

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GIULIANA GARCIA

**AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA DE DISPERSÃO DE
SEMENTES DE UMA ESPÉCIE DE PLANTA DA MATA
ATLÂNTICA: UMA COMPARAÇÃO ENTRE PRIMATAS
E AVES**



Rio Claro
2016

GIULIANA GARCIA

AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA DE DISPERSÃO DE SEMENTES DE UMA
ESPÉCIE DE PLANTA DA MATA ATLÂNTICA: UMA COMPARAÇÃO
ENTRE PRIMATAS E AVES

Orientadora: Laurence Marianne Vincianne Culot

Co-orientadora: Clarisse Palma da Silva

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
bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2016

582.0467 Garcia, Giuliana

G216a Avaliação da distância de dispersão de sementes de uma espécie de planta da Mata Atlântica : uma comparação entre primatas e aves / Giuliana Garcia. - Rio Claro, 2016
34 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Laurence Marianne Vincianne Culot
Coorientadora: Clarisse Palma da Silva

1. Sementes. 2. *Cryptocarya mandioccana*. 3. Estrutura genética espacial. 4. Genética molecular. 5. Ilha do Cardoso. I. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, mãe, pai e Gi por sempre apoiarem minhas escolhas, e dar suporte emocional e financeiro para que eu pudesse desenvolver atividades acadêmicas, sempre me incentivando a seguir meus sonhos.

À minha orientadora Laurence por todo apoio técnico, confiança, amizade e paciência para a realização deste trabalho. Este apoio foi fundamental para meu amadurecimento e desenvolvimento acadêmico.

Agradeço a minha co-orientadora Clarisse e ao pessoal do laboratório de Ecologia Molecular, os quais se dispuseram a auxiliar sempre que preciso. Em especial ao Sérgio Kakazu, por realizar o sequenciamento quando precisávamos, e a Carol (Carolina da Silva Carvalho) pelas dicas, por sempre encontrar uma solução e incentivar a seguir em frente quando tudo parecia dar errado. Agradeço à Thabata, minha companheira de sala e de projeto, por todo o apoio, pela amizade, e por sempre estar disposta a ajudar no que fosse preciso.

Agradeço a FAPESP pela bolsa de iniciação científica (processo 2014/20622-9) e pelo auxílio financeiro do CNPq (processo 456549/2014-5) para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, e a todos que de alguma forma participaram deste momento em minha vida, pela amizade e pelo incentivo apoiando meu desenvolvimento pessoal e profissional, muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas
Se não houver folhas, valeu a intenção da semente.”

Henfil

RESUMO

A dispersão de sementes atua mantendo o fluxo gênico entre os indivíduos das espécies de plantas, portanto, a atividade dos frugívoros dispersores determina parcialmente a distribuição espacial destas. A perda dos dispersores pode reduzir a distância a que estes dispersam, agregando as populações, o que pode reduzir o fluxo gênico e aumentar a probabilidade de desenvolver uma estrutura genética. Com isso a ocorrência de endocruzamento pode aumentar, debilitando as populações e expondo-as à possibilidade de uma extinção local. Neste projeto, foi estudada a estrutura genética espacial de adultos de uma espécie de árvore da Mata Atlântica, *Cryptocarya mandioccana* (Lauraceae), e a distância de dispersão das sementes pelos dois dispersores presentes no Parque Estadual Ilha do Cardoso (SP): o *Alouatta guariba* (Primates: Atelidae) e a *Aburria jacutinga* (Aves: Cracidae). A avaliação da distância de dispersão pode ajudar na caracterização do papel das espécies animais no fluxo gênico e na distribuição espacial das espécies de plantas, o que permite prever os possíveis efeitos de suas extinções locais. Determinamos a árvore-mãe das sementes defecadas comparando o genótipo de 106 árvores adultas de *C. mandioccana* com o tecido de origem materna de 81 sementes. Para isso, utilizamos 6 loci microssatélites específicos à *C. mandioccana* e a análise de parentesco para determinar a árvore de origem. Foram encontrados altos níveis de diversidade genética na população de adultos ($A=9,33$; $H_e=0,73$; $H_o=0,57$). As árvores adultas de *C. mandioccana* não mostraram na maioria das classes de distância estrutura genética espacial significativa. Também observamos uma alta variabilidade de genótipos entre as sementes, somente três destas dispersas por bugio e jacutinga corresponderam ao genótipo de adultos e, portanto, foi traçada a distância a que estas foram dispersas em relação a árvore-mãe. Através da análise dos genótipos das sementes encontradas nas fezes, estimamos o número aproximado de adultos que podem ter as originado. Notamos que as sementes contidas nas fezes de bugio possuíam uma diversidade de genótipos maior do que encontrada nas sementes de Jacutinga. Através deste trabalho pudemos concluir que os adultos possuem uma boa distribuição genética espacial. Em relação à dispersão de sementes, os primeiros resultados deste trabalho indicam provável distância longa de dispersão, no entanto devido ao pequeno número de árvores-mães encontradas não foi possível concluir sobre o papel dos dispersores. Este estudo ressalta a necessidade de ampliar o esforço de amostragem para se chegar a conclusões mais robustas.

Palavras-chave: Dispersão de sementes. Estrutura genética espacial. Genotipagem. *Cryptocarya mandioccana*. Ilha do Cardoso.

ABSTRACT

Seed dispersal helps maintaining gene flow between individuals of plants species, therefore, the activity of frugivorous dispersers partially determines the spatial distribution of plants. The loss of dispersers can reduce seed dispersal distances, aggregating the population, which can reduce gene flow and increase the likelihood of developing a genetic structure. Thus the occurrence of inbreeding can increase, weakening populations and exposing them to the possibility of local extinction. In this project we studied the fine-scale spatial genetic structure of adults of a rain forest tree species. *Cryptocarya mandioccana* (Lauraceae) and the seed dispersal distance by two dispersers of Ilha do Cardoso State Park: the *guariba* (Primates: Atelidae) and the *Aburria jacutinga* (Aves: Cracidae). The evaluation of seed dispersal distances can help characterizing the role of animal species in the gene flow and the spatial distribution of plant species, which allows predicting the possible effects of their local extinctions. The source tree of defecated seeds was determined comparing 106 adult tree genotypes of *C. mandioccana* with the genotype of 81 mother origin tissue of seeds. In order to perform this, we utilized 6 microsatellite loci specific for *C. mandioccana* and the kinship analyses to determine the source tree. We found high genetic diversity in adult population ($A=9,33$; $He=0,73$; $Ho= 0,57$). The adult trees of *C. mandioccana* didn't show, for major distance classes, significative fine-scale spatial genetic structure. We also observed a high variability of seeds genotypes, only three of them dispersed by howler monkey or Black-fronted Piping-Guan and therefore was calculated the distance between them and the maternal-tree. Throughout the genotype analyses of seeds found in fezes, we estimated the approximated number adults that could have possible originated them. We noticed that seeds dispersed by howler-monkeys have a higher diversity of genotypes than of dispersed by Crassid bird. Through this work, we could notice the adults have a good spatial genetic distribution. About dispersal seeds, the primary results presented here indicates probably long-distance dispersal, however related to the low number of source trees found it was not possible to conclude about the seed dispersal role. This study highlights the need to amplify the sampling effort to reach robust conclusions.

Key-words: Seed dispersal. Fine-scale space genetic structure. Genotype. *Cryptocarya mandioccana*. Ilha do Cardoso.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Espécie estudada.....	10
3.2.Área de estudo.....	11
3.3.Coleta das amostras.....	12
3.4 Análises das amostras.....	14
4. RESULTADOS.....	16
4.1 Caracterização genética dos adultos.....	17
4.2 Distância de dispersão.....	19
4.3 Variabilidade de genótipos por fezes.....	19
5. DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO.....	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
8. ANEXOS.....	32
8.1. Anexo A - Genótipos: teste da semente.....	32
8.2. Anexo B - Exemplo de prováveis sementes-irmãs.....	33
8.3. Anexo C - Adultos e sementes correspondentes.....	34

1. INTRODUÇÃO

A dispersão de sementes caracteriza um processo fundamental para a regeneração natural das florestas, permitindo, à semente, escapar da mortalidade ligada à densidade ou à distância. A dispersão permite, também, a colonização de habitat adequado à distância relativamente longa da planta mãe, possibilitando a manutenção do fluxo gênico entre indivíduos de uma mesma espécie. Este processo também possibilita à planta chegar a locais específicos caracterizados por uma probabilidade de estabelecimento desproporcionalmente alta, um processo chamado de dispersão dirigida (Howe e Smallwood, 1982).

O padrão espacial das espécies de plantas dispersas endozoocoricamente é determinado pelos frugívoros, uma vez que estes afetam a chuva de sementes através dos seus padrões de movimentos (Jordano, 2000). A chuva de sementes se caracteriza pela quantidade de propágulos recebidos numa área pelos eventos da dispersão (Vânia Regina *et al.*, 2006). Através da alimentação, os frugívoros podem realizar a dispersão retirando a polpa e jogando a semente abaixo da árvore da qual consumiram estes frutos, os cuspidando ou mesmo engolir a semente e a defecar longe de onde a retirou.

Estima-se que em torno de 50% a 90% das plantas dependem dos animais para a dispersão das suas sementes (Fleming, Breitwisch e Whitesides, 1987). Portanto, a regeneração das florestas depende intrinsecamente da atividade dos frugívoros dispersores de sementes (alimentação e movimentação) para manter seu equilíbrio demográfico e genético (Jordano e Godoy, 2002). Deste modo faz-se necessário compreender esta contribuição e os processos que envolvem a manutenção desta relação genética e espacial.

A comunidade de frugívoros vem sendo alterada por diversos fatores. O desmatamento, como o ocorrido na mata atlântica (Ribeiro *et al.*, 2009), por exemplo, gera efeitos em cascata sobre o equilíbrio das espécies animais, uma vez que gera profundas modificações no habitat, levando à extinção local de espécies vegetais e animais, e conseqüentemente alteração da cadeia trófica (Galetti *et al.*, 2013). Além da fragmentação do habitat, a caça é considerada um fator importante gerando defaunação de diversas áreas, principalmente em relação aos médios e grandes mamíferos (Cullen, Bodmer e Valladares Pádua, 2000). Conseqüentemente, a caça ilegal pode alterar a dinâmica da comunidade vegetal através da limitação da dispersão de sementes ou da alteração do padrão de dispersão, e resultar em mudanças na estrutura demográfica e genética vegetal (Jordano *et al.*, 2006).

A floresta atlântica era uma das maiores florestas das Américas, cobrindo originalmente cerca de 150 milhões de hectares, acompanhando a costa brasileira. Esta diversidade de ambientes ocupados, ou seja, a cobertura latitudinal permitiu o desenvolvimento de diferentes composições florestais, e conseqüentemente, o alto nível de endemismo deste ecossistema. Isto torna os estudos acerca das relações ecológicas deste ambiente importantes para a manutenção da floresta. Ao longo dos anos, houve um aumento na fragmentação devido ao desmatamento, este colocou várias espécies sob o risco de extinção ou de fato como extintas (Ribeiro et al., 2009), ameaçando diversas espécies como os dispersores de médio e grande porte (Bodmer e Valladares Pádua, 2000; Jordano *et al.*, 2006; Perez-Mendes, 2016)

Estes dispersores, os quais são capazes de dispersar as sementes de maiores dimensões além de geralmente a longa distância, são as espécies mais vulneráveis às alterações antrópicas (Cullen, Bodmer e Valladares Pádua, 2000; Jordano *et al.*, 2006, A perda destes frugívoros pode reduzir a distância de dispersão proporcionada por estes, agregando as populações, o que pode reduzir o fluxo gênico e aumentar a probabilidade de desenvolver uma estrutura genética e, portanto, aumentar as chances de endocruzamento. A um longo prazo, a perda de diversidade genética debilita as populações, sendo elas mais suscetíveis a uma possível extinção local (Hamrick, Murawski e Nason, 1993; Pacheco e Simonetti, 2000). Os estudos das relações espaciais que envolvem o processo ecológico em questão não são recentes, mas determinar a distância de dispersão em campo não é uma tarefa simples, pois acompanhar os frugívoros nem sempre é possível. Dispersores de médio e grande porte, por exemplo, possuem um maior tempo de digestão, então acompanhá-los para coletar as sementes defecadas se torna inviável. Em aves, devido à sua locomoção também não é possível acompanhá-las para recolher as sementes. Devido a estas dificuldades, as ferramentas da genética molecular tornaram-se extremamente importantes e com resultados mais precisos para se realizar a análise de parentesco e da distância de dispersão.

Uma técnica proposta por Godoy e Jordano (2001) tem trazido novas perspectivas em relação ao estudo da zoocoria. Esta técnica permite a identificação exata da origem da semente (planta mãe) através da extração de DNA do tecido da semente que é de origem exclusivamente maternal. A partir de técnicas moleculares pode-se comparar o genótipo da semente com o genótipo das árvores adultas da população utilizando-se microssatélites específicos para a espécie de interesse podendo-se determinar a árvore mãe que produziu aquela semente. Com a localização geográfica do local de dispersão da semente e da árvore mãe, é possível determinar a distância de dispersão e avaliar o papel da comunidade de dispersores naquela área.

Aplicamos este estudo à espécie *Cryptocarya mandioccana*, uma espécie de árvore da família Lauraceae, de até 35 m de altura, produzindo frutos com sementes relativamente grandes (até 3cm de comprimento) (de Moraes, 2007). Por tanto, *C. mandioccana* é suscetível aos efeitos da defaunação devido à sua dependência dos grandes mamíferos para dispersar suas sementes (De Moraes, 2007): duas espécies da megafauna do Brasil, o mono carvoeiro, *Brachyteles arachnoides* (Primates: Atelidae), e a anta, *Tapirus terrestris* (Perissodactyla, Tapiridae) (De Moraes, 2007; Bueno, 2010), classificados respectivamente como “em perigo” e “vulnerável” pela UICN. O bugio, *Alouatta guariba clamitans* (Primates: Atelidae), e a Jacutinga, *Aburria jacutinga* (Aves: Cracidae) também podem dispersar as sementes de *C. mandioccana* (L. Culot – dados não publicados; Bueno, 2010).

2. OBJETIVOS

Este trabalho buscou caracterizar a estrutura genética espacial da população de adultos a fim de compreender a diversidade genética destes na área de estudo.

Um segundo objetivo foi entender a contribuição de dois dispersores, o bugio e a jacutinga para o fluxo gênico de *C. mandioccana* numa área onde o miqui não está presente e a anta, já extinta. Buscamos, mais especificamente, determinar a distância de dispersão de sementes por estes dois dispersores, e o quanto estes influenciam a distribuição espacial desta espécie. Além disso, avaliamos a diversidade de genótipos para as sementes contidas nas fezes coletadas, estimando o possível número de adultos que as originaram.

Algumas hipóteses foram levantadas acerca dos objetivos:

Árvores adultas são resultantes de eventos de dispersão passados, e por isso podem refletir um momento onde outros dispersores estavam presentes no local. O Parque estadual Ilha do Cardoso continha, até o ano de 1962 (Bergallo et al 1998; Bernardo, 2004) a anta como dispersora de sementes, e sabe-se que estas consomem grande variedade de frutos e os dispersam a longas distâncias (Galetti, 2001). Portanto, as antas podem ter contribuído para o fluxo gênico e distribuição espacial dos adultos de *C. mandioccana*. Por isto, espera-se que os adultos não apresentem estrutura genética espacial significativa.

O bugio (*Alouatta guariba*) tem um tempo de digestão mais longo do que as aves em geral (Aguar, et al 2003), e por isso esperamos que este tempo permita uma maior distância de dispersão da potencial árvore mãe das sementes por eles ingeridas além de uma maior diversidade de genótipos de sementes por fezes devido a maior ingestão realizada por este. A Jacutinga (*Aburria jacutinga*) apresenta menor tempo de digestão (de Barros Leite et Al 2012), porem sua forma de locomoção sugere também a possibilidade de dispersão das sementes em uma distância considerável da possível planta-mãe. Esperamos encontrar uma menor diversidade de genótipos de sementes nas fezes de bugios do que nas fezes de jacutingas pelo fato de os bugios consumirem grandes quantidades de frutos por árvore.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécie estudada

A canela-nhutinga, *Cryptocarya mandioccana*, é uma espécie de árvore da mata atlântica pertencente à família Lauraceae (Figura 1A). Encontra-se principalmente nas florestas montanas e ombrófilas densas, submontanas entre 10 e 1180m de altitude. A floração ocorre aproximadamente entre Outubro e Dezembro e a frutificação em torno dos meses de maio e Agosto (De Moraes 2007).



Figura 1: A) Detalhe do tronco de *Cryptocarya mandioccana*. (Marcelo L. Brotto, 2009) B) Frutos imaturos de *C. mandioccana* (Marcelo L. Brotto, 2009) C) Detalhe do diásporo de *C. mandioccana* sem a polpa. D) Detalhe do diásporo em corte transversal, exteriormente o pericarpo, internamente a testa da semente e o endosperma.

O fruto da *C. mandioccana* é uma drupa amarela de 1.45-3.06 cm de comprimento e de 1.29-2.55 cm de largura (Figura 1B) contendo uma semente de 1.34-3.00 cm de comprimento e 1.16-1.92 cm de largura (De Moraes, 2007). A morfologia de seu fruto difere da morfologia dos frutos clássicos, pois a polpa é constituída pelo eixo floral acrescente enquanto a unidade de dispersão, o diásporo, é formado pela semente propriamente e pelo pericarpo. O pericarpo sendo um tecido de origem exclusivamente maternal e contendo o endocarpo, foi utilizado para a extração de DNA.

3.2 Área de estudo

O parque estadual *Ilha do Cardoso (PEIC)* está localizado no sul do estado de São Paulo, e é totalmente protegido (Figura 2). A ilha atinge uma altitude de 815 m, com restingas, florestas perenifólias de planície e floresta Montana úmida. Cerca de 75% de toda a ilha é coberta com florestas (11 100 ha), enquanto o restante é dividido em mangues, restingas e dunas (Melo & Mantovani 1994, Fundação Florestal 2012). O *PEIC* representa uma área contínua de mata atlântica, e por isso caracteriza um importante alvo de estudo das relações ecológicas desta floresta (Hortenci 2012) com um dos maiores níveis de endemismo do planeta (Ribeiro 2009).

Desde a criação do parque em 1962, dois grandes mamíferos foram extintos: a onça-pintada (*Panthera onça*) e a anta (*Tapirus terrestris*). O único primata na ilha é o bugio (*Alouatta guariba clamitans*) (Bernardo, 2004; Ingberman *et al.*, 2009) cuja contribuição na dispersão de sementes será analisada neste trabalho.

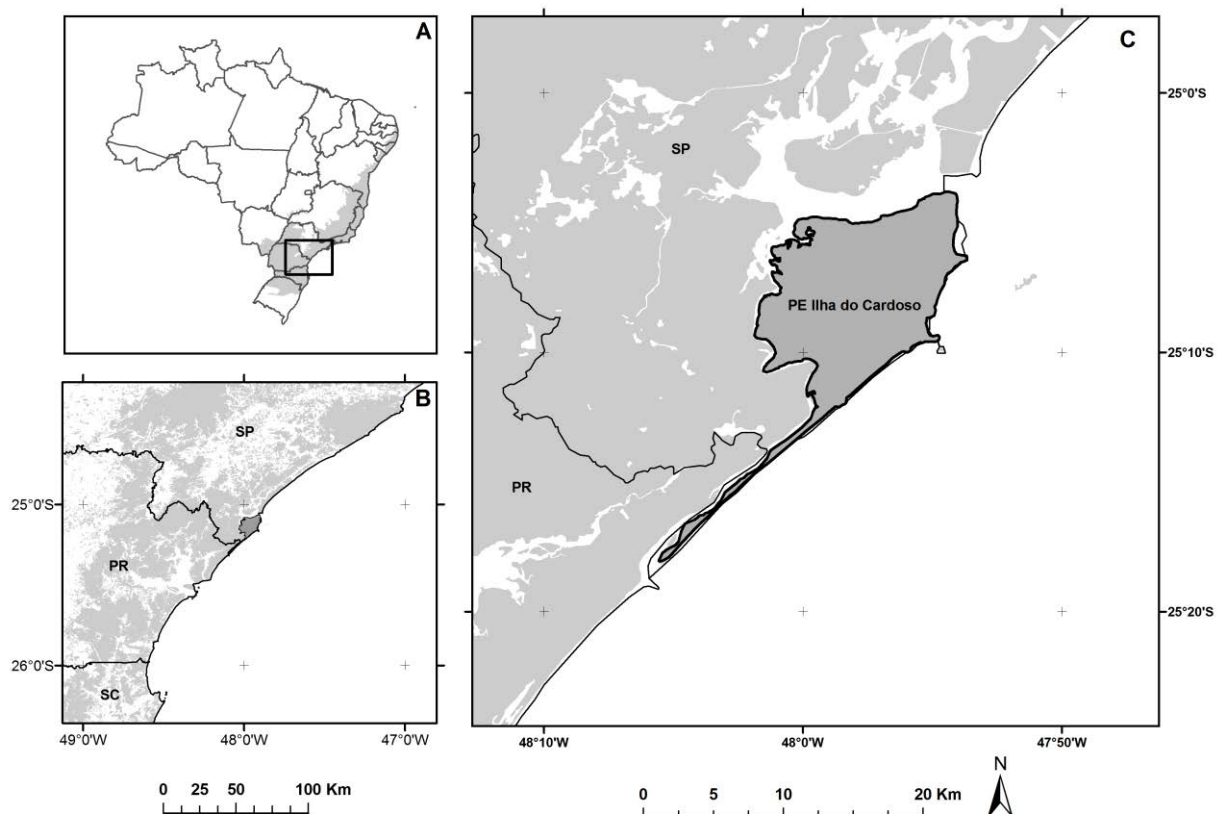


Figura 2: A) Mapa do Brasil com enfoque na região sudeste/sul onde se localiza o PEIC. B) Detalhe da localização do parque entre os estados de São Paulo e Paraná. C) Detalhe do PEIC demonstrando sua extensão. (Créditos: Bruno Defane e Rodrigo Bernardo)

3.3 Coleta das Amostras

Foram coletadas sementes (144) diretamente de fezes dos dois dispersores considerados; 77 sementes em 14 fezes de Jacutinga e 67 sementes em 5 fezes de Bugio, assim como folhas e/ou parte do tronco de indivíduos adultos (106) presentes na área de estudo entre os anos de 2011 e 2012.

As sementes dispersas por bugios foram coletadas durante o acompanhamento de dois grupos e também quando encontradas em campo. As sementes defecadas pelas Jacutingas foram coletadas sempre que encontradas. Nós coletamos as folhas de todas as árvores adultas de *C. mandioccana* que foram encontradas aleatoriamente no campo com frutos, assim como as árvores nas quais os bugios e as jacutingas foram vistos se alimentando (Figura 3).

O armazenamento das sementes foi feito em tubos falcon contendo solução saturada de NaCl enquanto as folhas foram armazenadas numa camara fria (após secas com sílica gel) à temperatura média de -15°C.

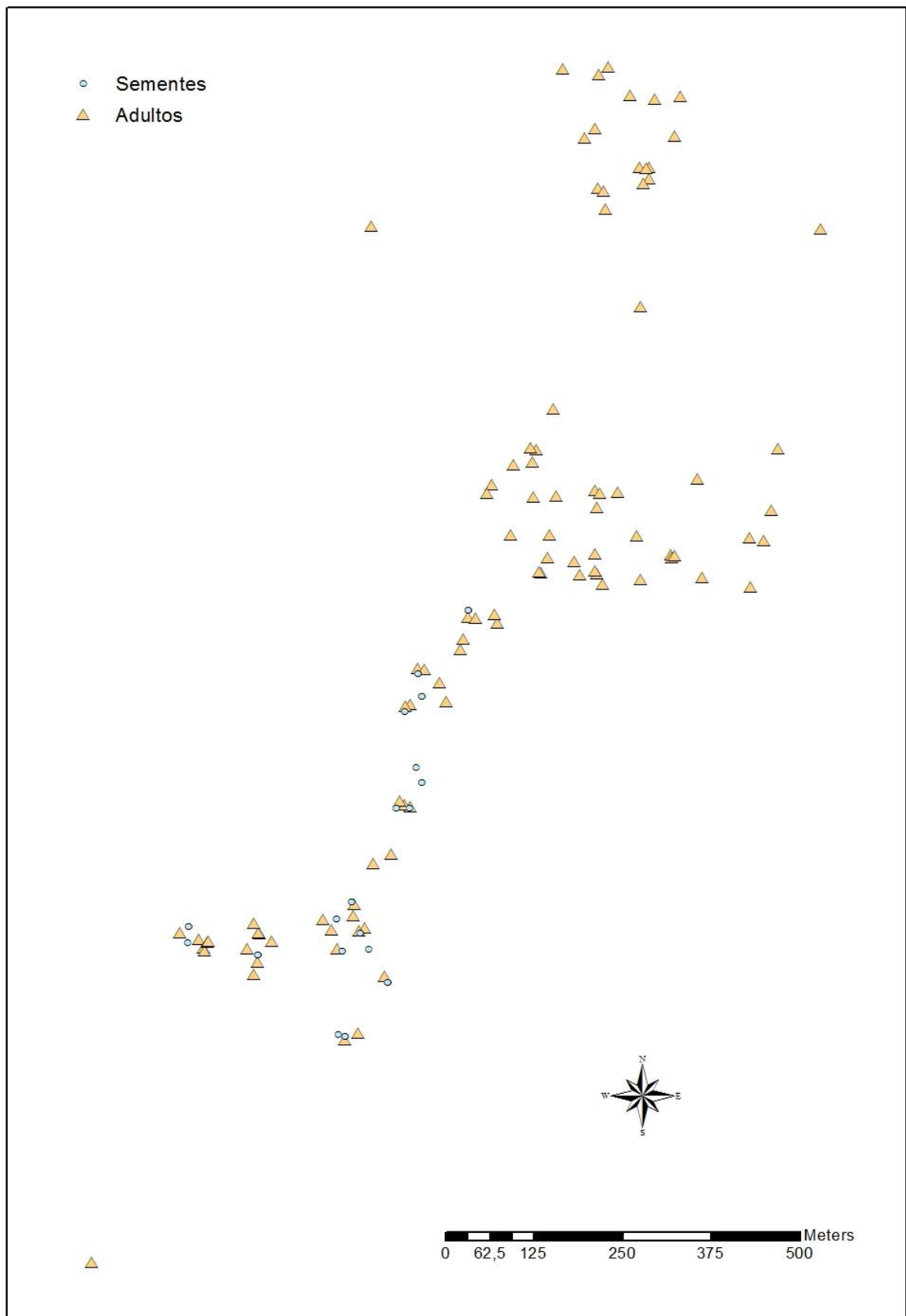


Figura 3: Distribuição dos indivíduos adultos e das sementes coletadas de *C. mandioccana*.

3.4 Análises das amostras

Identificação do tecido materno presente na semente

Em estudo anterior, determinamos qual tecido da semente continha material genético de origem materna. A espécie em estudo possui morfologia diferenciada: o fruto é classificado como nucóide, a polpa do fruto corresponde ao eixo floral acrescente, e o diásporo é formado pela semente e pelo pericarpo (De Moraes e Sartori, 1996). Foram testados dois tecidos do diásporo, o endocarpo (que já se esperava conter material genético exclusivamente materno) e um tecido marrom brilhante presente em torno da semente, a testa da semente. Obtivemos como resultado que ambos tecidos são de origem maternal (Anexo A) e, portanto poderiam ser usados para os estudos de distância de dispersão.

Extração de DNA e análises moleculares

Foram extraídos DNA de 81 sementes sendo que destas, 50 são de Jacutinga e 31 de bugio. A seleção das sementes foi feita escolhendo-se uma amostragem de pelo menos $\frac{3}{4}$ das sementes de cada fezes coletadas, com o objetivo de se ter uma maior variedade de genótipos entre os escolhidos. Também foi feita a extração dos tecidos de 106 indivíduos adultos seguindo o protocolo de extração de tecido vegetal Doyle & Doyle (1987). Após a extração, com a utilização de 6 microssatélites específicos (Tabela 1), estas amostras foram amplificadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de dois fluorescentes: NED e FAM.

Para esta reação foram utilizados 6 loci de microssatélites (tabela 1) desenvolvidos pela empresa inglesa “Genetic Marker Services”. Para a PCR, de volume final de 11 μ l, foram utilizadas as seguintes concentrações: 1-10 ng de DNA, 2 μ l de Nuclease-Free Water, 5 μ l de GoTaq® Colorless Master Mix, 2X (Promega), 8 pmol de Reverse primer, 2 pmol de forward primer, e 8pmol de florescente (FAM ou NED). O programa do termociclador apresentava: 1 ciclo de 4 min a 95°C, 35 ciclos a 94°C durante 30 sec, 42-58°C (padronizado para cada loco) durante 30 sec e 72°C durante 30 sec, 12 ciclos com 94°C durante 30 sec, 53°C durante 45 sec e 72°C durante 45 sec, e 10 min com 72°C que auxilia no anelamento da cauda M13. Em cada par de primers, um destes possui a cauda M13 segundo método descrito por Schuelke (2000). Após amplificação, estas amostras foram genotipadas pelo sequenciador ABI 3500 DNA Analyzer Sequencer (Applied Biosystems) utilizando o Liz 500 (Life Technologies) como marcador padrão.

As placas de genotipagem foram preparadas utilizando-se os dois fluorescentes (NED e FAM) simultaneamente. Os resultados da genotipagem foram analisados com o programa Genemarker versão 1.95.

Tabela 1: Loci de microssatélites de *Cryptocarya mandioccana*, utilizados na avaliação da distância de dispersão, incluindo nome do locus, padrão de repetição e tamanho do alelo clonado.

Locus	Repetição	Tamanho do alelo (Pb)
crm2	(CA) ₁₄	109
crm13	(TG) ₁₈	154
crm26	(AG) ₁₈	118
crm 59	(AC) ₁₁	100
crm15b	(GT) ₁₃ (GA) ₁₂	144
crm27b	(AC) ₁₂	153

A correspondência dos genótipos obtidos a partir da genotipagem dos adultos e do material de origem maternal das sementes foi analisada pelo programa R, com o pacote Allele Match (Galpern, P. et al 2012). As sementes e os adultos foram georeferenciados possibilitando a medida da distância de dispersão, as coordenadas foram correspondidas pela função dist do programa R. Sementes de uma mesma fezes com genótipos iguais para os loci testados foram consideradas sementes-irmãs.

Estrutura genética espacial dos adultos

A análise da estrutura genética espacial permite a observação de padrões de distribuição de indivíduos nas populações, o uso de marcadores genéticos permitem este estudo (Hamrick 2011).

Os erros de genotipagem devido a stuttering, dropout e também alelos nulos não identificados puderam ser verificados com o programa Micro-Checker (Oosterhout et al., 2004).

O programa GENEPOP 3.5 (Raymond & Rousset, 1995) foi usado para estimar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), o desequilíbrio de ligação e também o coeficiente de endogamia F_{is} (Weir e Cockerham, 1984) dentro das populações.

A variabilidade genética intrapopulacional foi descrita por alguns parâmetros utilizando os programas Fstat 1.2 (Goudet, 1995) e MSA (Dieringer e Schlötterer, 2003). Foi levada em conta a riqueza alélica (El Mousadik e Petit, 1996), o número de alelos por loco e por populações em relação ao número amostral de cada população, o tamanho variável dos alelos, a heterozigidade esperada (H_e) e observada (H_o).

A estrutura genética espacial dos adultos foi determinada via o programa SPAGeDi que usa dados de marcadores genéticos codominantes e estima a distância genética entre as populações assim como coeficientes relacionados entre indivíduos (Hardy 2002). Ele foi usado para encontrar a relação entre a similaridade genética e a distância geográfica de indivíduos (coeficiente de coancestria f_{ij}). Este coeficiente utiliza a frequência dos alelos nos locos para determinar a correlação entre os pares de indivíduos (Kalisz et al., 2001). Foi realizado também um teste de significância do padrão obtido através do “bootstrapping” com 1000 permutações. Com o objetivo de comparar a estrutura genética espacial com outras espécies, calculamos também a intensidade da estrutura genética com o método da estatística S_p proposto por Vekemans et al (2004).

4. RESULTADOS

Por meio do programa Micro-Checker, foram identificados possíveis erros de genotipagem. Foi identificado que os locos Crm27b, Crm15b, e Crm59 apresentaram excesso de homozigotos, o que pode ser devido a alelos nulos.

O sucesso das genotipagens variou bastante entre os locos principalmente se comparados adultos e sementes (tabela 2).

Tabela 2: Porcentagem de adultos e de sementes que tiveram sucesso na genotipagem, para todos os locos testados.

	Crm15b	Crm26	Crm59	Crm2	Crm13	Crm27b
Adultos	82,07%	95,28%	65,09%	95,28%	69,81%	85,84%
Sementes	32,09%	65,43%	14,81%	88,88%	46,81%	33,33%

O número de amostras de árvores e sementes, que tiveram sucesso na genotipagem também variou bastante entre todos os locos testados (figura 4).

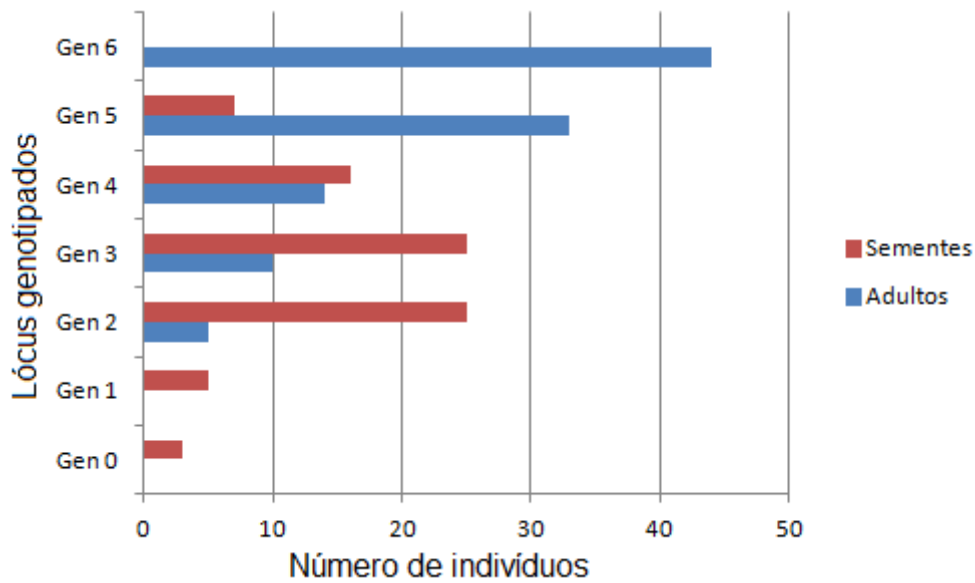


Figura 4: Total de indivíduos que tiveram sucesso na genotipagem para 0 a 6 locos testados.

4.1 Caracterização genética dos adultos

A população de adultos do Parque Estadual Ilha do Cardoso tem heterozigoidades esperadas (H_e) e observadas (H_o) variando respectivamente entre 0,623 a 0,845 e 0,373 a 0,812. A riqueza alélica (A_r) teve o menor valor, de 7,0 para o locus Crm59 e maior valor de 12,1 para o Locus Crm 15b. O coeficiente de endogamia para a população alcançou o valor de 0,218. (tabela 3). O tamanho dos alelos dos 6 locos genotipados variou de 108 a 189pb.

Tabela 3: Tamanho amostral (N); Número de alelos (A); Riqueza alélica (A_r); Heterozigoidade observada (H_o); Heterozigoidade esperada (H_e); Coeficiente de endogamia (Fis) e Tamanho mínimo e máximo dos alelos encontrados para cada locus.

Locus	N	A	A_r	H_o	H_e	Fis	Tamanho dos alelos
Crml5b	87	13	12.112	0,575	0,714	0.201*	152-184
Crml26	101	9	8.581	0,782	0,815	0.046	118-134
Crml59	69	7	7.000	0,435	0,626	0.312*	114-135
Crml2	101	11	10.860	0,812	0,845	0.044*	108-132
Crml13	75	8	7.988	0,373	0,770	0.520*	146-176
Crml27b	91	8	7.754	0,484	0,623	0.229*	168-189
Todos os Locos						0.218*	

*A população não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg para esses locos ($p < 0.05$).

Em relação às proporções esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, a população está em desequilíbrio para 5 locos entre os 6 testados, o que demonstra déficit de heterozigotos.

Teste de Desequilíbrio de Ligação

Analisando as amostras desta população observamos que o teste indica desequilíbrio de ligação entre os lócus Crm2 e Crm13 (P-value= 0,01348) (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de P gerados pelo teste de desequilíbrio de Ligação para cada par dos lócus testados.

	Crms 26	Crms 59	Crms 15b	Crms 27b	Crms 2	Crms 13
Crms 26		0,16531	0,15077	0,49256	0,7067	0,08767
Crms 59			0,52745	0,15934	0,1674	0,05
Crms 15b				0,26028	0,64685	0,8582
Crms 27b					0,2796	0,31534
Crms 2						0.01348*
Crms 13						

P < 0,05 indica desequilíbrio de ligação.

Os coeficientes de coancestria (F_{ij}) indicam estrutura espacial significativa para a distância de 70 metros, neste caso a diferença é mínima para os pontos. Em sua quase totalidade não houve a presença de estrutura genética espacial significativa (figura 5).

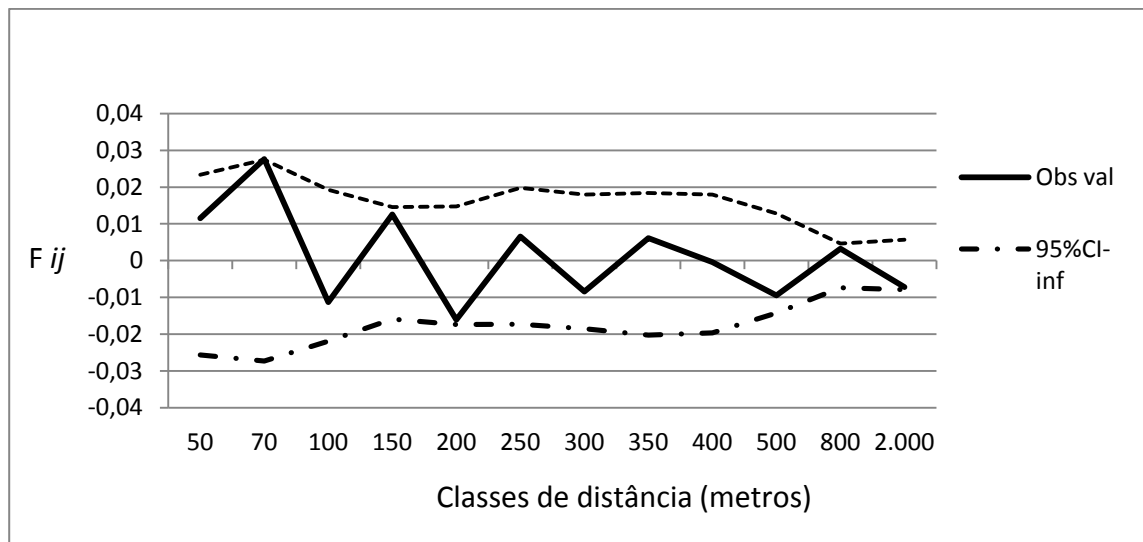


Figura 5: Correlograma do coeficiente de coancestria para diferentes classes de distância. Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

4.2 Distância de dispersão

Para os locos de microssatélites testados, três sementes tiveram seus genótipos correspondentes aos dos adultos em pelo menos dois locos (anexo C) e, portanto possivelmente tem estes adultos como árvore de origem (tabela 5). Houve uma alta variabilidade nos locos para adultos e para sementes além de uma diferente taxa de funcionamento na amplificação para estes (tabela 2 e figura 4).

Tabela 5: Sementes, animal que realizou sua dispersão, possível árvore mãe correspondida por genótipos, e a distância de dispersão em metros.

	Dispersores	Possível árvore-mãe	Distância (metros)
S75	Jacutinga	Ic 10	45,35
S32	Jacutinga	Ic 13	289,04
S106	Bugio	Ic 93	811,59

A semente S75 foi dispersa pela Jacutinga, a 45,35 metros de distância do adulto IC10. A semente foi genotipada para 5 locos, e justamente estes corresponderam aos genótipos do tecido do adulto. A semente S32, também dispersa pela jacutinga, foi genotipada para dois locos, e estes dois corresponderam dois locos genotipados do adulto Ic13, colocando este como possível árvore-mãe. A distância desta dispersão foi de 289,04m. A semente S106 dispersa pelo bugio apresentou uma distância de 811,59 metros do adulto IC93. Para esta semente dois locos foram genotipados, e estes dois corresponderam a dois dos genótipos do adulto em questão (Anexo 3).

4.3 Variabilidade de genótipos por fezes

As sementes dispuseram uma grande variabilidade de genótipos. As fezes de bugio contem em média mais sementes do que as de jacutinga e estas sementes, em média, vêm de um número maior de árvores-mães. O número de adultos estimado para as fezes de bugio é maior do que o número relacionado para Jacutingas (6/ 2,5) (tabela 6),

Não encontramos nenhuma semente aparentada nas fezes de bugio, diferentemente do encontrado para as sementes nas fezes de jacutingas (anexo B). A proporção de árvores mães

em relação ao número de sementes genotipadas mostra valores parecidos entre bugios e jacutingas (1/0,9).

Valores abaixo de 1 indicam sementes possivelmente vindo de uma mesma árvore-mãe enquanto que valores iguais a 1 indicam que todas as sementes vêm de árvores mães diferentes. Isto ocorreu para três fezes de Jacutingas, do total de 14 amostradas para estas (tabela 6).

Tabela 6: Identificação das fezes; dispersores correspondentes; total sem: total de sementes coletadas em cada fezes; Sem gen: Sementes que foram genotipadas do total; adult id: estimativa de quantos adultos podem ter originado as sementes genotipadas das; adult id/ sem gen número estimado de adultos em razão ao número de sementes genotipadas.

ID Fezes	Dispersor	Total sem	Sem gen	Adult id	Adult id/ sem gen
C1	Jacutinga	4	2	2	1
C2	Jacutinga	5	2	2	1
C3	Jacutinga	3	3	3	1
C4	Jacutinga	7	5	2	0,4*
C5	Jacutinga	19	16	8	0,5*
C6	Jacutinga	3	2	2	1
C8	Jacutinga	7	2	2	1
C9	Jacutinga	12	5	4	0,8*
C11	Jacutinga	5	4	4	1
C13	Jacutinga	3	2	2	1
C16	Jacutinga	3	1	1	1
C47	Jacutinga	1	1	1	1
C48	Jacutinga	1	1	1	1
Cj49	Jacutinga	4	1	1	1
CB7	Bugio	25	15	15	1
CB10	Bugio	1	1	1	1
CB12	Bugio	22	12	12	1
Cb14	Bugio	18	3	3	1
Cb15	Bugio	1	1	1	1
	Média Jacutinga	5,5	3,35	2,5	0,9
	Média Bugio	13,4	6,4	6,0	1

5. DISCUSSÃO

Estrutura genética espacial dos adultos

A estrutura genética espacial dos adultos pode refletir um contexto de dispersão de sementes diferente do atual, representando um momento do PEIC onde existiam outros dispersores. Portanto é importante buscar entender como estão distribuídos geneticamente os adultos da espécie em questão.

Identificamos excesso de homozigotos para os locos Crm13, 27b e 15b, o que pode indicar a presença de alelos nulos. Este resultado também pode ser reflexo do desequilíbrio da população em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em relação ao equilíbrio de ligação, apenas um dos locos apresentou valor abaixo de 0,05, indicando que possivelmente não se segrega independentemente.

O coeficiente de endogamia varia de 0 a 1, onde 1 representa 100% de endogamia. A população analisada apresentou coeficiente de endogamia de 0,218. Este valor é significativo em relação ao 0. Isto indica um número excessivo de homozigotos na população, pensando-se a longo prazo este resultado pode ser decorrente da redução da variação genética e reflexo de um processo de endogamia (Kageyama, P, Y 1981). Além disso, a presença de alelos nulos como verificados para três locos também podem influenciar no excesso de homozigotos.

Os coeficientes de coancestria (F_{ij}) testados para cada classe de distância, não trouxeram, em sua quase totalidade, estrutura genética espacial significativa, com exceção apenas da classe 70 metros, mas o valor de diferença é mínimo.

A não presença de uma estrutura genética pode indicar que os dispersores presentes na época da dispersão destes indivíduos permitiram um bom fluxo gênico. Sendo a *C. mandioccana* uma árvore de crescimento lento e de longa vida, é provável que as árvores adultas de hoje foram dispersas por um conjunto mais completo de dispersores: jacutinga, bugio, mas também a anta, presente no parque até 1962 (Bergallo et al 1998; Bernardo, 2004). Isto pode ter influenciado diretamente na boa distribuição pela área amostrada.

O valor de S_p obtido em nosso estudo, representando a intensidade de estrutura genética espacial encontrada, foi de 0,0034. Este dado aproximou-se dos valores obtidos de estatísticas S_p na literatura para sementes dispersas por animais (Vikemans2004).

Distância de dispersão

O tecido materno presente nas sementes de *C. mandioccana*, contido no diásporo que foi defecado pelos 2 frugívoros dispersores, possibilitou a identificação de poucas árvores-mães através da comparação de genótipos com os indivíduos adultos amostrados do Parque estadual Ilha do Cardoso.

Foi possível determinar a árvore-mãe de apenas três sementes amostradas. Destas três sementes somente uma tem resultado confiável pelo número de locos genotipados (5), as outras duas sementes em questão tem resultado menos confiável pois foram genotipadas em dois locos apenas. No entanto, devido a alta variabilidade de genótipos encontrados, corresponder em dois locos já representa um possível resultado.

Alguns fatores podem ter influenciado o baixo número de árvores mães identificadas. O sucesso das genotipagens, principalmente em relação às sementes se mostrou pouco eficiente, possíveis erros de genotipagem, por exemplo, podem ocasionar este baixo nível de adultos correspondidos.

A taxa de sucesso das genotipagens das sementes amostradas foi relativamente baixa, com apenas dois dos loci (Crm2 e Crm13) funcionando em taxa superior a 50%. Foram feitas duas extrações para o mesmo material das sementes, sendo que a segunda extração abrangeu 38 sementes que ainda tinham material disponível para o processo. A extração foi repetida a fim de testar se o problema havia sido com a qualidade do DNA uma vez que para algumas PCRs, a amplificação obtida foi pouco eficaz. Com o novo DNA, a amplificação foi pouco melhor, mas não trouxe resultados significativos no sucesso da genotipagem.

Os problemas na amplificação do DNA podem se dever a inibidores de PCR (BOER et al., 1995). Estudos fitoquímicos mostraram que *C. mandioccana* contem uma alta taxa de alcalóides (Cavalheiro AJ, et al., 2000) o que pode ter interferido de certa forma no sucesso da amplificação, principalmente das sementes. Este fato indica que seria interessante a otimização do processo de PCR e genotipagens para as sementes, de forma que os loci sejam amplificados numa taxa próxima à encontrada para os adultos onde a taxa de sucesso na genotipagem ultrapassou os 50%.

Outro aspecto que pode ser levado em consideração, pelo baixo número de sementes que tiveram a árvore-mãe rastreada, é a amostragem na região considerada. Foram coletadas folhas de árvores adultas em frutificação sempre que encontradas no campo e particularmente na proximidade dos locais de defecação, além de folhas das árvores onde os bugios estavam se alimentando. Embora a amostragem tenha feito uma boa seleção de adultos na área, é possível que algumas árvores não tenham sido documentadas, devido às dimensões do local escolhido para análise e a dificuldade de acesso, além de se levar em conta o tempo longo de digestão dos bugios.

Sabe-se que o bugio (*Alouatta guariba*), tem um tempo de digestão mais longo do que as aves em geral (~20 horas) e embora possuam uma área de vida considerada pequena (Aguiar, et al 2003), seu tempo de digestão permitiria uma maior distância da potencial árvore-mãe das sementes por eles ingeridas. Para os grupos de bugios acompanhados, por exemplo, os indivíduos poderiam ter se alimentado em árvores no dia anterior, por exemplo, enquanto não estavam sendo acompanhados, e defecarem sementes referentes a estas outras árvores. Em relação à Jacutinga (*Aburria jacutinga*), esta apresenta menor tempo de digestão (~1 hora) (de Barros Leite et Al 2012) e também passa um período sobre a copa das árvores das quais

consomem os frutos, porém sua forma de locomoção indica também uma possível dispersão das sementes para uma área maior.

Embora as árvores de *Cryptocarya* com frutos tenham sido amostradas perto e longe dos locais de defecação, alcançando às vezes mais de 100 metros destes, não foram encontradas as árvores-mães destas sementes (Figura 2).

Uma nova estratégia de coleta poderia ser tomada, traçando um raio de 100 metros em torno do local das fezes e neste raio, realizar uma busca acerca de adultos de *Cryptocarya* não amostrados na primeira coleta. Este novo método permitiria afirmar que as sementes ali depositadas foram dispersas a mais de 100 metros, justamente por não possuírem correspondência genética com nenhum adulto neste raio de deposição pelos frugívoros.

Não há certeza de que todas as árvores adultas de *Cryptocarya* tenham sido amostradas num raio de 100 metros de cada defecação e, por isso, não podemos afirmar que as sementes em questão tenham sido dispersas a uma longa distância por seus dispersores.

A metodologia deste trabalho foi escolhida inicialmente pela dificuldade em se andar na área determinada, por ser um local de mata fechada e terreno acidentado. Pela falta de sucesso na identificação da árvore-mãe, a estratégia de determinar-se uma coleta de árvores previamente amostradas de adultos num raio de 100 metros poderia trazer resultados a cerca da dispersão das sementes desta espécie de planta e sobre a contribuição dos dispersores.

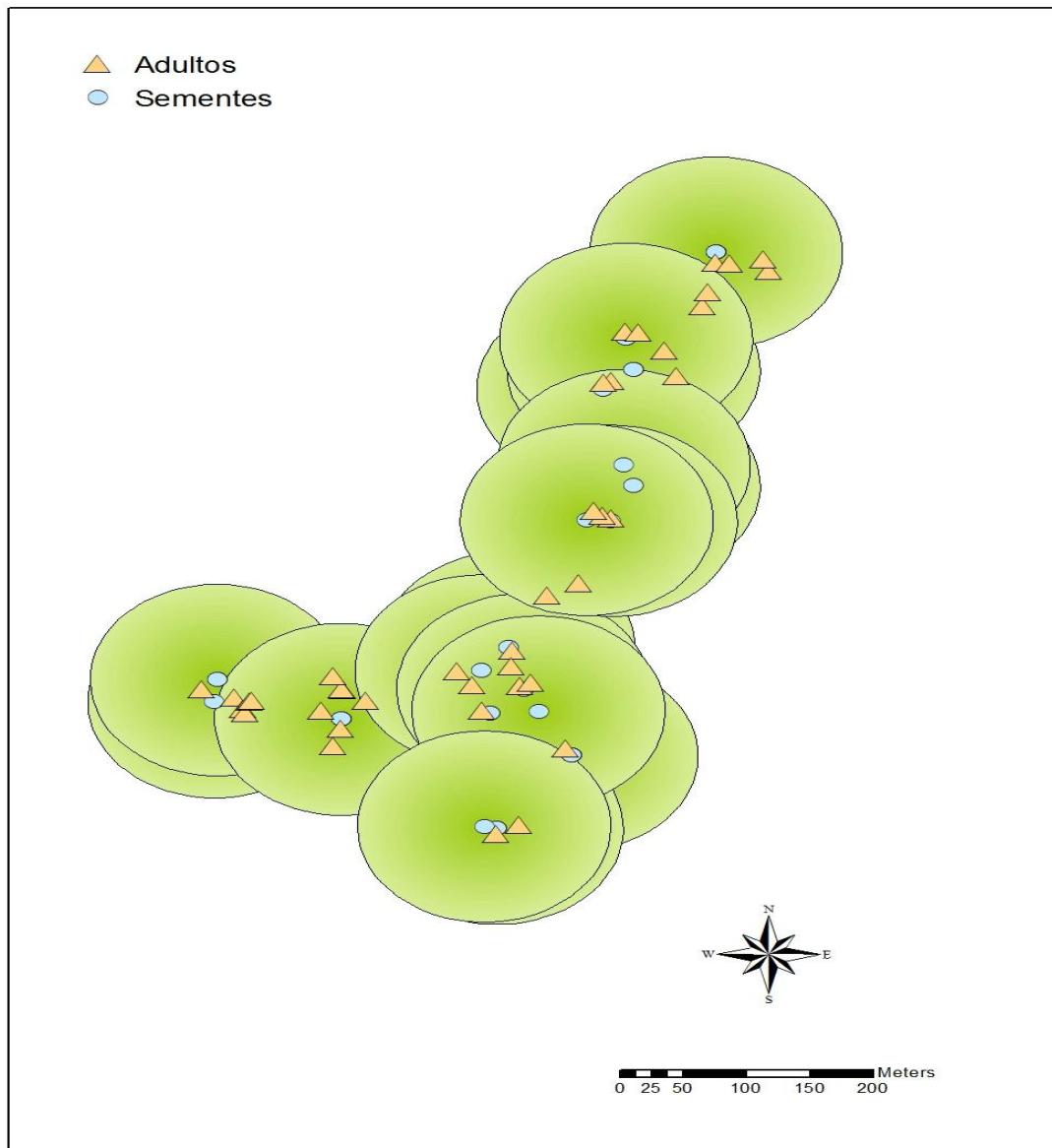


Figura 2: Distribuição dos adultos e sementes coletados previamente. Cada semente possui um raio de 100 metros em torno de si (verde), onde se poderia encontrar alguns adultos não amostrados na primeira coleta.

Variabilidade de genótipos por fezes

Notamos uma maior diversidade de genótipos nas fezes de bugio, onde não foram encontradas sementes geneticamente aparentadas. Este padrão pode representar a atividade de forrageamento do bugio, em grupo e, portanto um maior número de sementes por fezes e de diversidade de genótipos (Fortes, 2008) diferente da Jacutinga que possui habito de forrageamento solitário.

O bugio consome frutos e folhas em grande quantidade, podendo buscar recursos em diferentes árvores, e como sua digestão é de aproximadamente 20 horas em geral (Aguiar, et al 2003), permite que este alimente-se de diversos frutos, o que poderia explicar a diversidade de genótipos nas fezes. No entanto, o número de sementes coletadas em campo, mostra uma concentração de sementes de bugio por fezes. Este padrão de defecação, agregado de sementes, pode ser negativo para o recrutamento das plântulas já que gera uma maior competição por recursos.

As jacutingas apresentaram um padrão diferenciado, foi encontrado um maior número de fezes desta, e raramente continham muitas sementes. Isto pode ser também reflexo de seu comportamento alimentar, pois seu tempo de digestão varia em torno de 1 hora.

Esta análise permite também avaliar como os dispersores estão contribuindo indiretamente para a distribuição espacial destas sementes.

6. CONCLUSÃO

Com este trabalho observamos, em relação à estrutura genética espacial, observamos que os adultos estão relativamente bem distribuídos em relação ao ambiente, resultando na quase total ausência de estrutura genética. O estabelecimento dos adultos ocorreu provavelmente no PEIC na presença de mais dispersores do que os encontrados na atualidade, o que faz com que perspectivas futuras em relação à estrutura genética espacial das plântulas possam demonstrar quanto essa mudança nos dispersores pode ter influenciado na distribuição genética espacial.

Notamos também uma significativa variabilidade entre os genótipos dos adultos e das sementes para a espécie *Cryptocarya mandioccana*. A partir dos primeiros resultados deste trabalho pudemos concluir que existe uma provável longa distância de dispersão das sementes, já que apenas três sementes puderam ter os adultos rastreados. No entanto para que esta afirmação pudesse ser feita, há a necessidade de ampliar o esforço de amostragem, podendo-se então concluir sobre a contribuição real de cada dispersor na área de estudo.

Uma perspectiva interessante a se abordar seria coletar os possíveis indivíduos adultos que não foram coletados previamente em torno de todas as fezes num raio de pelo menos 100 metros, o que permitira afirmar, com certeza, se os dispersores a contribuíram para uma distância de dispersão relativamente alta da planta-mãe.

Com os genótipos das sementes pode-se avaliar a variabilidade destes por fezes e consequentemente o possível parentesco entre elas. Esta estimativa, embora não inclua a

distância de dispersão, permitiu avaliar o grau de diversidade de genótipos contido em cada fezes em relação a cada dispersor. A jacutinga apresentou fezes com sementes aparentadas, contrariamente aos bugios, no entanto a média de adultos possíveis por sementes genotipadas não variou muito. Este trabalho demonstrou a necessidade de uma maior investigação de amostragem para se ter um resultado robusto a cerca do papel dos dispersores para esta espécie de planta, possibilitando estudos futuros sobre a espécie.

7. Referências Bibliográficas

BERNARDO, CSS; **Abundância, densidade e tamanho populacional de aves e mamíferos cinegéticos no Parque Estadual Ilha do Cardoso, SP, Brasil.** 2004. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo (USP) Piracicaba.

BERGALLO, H. G., VERA Y CONDE, C. F., BITTENCOURT, E. B., BOSSI, D. E. P. and ROCHA, C. F. D. As similaridades nos parâmetros comunitários de pequenos mamíferos de duas áreas de Mata Atlântica do sul de São Paulo, sudeste do Brasil. **Anais do VIII Seminário Regional de Ecologia**, Vol VIII, pp. 939-949, 1998

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**, 1995.

BUENO, R. **Frugivoria e efetividade de dispersão de sementes dos últimos grandes frugívoros da Mata Atlântica: a anta (*Tapirus terrestris*) e o muriqui (*Brachyteles arachnoides*).** 2010. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP) Rio Claro.

CAVALHEIRO, Alberto José; YOSHIDA, Massayoshi. 6-[ω -arylalkenyl]-5, 6-dihydro- α -pyrones from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). **Phytochemistry**, v. 53, n. 7, p. 811-819, 2000.

CULLEN, L; BODMER, R. E.; VALLADARES PÁDUA, C. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. **Biological Conservation**, v. 95, n. 1, p. 49-56, 2000.

DE BARROS LEITE, A., BRANCALION, P. H. S., GUEVARA, R. & GALETTI, M. Differential seed germination of a keystone palm (*Euterpe edulis*) dispersed by avian frugivores. **Journal of Tropical Ecology**, 28(06):615-618, 2012.

DE MORAES, P. L. R. Taxonomy of *Cryptocarya* species of Brazil. **Abc Taxa Series**, v. 1, 2007.

DE MORAES, P. L. R.; SARTORI, A. A. Morfologia de frutos e sementes de *Cryptocarya moschata* Nees & Martius ex Nees, *Endlicheria paniculata* (Sprengel) MacBride e *Ocotea*

catharinensis Mez (LAURACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, n. 1, p. 17-27, 1996.

DE MORAES AGUIAR, Lucas et al. Dieta, área de vida, vocalizações e estimativas populacionais de *Alouatta guariba* em um remanescente florestal no Norte do estado do Paraná. **Neotropical**, v. 11, n. 2, p. 78, 2003.

DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C, Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets, **Molecular Ecology Notes**, v, 3, n, 1, p, 167-169, 2003

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 1987.

EL MOUSADIK, A.; PETIT, R, High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco, **Theoretical and Applied Genetics**, v, 92, n, 7, p, 832-839, 1996

FORTES, VANESSA BARBISAN. Ecologia e comportamento do bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940) em fragmentos florestais na Depressão Central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Neotropical primates**, 2008.

FLEMING, T. H.; BREITWISCH, R.; WHITESIDES, G. H. Patterns of Tropical Vertebrate Frugivore Diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 91-109, 1987.

GALETTI, Mauro et al. Frugivory and Seed Dispersal by the Lowland Tapir (*Tapirus terrestris*) in Southeast Brazil. **Biotropica**, v. 33, n. 4, p. 723-726, 2001.

GALETTI, M. et al. Functional extinction of birds drives rapid evolutionary changes in seed size. **Science**, v.340, n 6136, p. 1086-1090, 2013.

GALPERN P, MANSEAU M, HETTINGA P, SMITH K, and WILSON P. allelematch: an R package for identifying unique multilocus genotypes where genotyping error and missing data may be present. **Molecular Ecology Resources**. 12:771-778, 2012.

GODOY, J. A.; JORDANO, P. Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 9, p. 2275-2283, 2001.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics.

Journal of Heredity - Am Genetic Assoc, 1995.

HARDY, O. J. & VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, 2002.

HAMRICK, J.; MURAWSKI, D.; NASON, J. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 281-297, 1993.

HORTENCI, Luana. **Defaunação e efeitos-cascata sobre a diversidade vegetal em uma ilha semi-defaunada na Floresta Atlântica**. 2012. Dissertação (mestrado).

HOWE, H. F.; SMALLWOOD, J., J. Ecology of Seed Dispersal. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, p. 201-228, 1982.

INGBERMAN B, FUSCO-COSTA R, de ARAUJO MONTEIRO-FILHO EL. Population survey and demographic features of a Coastal Island population of *Alouatta clamitans* in Atlantic Forest, southeastern Brazil. **International Journal of Primatology**, 2009.

JORDANO, P. et al. Ligando frugivoria e dispersão de sementes à biologia da conservação. **Biologia da conservação: essências**. Editorial Rima, São Paulo, Brasil, p. 411-436, 2006.

JORDANO, P.; GODOY, J. A. Frugivore- generated seed shadows: a landscape view of demographic and genetic effects. In Levey, D., Silva, W. & Galetti, M. (eds.). Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution, and conservation. **CAB International**, Wallingford, p. 305-321, 2002.

JORDANO, P. Fruits and frugivory. In Fenner, M. Seeds: the ecology of regeneration in plant communities. **CAB International**, Wallingford, Pp. 125-165, 2000.

PACHECO, L. F.; SIMONETTI, J. A. Genetic Structure of a Mimosoid Tree Deprived of Its Seed Disperser, the Spider Monkey. **Conservation Biology**, v14, n.6, p 1766-1775, 2000.

KAGEYAMA, PAULO YOSHIO. **Endogamia em espécies florestais**. IPEF, 1981.

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.

MELO, M.R.F. & MANTOVANI, W. 1994. Composição florística e estrutura fitossociológica da mata atlântica de encosta na Ilha do Cardoso (Cananéia, Brasil). *Bol. Inst. Bot.* 9:107-158

MERCADO, J.A.; MANSOURI, I.; JIMÉNEZ-BERMUDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.A. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**,v.35, n.2, p.152-153, 1999.

OOSTERHOUT, C. V., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P. M. & SHIPLEY, P. Microchecker: 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**, Boston, MA, USA, v. 14, n. 6, p. 1766-1775, 2000.

PÉREZ-MÉNDEZ, Néstor et al. The signatures of Anthropocene defaunation: cascading effects of the seed dispersal collapse. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F, GENEPOP (version 1,2): population genetics software for exact tests and ecumenicism, **Journal of heredity**, v, 86, n, 3, p, 248-249, 1995, ISSN 0022-1503,

RIBEIRO, Milton Cezar et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation.**Biological conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE (SMA). **Plano de Manejo das unidades de Conservação –Parque Estadual Ilha do Cardoso. Plano de Gestão Ambiental**, fase 1. 1998.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nat Biotech**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

VÂNIA REGINA, P. et al. Chuva de sementes em fragmentos de Floresta Atlântica (São Paulo, SP, Brasil), sob diferentes situações de conectividade, estrutura florestal e proximidade da borda. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 845, 2006.

VEKEMANS, Xavier; HARDY, Olivier J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 921-935, 2004.

8. ANEXOS

Anexo A - Genótipos: teste da semente.

Genótipos de adultos (SM), endocarpo (n), e testa da semente (nT), onde n= número estabelecido para amostra, para 5 loci diferentes: Crm21, Crm59, Crm 26, Crm 3 e Crm 15b.

Crm 21		Crm59			Crm26			Crm3		Crm15b			
Amostras													
SM53	170	172	SM53	NA		SM53	122	132	SM53	165		SM53	NA
1	170	172	1	120	124	1	NA		1	165		1	162
1T	170	172	1T	120	124	1T	NA		1T	165	176	1T	162
3	170	172	3	120	124	3	122	132	3	165		3	162
3T	170	172	3T	120	124	3T	122	132	3T	165		3T	162
4	NA	NA	4	NA		4	122	132	4	NA		4	162
4T	NA	NA	4T	NA		4T	NA		4T	NA		4T	162
SM33	172	180	SM33	118	120	SM33	126		SM33	186	188	SM33	154
5	NA		5	118	120	5	126		5	186	188	5	162
5T	172		5T	118	120	5T	126		5T	186	188	5T	162
7	172	180	7	NA		7	126	122	7	186	188	7	162
7T	172		7T	NA		7T	126		7T	NA		7T	162
8	172		8	NA		8	126	122	8	186	188	8	162
8T	172		8T	NA		8T	126		8T	NA		8T	162
SM6	NA		SM6	NA		SM6	124	130	SM6	164	166	SM6	162
15	174	176	15	120	122	15	124	130	15	164	166	15	NA
15T	174	176	15T	120	122	15T	124	130	15T	164	166	15T	NA
11	174	176	11	120	122	11	NA		11	164	166	11	162
11T	174	176	11T	120	122	11T	NA		11T	164	166	11T	162
13	174	176	13	120	122	13	NA		13	164	166	13	NA
13T	174	176	13T	120	122	13T	NA		13T	164	166	13T	NA
SM10	174	180	SM10	120	122	SM10	128	130	SM10	NA		SM10	NA
17	174	180	17	120	122	17	128	130	17	NA		17	NA
17T	NA		17T	120	122	17T	128	130	17T	NA		17T	NA
19	174	180	19	NA		19	124	128	19	164	166	19	NA
19T	NA		19T	NA		19T	124	128	19T	164	166	19T	NA
20	174	180	20	NA		20	124	128	20	NA		20	NA
20T	174	180	20T	NA		20T	124	128	20T	NA		20T	NA
SM12	NA		SM12	NA		SM12	124	130	SM12	164	174	SM12	NA
25	172		25	120	122	25	124	130	25		174	25	170
25T	NA		25T	NA		25T	124	130	25T	NA		25T	NA
26	172	176	26	NA		26	124	130	26	NA		26	178
26T	172	176	26T	NA		26T	124	130	26T	NA		26T	NA
27		176	27	120		27	NA		27	NA		27	NA
27T	172	176	27T	120		27T	124	130	27T	NA		27T	NA
SM 82	NA		SM 82	NA		SM 82	NA		SM 82	176	188	SM 82	NA
30	NA		30	122		30	122	128	30	176	188	30	NA
30T	NA		30T	NA		30T	122	128	30T	176	188	30T	NA
31	168	172	31	122		31	122	128	31	176	188	31	NA
31T	168	172	31T	122		31T	122	128	31T		188	31T	NA
32	NA		32	NA		32	122	128	32	NA		32	NA
32T	NA		32T	122		32T	122	128	32T	176	188	32T	NA
SM 79	NA		SM 79	NA		SM 79	124	128	SM 79	NA		SM 79	NA
37	170	176	37	118	120	37	124	128	37	NA		37	NA
37T	170	176	37T	118	120	37T	124	128	37T	NA		37T	NA
35	170	176	35	118	120	35	124	128	35	NA		35	154
35T	170	176	35T	118	120	35T	124	128	35T	NA		35T	162
38	170	176	38	118	120	38	124	128	38	170	188	38	154
38T	170	176	38T	118	120	38T	124	128	38T		188	38T	162
SM 36	154	184	SM 36	120	122	SM 36	122	128	SM 36	170	188	SM 36	158
43	154	184	43	120	122	43	122	128	43	170	188	43	182
43T	154	184	43T	120	122	43T	122	128	43T	170	188	43T	182
40	154	184	40	120	122	40	122	128	40	170	188	40	182
40T	154	184	40T	120	122	40T	122	128	40T	NA	188	40T	182
45	154	184	45	120	122	45	122	128	45	170	188	45	182
45T	154	184	45T	120	122	45T	122	128	45T	170	188	45T	182
SM 42	170	184	SM 42	120	122	SM 42	124	130	SM 42	186	188	SM 42	154
48	170	184	48	120		48	NA		48	186	188	48	176
48T	170	184	48T	120		48T	NA		48T	186	188	48T	176
46	170	184	46	NA		46	124	130	46	186	188	46	176
46T	170	184	46T	120	122	46T	124	130	46T	186	188	46T	176
47	170	184	47	NA		47	124	130	47	186	188	47	176
47T	170	184	47T	NA		47T	124	130	47T	186	188	47T	176

Anexo B – Exemplo de prováveis sementes-irmãs

Exemplo de análise de genotipagem onde três sementes possuem 4 locos equivalentes para os locos testados.

(111 of 182)

	Crml5b_1	Crml5b_2	Crml26_1	Crml26_2	Crml59_1	Crml59_2	Crml2_1	Crml2_2	Crml13_1	Crml13_2	Crml27b_1	Crml27b_2	Score
S17	NA	NA	122	130	NA	NA	113	115	165	165	175	189	FOCAL
S17	NA	NA	122	130	NA	NA	113	115	165	165	175	189	1
S19	NA	NA	122	130	NA	NA	113	115	165	165	175	189	1
S18	NA	NA	122	130	NA	NA	113	115	165	165	175	189	0.93
S2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	115	115	165	165	175	189	0.86
S4	NA	NA	122	130	NA	NA	113	115	165	165	171	171	0.86

Anexo C- Adultos e sementes correspondentes.

Correspondência de genótipos das sementes e dos adultos para os três casos encontrados.

(152 of 182)

	Crml5b_1	Crml5b_2	Crml26_1	Crml26_2	Crml59_1	Crml59_2	Crml2_1	Crml2_2	Crml13_1	Crml13_2	Crml27b_1	Crml27b_2	Score
S75	154	162	120	128	114	122	115	115	165	165	NA	NA	FOCAL
S75	154	162	120	128	114	122	115	115	165	165	NA	NA	1
S78	154	162	120	128	114	122	115	132	NA	NA	NA	NA	0.86
IC10	154	162	120	128	114	122	115	115	165	165	171	185	0.79
S74	NA	NA	120	128	NA	NA	113	115	165	165	NA	NA	0.79
	Crml5b_1	Crml5b_2	Crml26_1	Crml26_2	Crml59_1	Crml59_2	Crml2_1	Crml2_2	Crml13_1	Crml13_2	Crml27b_1	Crml27b_2	Score
S32	NA	NA	NA	NA	NA	NA	113	127	167	167	NA	NA	FOCAL
S32	NA	NA	NA	NA	NA	NA	113	127	167	167	NA	NA	1
S34	NA	NA	NA	NA	NA	NA	113	127	NA	NA	NA	NA	0.93
IC11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	113	127	161	167	NA	NA	0.93
IC13	154	154	126	126	122	122	113	127	167	167	171	171	0.57
	Crml5b_1	Crml5b_2	Crml26_1	Crml26_2	Crml59_1	Crml59_2	Crml2_1	Crml2_2	Crml13_1	Crml13_2	Crml27b_1	Crml27b_2	Score
S106	NA	NA	124	128	NA	NA	108	113	NA	NA	NA	NA	FOCAL
S106	NA	NA	124	128	NA	NA	108	113	NA	NA	NA	NA	1
S67	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.86
S70	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.86
IC93	154	154	124	128	120	120	108	113	NA	NA	179	179	0.71