloroplasto (cpDNA) *trnH-psbA* e genes *rbcl*, *matK* e *ycf1* também do cpDNA (Alvarez & Wendel 2003, CBOL Plant Working Group 2009, Kress *et al.* 2005, Dong *et al.* 2015).

### 1.3 Conservação de *Euterpe edulis* no Parque Estadual das Lauráceas

#### Viabilidade populacional, variabilidade genética e fluxo gênico

A fragmentação de habitat e a superexploração, resultantes de ação antrópica promovem isolamento, alteram tamanho, forma e densidade de populações de plantas. A demografia e a diversidade genética são diretamente influenciadas pelo tamanho da população (Gibbs 2001). Estudos indicam que populações reduzidas e esparsas de plantas estão sobre ação do “Efeito *Allee*” (Lamont *et al.* 1993; Ghazoul *et al.* 1998; Davis *et al.* 2004), ou seja, há um decréscimo da população em função da baixa densidade populacional (Drake & Kramer 2011). Variações reprodutivas sob estas condições podem acarretar consequências negativas em relação à produção de sementes e em nível de variabilidade genética. Estes fatores influenciam diretamente a capacidade de persistência da população em seu habitat (Ellstrand & Elam 1993; Frankham 1995; Tamaki *et al.* 2009; González-Varo *et al.* 2010).

Plantas polinizadas por animais, quando em populações reduzidas, provavelmente, possuem menor poder de atração do que em populações maiores. Menores taxas de visitação e menor quantidade de pólen depositado acarretam na redução da formação de frutos. A menor frequência de interações mutualísticas também aumentará as chances de endocruzamentos em populações de tamanho reduzido e, conseqüentemente, diminuirá a variabilidade genética (Ågren 2008; Büttow 2012). A redução da variabilidade genética em populações reduzidas pode gerar depressão endogâmica, fomentando assim, o decréscimo da capacidade de geração de descendentes (*fitness*; Ågren 2008; Büttow 2012), e o risco de extinção da população sob estas condições (Kolb *et al.* 2010; Büttow 2012).

A baixa densidade populacional de plantas que possuem animais como vetores de reprodução, altera a quantidade, qualidade e distância do pólen a ser carregado de uma flor para a outra, o

que por sua vez, afeta comunidades de polinizadores em sua composição, abundância e comportamento (Harris & Johnson 2004). Além da interferência no processo de polinização, a baixa densidade populacional interfere na dispersão de frutos, pois implica em menores chances de encontros interespecíficos, reduzindo o sucesso da dispersão (Meyers & Dorneles 2003).

Em contrapartida, os trabalhos de Lammi *et al.* (1999) e Lander *et al.* (2010), que avaliaram populações reduzidas de plantas, não detectaram baixa diversidade genética e redução de *fitness*. Assim, dependendo da biologia da espécie e da localidade, plantas podem manter a viabilidade populacional, mesmo quando em número reduzido de indivíduos. Desta maneira, estas populações não devem ser desconsideradas na composição de estratégias de conservação (Büttow 2012).

Ações antrópicas modificam o meio ambiente alterando a sua estrutura física e interferem em interações biológicas, o que influencia diretamente na estrutura e variabilidade genética de uma população, como supracitado. Assim, observam-se modificações de padrão de dispersão dos indivíduos dentro e entre as populações locais e o aumento das taxas de extinção (Gibbs 2001).

A viabilidade das populações é afetada pela redução da heterozigosidade devido ao endocruzamento elevado (fluxo gênico reduzido) que, por sua vez, aumenta a probabilidade de extinção de uma metapopulação, pois há menor chance de uma futura adaptação evolutiva (Frankham *et al.* 2008). As plantas possuem algumas particularidades que aumentam os efeitos genéticos da fragmentação de habitat, dentre eles: hábito sésil, diferenças interespecíficas na longevidade, tempo de geração e abundância na pré-fragmentação, variedade de sistemas reprodutivos, fluxo gênico por pólen e semente (Young *et al.* 1996).

A variabilidade genética pode ser reduzida em função da baixa densidade de plantas reprodutivas, pois a quantidade e qualidade do fluxo de pólen e da dispersão de sementes tendem a sofrer redução (Nason & Hamrick 1997). Estudos evidenciam que plantas em áreas perturbadas têm o sucesso reprodutivo afetado pela redução da ação de polinizadores (Aizen & Feinsinger 1994b; Cunningham 2000a), deposição de pólen (Aizen & Feinsinger 1994a; Cunningham 2000a; Ghazoul *et al.* 1998; Cascante *et al.* 2002) e redução da produção de frutos e sementes (Aizen & Feinsinger 1994a; Ghazoul *et al.* 1998; Cunningham 2000b; Cascante *et al.* 2002). Com conseqüente redução do fluxo gênico, as gerações subsequentes serão fortemente afetadas pelos efeitos deletérios proporcionados pela baixa variabilidade genética (Charlesworth & Charlesworth 1987; Ellstrand 1992; Ellstrand & Ellam 1993).

Uma das estratégias utilizadas para verificar a estrutura e variabilidade genética em populações de espécies ameaçadas de extinção é a utilização de marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*). Microssatélites são sequências curtas, de 2 a 5 pares de base (pb), repetidas em *tandem*. Para a obtenção destas sequências, é necessária a amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a partir de *primers* específicos (desenvolvidos a partir da espécie de estudo; 20 a 25 pb) que terão a função de flanquear as regiões microssatélites no DNA. Este tipo de marcador tem natureza codominante, o que significa que é possível identificar os alelos presentes em um *loco*, o qual frequentemente é multialélico (Freeland 2005). Graças à natureza codominante e à hipervariabilidade, além de possibilitar a verificação da estrutura e variabilidade genética em populações de plantas, este marcador permite distinguir entre indivíduos, definir sistemas reprodutivos e verificar a maternidade e paternidade entre os indivíduos amostrados (Ashley & Dow 1994; Faleiro 2007). A análise de parentesco é feita por exclusão com base na identificação dos doadores de pólen e fontes das sementes (Ashley 2010).

A identificação geográfica e genética dos doadores de pólen e das fontes de sementes permite a verificação da dimensão espacial da dispersão polínica e de sementes (Dow & Ashley 1998; García *et al.* 2007; García & Grivet 2011). Os marcadores moleculares, como os microssatélites, têm sido amplamente utilizados para este fim (Dow & Ashley 1996; Streiff *et al.* 1999; Godoy & Jordano 2001; Asuka *et al.* 2005; Bacles *et al.* 2006; Hardesty *et al.* 2006; Paireon *et al.* 2006; Selkoe & Toonen 2006; Ashley 2010; Moran & Clarck 2011).

### Área de estudo

O Parque Estadual das Lauráceas (PEL) foi criado em 1979, com o objetivo de conservar importantes remanescentes de uma outrora vasta biodiversidade paranaense, e promover a visitação pública, pesquisa e educação ambiental. Lauráceas é atualmente o maior parque estadual do Paraná, com aproximadamente 32 mil ha. Inserido em uma região caracteristicamente montanhosa e com vales profundos, o PEL abriga uma extensa rede de drenagem, protegida pela Floresta Atlântica, onde também estão presentes cavernas e formações calcárias associadas a uma significativa biodiversidade.

Constituindo-se um dos últimos remanescentes de Floresta Atlântica na região, o PEL possui atributos naturais que o enquadram em uma região estratégica em relação ao Componente Corredor Central da Mata Atlântica, estabelecido para possibilitar a efetiva conservação da diversidade biológica no Brasil. No entanto, esse patrimônio encontra-se severamente ameaçado pela sua gradativa situação de insularização, pela drástica diminuição do estoque de

palmito e pela caça de animais ameaçados de extinção, como a anta (*Tapirus terrestris*) e a jacutinga (*Pipile jacutinga*), entre tantas outras. As constantes ocupações de áreas em seu perímetro, queimadas, extração de madeira e o desmatamento, definem boa parte da paisagem da sua área de entorno.

O clima da região é predominantemente Cfb (Köppen): subtropical úmido mesotérmico, com ocorrência de geadas severas e frequentes, sem estação seca definida; temperatura média anual entre 17°C e 18°C; pluviosidade entre 1400 a 1500 mm/ano; umidade relativa entre 80% e 85%.

## **2 Objetivos**

I. Desenvolvimento de um protocolo, a partir de *DNA barcode*, para a análise das espécies de palmito, nativas e exóticas, de ocorrência no Estado. Esse procedimento permitirá a distinção entre as espécies comercializadas e atestará à Fiscalização do Instituto Ambiental do Paraná a ocorrência ou não do crime ambiental nos pontos de venda

II. Avaliação da variabilidade genética, viabilidade e padrão de dispersão via pólen e sementes da população de *Euterpe edulis* inserida no Parque Estadual das Lauráceas. Especificamente: verificar se a baixa densidade populacional de *E. edulis* no PEL interfere na/o:

- frequência e composição de polinizadores;
- frequência e composição de dispersores;
- capacidade de geração de descendentes (*fitness*) da população

## **3 Justificativa**

O comércio ilegal de *E. edulis* impacta diretamente na redução das populações silvestres desta espécie. Esse processo, conseqüentemente tem um impacto direto sobre as populações de importantes espécies da fauna, tais como aves mamíferos, empobrecendo áreas públicas, comunidades tradicionais e Unidades de Conservação no Estado do Paraná. Além disso, representa um risco à saúde pública quando não existe fiscalização sanitária dos procedimentos de corte, extração, cocção e envasamento em fábricas clandestinas.

A comunidade científica tem como um de seus principais desafios viabilizar a conservação do bioma Floresta Atlântica, mantendo o uso de seus recursos de forma sustentável. Para isto observa-se que, tanto para *E. edulis* como para outras espécies é necessário o conhecimento sobre ecologia e manejo (Favreto 2010).

Os fatores ecológicos, como o comportamento de forrageamento de polinizadores e frugívoros, aliados às ferramentas genéticas, proporcionam a avaliação quantitativa das relações mutualísticas em um ecossistema. Desta forma, é possível observar o papel da dispersão na composição de recursos ecológicos e evolutivos em populações de plantas (Broquet & Petit 2009; García & Grivet 2011).

Entender como as interações bióticas são afetadas por perturbação ambiental passou a ser essencial. Em 1974, Daniel H. Janzen já havia destacado que a conservação do meio ambiente não estava só relacionada à extinção de espécies, mas também a perda de interações bióticas em virtude de perturbações de natureza antrópica (Jordano *et al.* 2006).

Portanto, conhecer e avaliar a biologia reprodutiva, os processos de dispersão de pólen e sementes de uma espécie de planta, tanto sob o aspecto ecológico como o genético, é imprescindível quando se deseja verificar a viabilidade da população (Fisch & Mantovani 1998; Calvi & Piña-Rodríguez 2005).

O plano de manejo do PEL realizado em 2002 indicou que a extração clandestina de palmito é flagrante em muitos locais, levando a crer que a continuidade desta espécie pode estar comprometida. Isso acarreta na diminuição da densidade populacional de *E. edulis*, tornando-se necessária a avaliação do fluxo gênico mediado por pólen e semente na população de *E. edulis* existente na RNSM, visto que, pretende-se restaurá-la e conservá-la.

O baixo número de interações biológicas em função da baixa densidade populacional prejudica a ocorrência de fluxo gênico e, conseqüentemente, a diferenciação genética entre as populações e os indivíduos (Dick *et al.* 2008). Para minimizar o endocruzamento e manter a diversidade genética, é necessário identificar *pools* gênicos e manejá-los, além de restaurar as interações biológicas. (Barbieri 2003; Frankham *et al.* 2004).

O manejo com base no conhecimento genético proporciona maior probabilidade de sobrevivência das populações frente às constantes mudanças do meio (Frankham *et al.*, 2008). A ecologia de polinização e a ecologia de dispersão de sementes devem ser avaliados a nível local. Estes aspectos estão relacionados à interação planta-animal, acarretando em processos essenciais para a sobrevivência e manutenção das populações (Reis & Kageyama, 2000). Por fim, a avaliação do impacto da fragmentação, perda de habitat e da superexploração econômica sobre estruturação genética das populações de *E. edulis* no PEL, em conjunto com os fatores supracitados, potencializa o sucesso das estratégias de manejo a serem definidas (Barbieri 2003; Frankham *et al.* 2004).

Recentemente uma tese de doutorado produzida pelo nosso grupo (Santos 2016) mostrou que o nível de endocruzamento de uma população com baixa densidade de *E. edulis* do Paraná (Reserva Natural Salto Morato - Guaraqueçaba) está bastante elevado, ameaçando a sua viabilidade de curto a médio prazo. Nesta mesma população verificou-se que a distância de dispersão das sementes é consideravelmente menor do que a dispersão de pólen (até 100 m x 1 km, respectivamente) devido, principalmente uma maior frequência de polinizadores do que de dispersores. Frente ao exposto, tornam-se necessários mais estudos em outras áreas do Estado do Paraná para que sejam tomadas decisões adequadas para a conservação de uma espécie-chave da Floresta Atlântica. Além disso, conforme o conhecimento do *pool* gênico de diferentes áreas do Estado do Paraná for aumentando, maiores serão as possibilidades de reconhecimento da procedência dos palmitos juçara apreendidos pelo IAP (Instituto Ambiental do Paraná).

#### **4 Material e Métodos**

##### Para o objetivo I:

Serão testadas quais as sequências de DNA das regiões gênicas *trnH-psbA*, *ITS*, *rbcl*, *matK* ou *ycf1* melhor correspondem à identificação das espécies *Euterpe edulis*, *E. oleracea*, *Bactris gasipaes*, *Archontophoenix alexandrae* ou *A. cunninghamiana*. Essas sequências devem ser suficientemente informativas para a correta identificação das espécies. Para isso serão coletadas amostras do caule de 20 indivíduos de cada espécie, que serão desidratados em sílica gel. Após esse material será pulverizado com nitrogênio líquido em almofariz e o DNA será extraído através do kit de extração “Biopur Kit Extração Mini Spin Planta” (Biometrix). O DNA será avaliado e quantificado através de espectrofotômetro.

Após, o DNA será amplificado via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para as regiões gênicas supracitadas (condições específicas serão estabelecidas para cada uma delas) e sequenciados em sequenciador automático Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystem). As sequências de serão alinhadas e avaliadas no programa Mega7 (Kumar *et al.* 2016).

A partir desse banco de dados, as amostras de palmito apreendidas pelo IAP passarão pelo processo de extração, amplificação e sequenciamento de uma região gênica (a que melhor corresponder à identificação correta das espécies) e comparadas às sequências do banco de dados. Esse processo ocorrerá em, no máximo, cinco dias úteis.

##### Para o objetivo II:

Serão amostrados 100 indivíduos de cada estágio de desenvolvimento (adultos [reprodutivos com DAP $\geq$ 13 cm], juvenis [não reprodutivos com a estipe exposta  $\geq$ 20 cm] e embriões [frutos]) de *E. edulis* distribuídos pela área do PEL. Os indivíduos serão identificados e localizados espacialmente através de coordenadas geográficas (GPS Garmin 62S). O material vegetal será acondicionado em sílica gel para secagem e posterior extração de DNA.

Depois de desidratados em sílica gel, o material vegetal coletado será pulverizado com nitrogênio líquido em almofariz e o DNA será extraído através de kit de extração “Biopur Kit Extração Mini Spin Planta” (Biometrix). O DNA será avaliado e quantificado através de espectrofotômetro.

Oito regiões de microssatélites desenvolvidas por Gaiotto et al (2001), e já testadas por Santos (2016), serão amplificadas via PCR e genotipadas em sequenciador automático Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystem). Após, os alelos serão identificados (com base nos tamanhos – em pares de base) através do programa GeneMapper v.3.7 (*Applied Biosystems*).

As métricas de variabilidade genética (Equilíbrio de Hardy-Weinberg, número de alelos efetivos, índice de Shannon, heterozigosidades esperada e observada, coeficiente de endocruzamento [por estágio de desenvolvimento]) serão avaliadas pelo software GenAlex (v. 6.502; Peakall & Smouse 2012). Adicionalmente, as amostras serão analisadas através do modelo desenvolvido por Santos (2016) para a avaliação do kernel de dispersão de pólen e sementes.

Para testar se a baixa densidade populacional de *E. edulis* influencia a frequência e composição de polinizadores, serão identificados os visitantes florais e o comportamento dos mesmos através da observação focal em, pelo menos, vinte indivíduos distribuídos na área do PEL (Dafni 1992). Neste processo, serão registrados o período e a duração das visitas, e o comportamento dos visitantes florais. Os visitantes florais serão caracterizados como polinizadores ou não. Outras análises serão realizadas conforme Santos (2016).

Para testar se a baixa densidade populacional de *E. edulis* influencia a frequência e composição de dispersores, serão realizadas observações focais de, pelo menos, vinte indivíduos com frutos maduros, que tenham boa visibilidade da copa. A observação focal consiste em permanecer próximo ao indivíduo, registrando os animais que dela se alimentam (Cazetta et al. 2002; Francisco & Galetti 2002, Galetti et al. 2003). As observações serão realizadas com auxílio de binóculo e câmera fotográfica. Outras análises serão realizadas conforme Santos (2016).

## 5 Referências bibliográficas

- Ågren J. 2008. Population size, pollinator limitation, and seed set in the self- incompatible herb *Lythrum salicaria*. *Ecology* 77: 1779-1790.
- Aizen MA, Feinsinger P. 1994a. Forest Fragmentation, Pollination, and Plant Reproduction in a Chaco Dry Forest, Argentina. *Ecology* 75: 330-351.
- Aizen MA, Feinsinger P. 1994b. Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral honeybees in Argentine "Chaco Serrano". *Ecological Applications* 4: 378-392.
- Alvarez I & Wendel JF. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 417–434.
- Andrade ER. 2011. Frugivoria e predação de sementes de *Euterpe edulis* Mart. na RPPN Serra Bonita, Bahia, Brasil. X Congresso de Ecologia do Brasil, 16 a 22 de Setembro de 2011, São Lourenço – MG.
- Ashley MV & Dow BD. 1994. The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications. In: Schierwater BSB, Wagner GP, DeSalle R. (eds.). *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, p. 185–201.
- Ashley MV. 2010. Plant parentage, pollination, and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29: 148–161.
- Asuka Y, Tomaru N, Munehara Y, Tani N, Tsumura Y, Yamamoto S. 2005. Half-sib family structure of *Fagus crenata* saplings in an old-growth beechdwarf bamboo forest. *Molecular Ecology* 14: 2565–2575.
- Bacles CFE, Lowe AJ, Ennos RA. 2006. Effective seed dispersal across a fragmented landscape. *Science* 311: 628.
- Barbieri RL. 2003. Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: Freitas LB, Bered F. *Genética e Evolução Vegetal*. 1ªed. Porto Alegre: Editora UFRGS, p. 403-414.
- Barrett SCH. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* 3: 335-341.
- Bovi MLA, Godoy Jr G, Saes LA. 1987. Pesquisas com os generos *Euterpe* e *Bactris* no Instituto Agrônomo de Campinas. *O Agrônomo* 39: 129-174.
- BRASIL 1998. Secretaria Estadual de Meio Ambiente – Paraná. Resolução nº 31 de 24 de agosto de 1998. Dispõe sobre o licenciamento ambiental, autorização ambiental, autorização florestal e anuência prévia para desmembramento e parcelamento de gleba rural.
- BRASIL 2002. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais/Secretaria Estadual do Meio Ambiente Paraná. Resolução Conjunta IBAMA/SEMAGR nº 01 de 23 de outubro de 2002. Dispõe sobre a exploração de *Euterpe edulis* (palmito), e dá outras providências.
- BRASIL 2008. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº 06 de 23 de setembro de 2008. Estabelece a Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção.

- Broquet T & Petit EJ. 2009. Molecular estimation of dispersal for ecology and population genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 193-216.
- Büttow 2012. Estudo do sucesso reprodutivo, dos padrões de cruzamento e do fluxo de pólen em *Aechmea winkleri*, uma espécie endêmica do sul do Brasil. Tese de Doutorado, UFRGS: Porto Alegre-RS.
- Calvi GP & Piña-Rodrigues FCM. 2005. Fenologia e Produção de Sementes de *Euterpe edulis* Mart. em trecho de Floresta de Altitude no município de Miguel Pereira-RJ. *Revista Universidade Rural* 25: 33-40.
- Cardoso M & Bovi MLA. 1974. Estudos sobre o cultivo do palmito. *IAC-SUDELPA* 26: 1-18.
- Cardoso SRS, Eloy NB, Provan J, Cardoso MA, Ferreira PCG. 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology* 9: 1753-1760.
- Carvalho PER. 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. EMBRAPA-CNPQ, Brasília, Brasil. p. 640.
- Cascante A, Quesada M, Lobo JJ, Fuchs EA. 2002. Effects of dry Forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology* 16: 137-147.
- Cazetta E, Rubim P, Lunardi V, Francisco MR, Galetti M. 2002. Frugivoria e dispersão de sementes de *Talauma ovata* (Magnoliaceae) no sudeste brasileiro. *Ararajuba* 10: 199-206.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 12794–12797.
- Charlesworth D & Charlesworth B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review Ecology, Evolution and Systematics* 18: 237–268.
- Conte R, Reis A, Mantovani A, Mariot A, Fantini AC, Nodari RO, Reis MS. 2000. Dinâmica da regeneração natural de *Euterpe edulis* Martius (Palmae) na Floresta Ombrófila Densa da Encosta Atlântica. In: Reis MS & Reis A. *Euterpe edulis* Martius (Palmito) Biologia, Conservação e Manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 106-130.
- Conte R. 2004. Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites. Tese de Doutorado, USP: São Paulo-SP.
- Cunningham SA. 2000a. Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 1471-2954.
- Cunningham SA. 2000b. What determines the number of seed produced in a flowering event? A case study of *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Arecaceae). *Australian Journal of Botany* 48: 659-665.
- Dafni A. 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. New York: Oxford University Press.
- Davis HG, Taylor CM, Lambrinos GJ, Strong DR. 2004. Pollen limitation causes an Allee effect in a wind-pollinated invasive grass (*Spartina alterniflora*). *PNAS* 101: 13804-13807.
- Dick CW, Hardy OJ, Jones FA, Petit RJ. 2008. Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. *Tropical Plant Biology* 1: 20-33.
- Dong W, Xu C, Li C, Sun J, Zuo Y, Shi S, Chen T, Guo J, Zhou S. 2015. *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific Reports – Nature* 5: 8348.

- Dorneles LL, Padilha MT, Miller PRM, Gonçalves PF, Steiner J, Zillikens A. 2009. Polinização de *Euterpe edulis* (Arecaceae) por abelhas em sistema agroflorestal na ilha de Santa Catarina. In: VII Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais. Brasília, DF.
- Dorneles LL. 2010. Interações entre *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae) e insetos visitantes florais em sistemas agroflorestais na Ilha de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado, UFSC: Florianópolis-SC.
- Dow BD & Ashley MV. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* 5: 615–627.
- Dow BD & Ashley MV. 1998. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Journal of Heredity* 89: 62-70.
- Drake JM & Kramer AM. 2011. Allee Effects. *Nature Education Knowledge* 3: 2.
- Ellstrand NC & Elam DR. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology & Systematics* 24: 217-242.
- Ellstrand NC. 1992. Gene Flow by Pollen: Implications for Plant Conservation Genetics. *Oikos* 63: 77-86.
- Faleiro FG. 2007. Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 102.
- Fantini AC, Guries R, Ribeiro RJ. 2000. Produção de palmito (*Euterpe edulis* Martius - Arecaceae) na Floresta Ombrófila Densa: potenciais, problema e possíveis soluções. In: Reis MS & Reis A. *Euterpe edulis* Martius (Palmito) Biologia, Conservação e Manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 256-280.
- Favreto R. 2010. Aspectos Etnoecológicos e Ecofisiológicos de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae). Tese de Doutorado, UFRGS: Porto Alegre-RS.
- Fisch STV, Nogueira Jr LR, Mantovani W. 2000. Fenologia reprodutiva de *Euterpe edulis* Mart. na Mata Atlântica (Reserva Ecológica do Trabiçu, Pindamonhanga – SP). *Revista Biociências* 6: 31-37.
- Francisco MR & Galetti M. 2002. Aves como potenciais dispersoras de sementes de *Ocotea pulchella* Mart. (Lauraceae) numa área de vegetação de cerrado do sudeste brasileiro. *Revista Brasileira de Botânica* 25: 11-17.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2004. *A Primer of Conservation*. New York: Cambridge University Press.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Frankham R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research* 66: 95-107. doi: 10.1017/S0016672300034455.
- Freeland J. 2005. *Molecular Ecology*. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd.
- Gaiotto FA, Brondani PV, Grattapaglia D. 2001. Microsatellite markers for heart of palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes* 1: 86-88.
- Galetti M & Chivers DJ. 1995. Palm harvest threatens Brazil's best protected area of Atlantic Forest. *Oryx* 29: 225-226.

- Galetti M, Pizo MA, Morellato PC. 2003. Fenologia, frugivoria e dispersão de sementes. In: Cullen LJ, Rudran R, Pádua CV. (orgs.) Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre. Curitiba: Editora UFPR, p. 395-423.
- García C & Grivet D. 2011. Molecular insights into seed dispersal mutualisms driving plant population recruitment. *Acta Oecologica* 37: 632–640.
- Ghazoul J, Liston KA, Boyles TJB. 1998. Disturbance-induced density-dependent seed set in *Shorea siamensis* (Dipterocarpaceae), a tropical forest tree. *Journal of Ecology* 86: 462-473.
- Gibbs JP. 2001. Demography versus habitat fragmentation as determinants of genetic variation in wild populations. *Biological Conservation* 100: 15-20.
- Godoy JA & Jordano P. 2001. Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. *Molecular Ecology* 10: 2275–2283.
- González-Varo JP, Albaladejo RG, Aparicio A, Arroyo J. 2010. Linking genetic diversity, mating patterns and progeny performance in fragmented populations of a Mediterranean shrub. *Journal of Applied Ecology* 47: 1242-1252.
- Hardesty BD, Hubbell SP, Bermingham E. 2006. Genetic evidence of frequent long-distance recruitment in a vertebrate-dispersed tree. *Ecology Letters* 9: 516-525.
- Harris LF & Johnson SD. 2004. The consequences of habitat fragmentation for plant-pollinator mutualisms. *International Journal Tropical Insect Science* 24: 29–43.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 270, 313–321.
- Hebert PDN., Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol.* 2, e312.
- Henderson A, Galeano G, Bernae R. 1995. Field guide to the palms of the Americas. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Henderson A. 2000. The Genus *Euterpe* in Brazil. In: Reis MS & Reis A. *Euterpe edulis* Martius (Palmitreiro) Biologia, Conservação e Manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 1-22.
- Janzen DH. 1974. The deflowering of Central America. *Natural History* 83: 49-53.
- Jordano P, Galetti M, Pizo MA, Silva WR. 2006. Ligando frugivoria e dispersão de sementes a Biologia da Conservação. In: da Rocha CFD, Bergallo HG, Alves MAS, Van Sluys M. (eds.). *Biologia da conservação: essências*. São Paulo: Editorial Rima, p. 411-436.
- Klein RM. 1974. *Euterpe edulis* Martius: Observações ecológicas. In: Reitz R (Ed.). *Palmeiras. Flora ilustrada catarinense* Palm: 102–105.
- Kolb A, Dahlgren JP, Ehrlén J. 2010. Population size affects vital rates but not population growth rate of a perennial plant. *Ecology* 91: 3210-3217.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8369–8374.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Mol Biol Evol*: 33: 1870-1874.

- Lammi A, Siikamäki P, Mustajärvi K. 1999. Genetic diversity, population size, and fitness in central and peripheral populations of a rare plant *Lychnis viscaria*. *Conservation Biology*, 13: 1069-1078.
- Lamont BB, Klinkhamer PGL, Witkowski ETF. 1993. Population fragmentation may reduce fertility to zero in *Banksia goodii* - a demonstration of the Allee effect. *Oecologia (Berl.)* 94: 446-450.
- Lander TA, Boshier DH, Harris SA. 2010. Fragmented but not isolated: Contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. *Biological Conservation* 143: 2583-2590.
- Mantovani A & Morellato P. 2000. Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral do palmito. In: Reis MS & Reis A. *Euterpe edulis* Martius (Palmito) Biologia, Conservação e Manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 23-38.
- Mantovani A. 1998. Fenologia e aspectos de biologia floral de uma população de *Euterpe edulis* Martius. Na Floresta Atlântica no Sul do Brasil. Dissertação de Mestrado, UNESP: Rio Claro-SP, p 66.
- Martins SV & Lima DG. 1999. Culturas de palmeiras I: Palmito (*Euterpe edulis* Mart.). Viçosa: UFV, p. 28. (Cadernos didáticos, 54).
- Meyers FS & Dorneles SS. 2003. Demografia do palmito *Euterpe edulis* (Arecaceae) na floresta ombrófila densa de terras baixas em regeneração, na região da Vila da Glória, São Francisco do Sul (SC). *Revista Saúde e Ambiente* 4: 7-13.
- Moran EV & Clark JS. 2011. Estimating seed and pollen movement in a monoecious plant: a hierarchical Bayesian approach integrating genetic and ecological data. *Molecular Ecology* 20: 1248-1262.
- Nason JD & Hamrick JL. 1997. Reproductive and Genetic Consequences of Forest Fragmentation: Two case studies of Neotropical Canopy Trees. *The Journal of Heredity* 88: 264-276.
- Nodari RO & Guerra MP. 1986. O palmito do sul do Brasil: situação e perspectivas. *Useful palms of Tropical America* 2: 9-10.
- Odorizzi J & Ribeiro RJ. 1998. Relatório do Levantamento da População natural do projeto de enriquecimento florestal através do repovoamento de palmito *Euterpe edulis* Mart. nas Comunidades Quilombolas do Vale do Ribeira. Mitra Diocesana de Registro, Registro, SP. 15p.
- Pairon M, Jonard M, Jacquemart A-L. 2006. Modeling seed dispersal of black cherry, an invasive forest tree: how microsatellites may help? *Canadian Journal of Forest Research* 36: 1385-1394.
- Peakall R & Smouse PE. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pereira LB. 2000. A economicidade do palmito (*Euterpe edulis* Martius) sob manejo em regime de rendimento sustentado. In: Reis MS & Reis A. *Euterpe edulis* Martius (Palmito) Biologia, Conservação e Manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 225-244.
- Peres CA. 2000. Identifying keystone plant resources in tropical forests: the case of gums from *Parkia* pods. *Journal of Tropical Ecology* 16: 287-317.

- Queiroz MH. 2000. The Genus *Euterpe* in Brazil, p. 39-59. In: Reis MS & Reis A. *Euterpe edulis* Martius (Palmitreiro) Biologia, Conservação e Manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 39-59.
- Rede Juçara. Características e Cultivo. Disponível em: <http://www.redejucara.org.br>. Acesso em: 08 de jul. 2013.
- Reis A & Kageyama PY. 2000. Dispersão de Sementes de *Euterpe edulis* Martius Palmae, p. 60-92. In: Reis MS & Reis A. *Euterpe edulis* Martius (Palmitreiro) Biologia, Conservação e Manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 60-92.
- Reis A, Kageyama P, Reis MS, Fantini AC. 1996. Demografia de *Euterpe edulis* Martius (Areaceae) em uma Floresta Ombrófila Densa Montana, em Blumenau (SC). *Sellowia* 45-48: 13-45.
- Reis A, Reis MS, Fantini AC, Sgrott EZ. 1994. Curso: Manejo de Rendimento Sustentado de *Euterpe edulis*. Apostila curso (15 a 17 de fevereiro), Registro, 59p.
- Reis A. 1995. Dispersão de sementes de *Euterpe edulis* Martius (Palmae) em uma Floresta Ombrófila Densa Montana de encosta Atlântica em Blumenau – SC. Tese de Doutorado, Unicamp: Campinas-SP, p. 154.
- Reis MS & Reis A. 2000. *Euterpe edulis* Martius (Palmitreiro) Biologia, Conservação e Manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues.
- Reis MS, Fantini AC, Nodari RO, Reis A, Guerra MP, Mantovani A. 2000a. Management and Conservation of Natural Populations in Atlantic Rain Forest: The Case Study of Palm Heart (*Euterpe edulis* Martius). *Biotropica* 32: 894-902.
- Reis MS, Guerra MP, Nodari RO, Reis A, Ribeiro RJ. 2000b. Distribuição geográfica e situação atual das populações na área de ocorrência de *Euterpe edulis* Martius. *Sellowia* 49-52: 324-335.
- Reis MS, Guimarães E, Oliveira GP. 1993. Estudos preliminares da biologia reprodutiva do palmitreiro (*Euterpe edulis*) em mata residual do Estado de São Paulo. In 7º Congresso florestal brasileiro, Curitiba, 1993, p. 535–360. Anais, Brasil.
- Reis MS, Mariot A, Resende R, Guerra MP. 2000c. Legislação sobre o manejo e produção do palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius - Areaceae). In: Reis MS & Reis A. *Euterpe edulis* Martius (Palmitreiro) Biologia, Conservação e Manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 281-303.
- Reitz R, Klein RM, Reis A. 1988. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul, p. 525.
- Reitz R. 1974. Palmeiras. (Flora Ilustrada Catarinense-Palm). Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 189.
- Rodrigues AS & Durigan ME. 2007. O agronegócio do palmito no Brasil. Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR.
- Santos, JS. 2016. Efeitos da baixa densidade populacional em *Euterpe edulis* Mart.: uma perspectiva ecológico-genética da dispersão de pólen e sementes. Universidade Federal do Paraná. Tese de Doutorado.
- Selkoe KA & Toonen RJ. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.

Silva Matos DM & Watkinson AR. 1998. The fecundity, seed and seedling ecology of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae) in a fragment of semideciduous forest, Brazil. *Biotropica* 30: 595-603.

Streiff R, Ducouso A, Lexer C, Steinkellner H, Gloessl J, Kremer A. 1999. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology* 8: 831–841.

Tamaki I, Ishida K, Setsuko S, Tomaru N. 2009. Interpopulation variation in mating system and late-stage inbreeding depression in *Magnolia stellata*. *Molecular Ecology* 18: 2365–2374.

Young A, Boyle T, Brown T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Tree* 11: 413-418.

## 6 Cronograma de execução

### Objetivo I:

A padronização de um protocolo a partir de *DNA barcode* para as espécies de palmito ocorrerá em, no máximo, três meses após a coleta do material vegetal (extração, PCR, sequenciamento e análise das regiões gênicas). Para o primeiro semestre de 2017.

Após, as amostras apreendidas pelo IAP serão processadas em até cinco dias

### Objetivo II:

	2017		2018		2019	
	1º Sem	2º Sem	1º Sem	2º Sem	1º Sem	2º Sem
Delineamento amostral	x	x				
Coleta de material vegetal	x	x	x			
Análise microssatélites	x	x	x	x	x	
Ecologia de dispersão de sementes	x		x		x	
Ecologia de polinização		x	x		x	x
Análise dos dados	x	x	x	x	x	x

TERMO DE COMPROMISSO PARA DESENVOLVIMENTO  
DE PROJETO DE PESQUISA EM UNIDADES DE  
CONSERVAÇÃO DO PARANÁ

Eu, Valéria Cunha Muschner, RG: 6037263768 - SPS/RS, CPF: 930116360-87 responsável técnico pelo projeto *Projeto Palmito: Desenvolvimento de uma base de dados para a fiscalização e conservação de uma espécie-chave da Floresta Atlântica, no Estado do Paraná.*

1-Comprometo-me a entregar, no vencimento da autorização de pesquisa concedida pelo Instituto Ambiental do Paraná –IAP, relatórios parciais e finais, cópias de publicações em quaisquer períodos em que sejam realizadas, comunicações em todos os encontros com finalidade científica, citando sempre esta autorização.

2-Comprometo-me também, a encaminhar ao Instituto Ambiental do Paraná –IAP / DIBAP, sugestões/recomendações de manejo da Unidade, tendo por base os resultados desta pesquisa.

Em 23 de setembro de 2016.

*Valéria Cunha Muschner*

---

Assinatura do responsável técnico pelo projeto