

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Botânica**

**Desenvolvimento de marcadores microssatélites e  
variabilidade genética em populações de *Vellozia*  
*gigantea* (Velloziaceae), espécie endêmica dos  
campos rupestres da Serra do Cipó, Minas  
Gerais**

**ANA PAULA VIMIEIRO MARTINS**

**Belo Horizonte – Minas Gerais**

**Agosto – 2011**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento de marcadores microssatélites e variabilidade genética em populações de *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), espécie endêmica dos campos rupestres da Serra do Cipó, Minas Gerais**

**ANA PAULA VIMIEIRO MARTINS**

ORIENTADOR: Dr. Eduardo Leite Borba

CO-ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. Karina Proite

Belo Horizonte – Minas Gerais

Agosto – 2011

**ANA PAULA VIMIEIRO MARTINS**

**Desenvolvimento de marcadores microssatélites e variabilidade genética em populações de *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), espécie endêmica dos campos rupestres da Serra do Cipó, Minas Gerais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Belo Horizonte – Minas Gerais

Agosto – 2011

Dissertação defendida e aprovada em 30 de agosto de 2011, pela banca examinadora constituída pelos professores:

---

Dr. Eduardo Leite Borba – Orientador

---

Dr<sup>a</sup>. Viviane da Silva Pereira

---

Dr. Eduardo Gomes Gonçalves

“Viste como levantaram aquele edifício de grandeza imponente? - Um tijolo, e outro. Milhares. Mas, um a um. - E sacos de cimento, um a um. E blocos de pedra, que são bem pouco ante a mole do conjunto. - E pedaços de ferro. - E operários trabalhando, dia após dia, as mesmas horas... Viste como levantaram aquele edifício de grandeza imponente?... À força de pequenas coisas!”

São Josámaria Escrivá

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela força e esperança alcançadas nos momentos mais difíceis e pelos pequenos milagres todos os dias.

Aos meus pais Vânia e Manoel pelo apoio, dedicação, confiança e pelo exemplo de fé. Ao meu irmão pelo amor incondicional e pelo exemplo de caridade.

Aos meus amigos, que perto ou longe, estiveram sempre presentes para rir ou chorar comigo, torceram pelo meu sucesso e compreenderam a minha ausência em tantos momentos.

Aos meus familiares pelo incentivo e pelos gostosos momentos de reunião familiar.

Ao Leandro pelo carinho, compreensão e apoio incondicionais.

Ao meu orientador Eduardo Borba pelo exemplo de profissionalismo, pela confiança no meu trabalho, pela exigência do melhor desempenho e pelos conhecimentos transmitidos que me proporcionaram crescer profissionalmente e pessoalmente.

A minha co-orientadora Karina Proite pela paciência, disponibilidade, apoio e confiança depositada em mim.

Ao professor Evanguedes Kalapothakis por me introduzir às técnicas de biologia molecular e por proporcionar a oportunidade de desenvolver diversos experimentos em seu laboratório.

Ao professor Fabrício dos Santos e a todos dos do LBEM especialmente a Bárbara Chaves e ao Anderson Chaves (Raul) pela oportunidade de construção da biblioteca enriquecida e pela enorme ajuda com as análises dos dados.

À Júnia Lousada e à professora Maria Bernadete Lovato pela disponibilização de material genético, fotos e mapa e por se colocarem sempre à disposição.

A todas as pessoas que contribuíram com as coletas, Kátia Torres, Marcos de Melo, Leo Cota, Eduardo Borba, Pedro Lage, Nara, Reinan, Vítor, Caetano, Daniel Loyola, Marina Dutra, Bárbara Leal, Ubirajara.

Aos professores dos departamentos de Botânica e Genética que contribuíram imensamente para a minha formação acadêmica e estiveram sempre dispostos a ajudar seja disponibilizando seus laboratórios ou seu tempo para responder a inúmeras dúvidas.

A todos do LBSM pela amizade, paciência, colaboração e incentivo. Especialmente a Ariane Barbosa, Cecília Fiorini, Bárbara Leal, Aline Joseph e Marcella Baroni que “colocaram a mão na massa” para que este trabalho fosse possível.

Aos colegas dos demais laboratórios do departamento de Botânica e de Genética que contribuíram com seu conhecimento, sua experiência e incentivo. Especialmente a Isabella Pena pela amizade, pela alegria e pelo enorme apoio.

À professora Denise Oliveira, coordenadora do PPGBOT, pela dedicação, compreensão e auxílio em questões burocráticas.

Às secretárias do PPGBOT, Sônia e Terezinha, pelo serviço prestado.

Às agências CNPq e FAPEMIG pela bolsa e pelo financiamento do projeto

A todos o meu MUITO OBRIGADA!

## ÍNDICE

<b>RESUMO GERAL</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA VELLOZIA GIGANTEA (VELLOZIACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DOS CAMPOS RUPESTRES DA SERRA DO CIPÓ, MINAS GERAIS</b>	<b>23</b>
RESUMO	24
INTRODUÇÃO	25
MÉTODOS E RESULTADOS	26
CONCLUSÕES	31
LITERATURA CITADA	32
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE <i>VELLOZIA GIGANTEA</i> (VELLOZIACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DOS CAMPOS RUPESTRES DA CADEIA DO ESPINHAÇO, UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES</b>	<b>33</b>
RESUMO	34
INTRODUÇÃO	35
METODOLOGIA	38
RESULTADOS	42
DISCUSSÃO	56
	viii



LITERATURA CITADA	62
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>68</b>
BIBLIOGRAFIA GERAL	73
<b>APÊNDICE 1</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE 2</b>	<b>87</b>

## RESUMO GERAL

*Vellozia gigantea* é uma espécie de distribuição geográfica restrita, endêmica dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, Sudeste do Brasil. As nove populações conhecidas ocorrem predominantemente dentro do Parque Nacional da Serra do Cipó e da Área de Proteção Ambiental Morro da Pedreira, com uma população ocorrendo fora de áreas protegidas. Entretanto, a ação antrópica é uma ameaça para a espécie, que constitui forófito de diversas epífitas, inclusive orquídeas exclusivas e/ou em risco de extinção, e pouco se sabe a respeito de sua biologia e história natural. Utilizando duas metodologias de construção de biblioteca genômica (primária e enriquecida), sete marcadores de microssatélites foram isolados e caracterizados para *V. gigantea*. O número de alelos por *locus* variou entre oito e 13 em uma análise inicial e praticamente dobrou com o aumento da amostragem em quase 7 vezes. Um *locus* se mostrou monomórfico. Utilizando cinco *loci* de microssatélites, a variabilidade e a estruturação genética foram avaliadas com base em amostras de todas as populações conhecidas. Foi encontrada uma diversidade elevada para a espécie ( $H_E = 0,836$ ) comparável à encontrada previamente com base em ISSR. O elevado coeficiente de endogamia nas populações ( $F_{IS}=0,255-0,592$ ) reflete uma estruturação intrapopulacional provavelmente consequente da dispersão restrita de sementes. Uma moderada diferenciação interpopulacional foi observada ( $\Phi_{PT} = 0,10$ ). A análise Bayesiana apontou o Vale do Travessão como uma barreira parcial ao fluxo gênico na espécie, importante na estruturação da variabilidade, que se separa em dois agrupamentos genéticos distintos. Apenas uma população apresentou fortes evidências de *bottleneck* recente. Os resultados obtidos são congruentes com uma distribuição histórica mais ampla da espécie, não refletindo os impactos da ação antrópica atual cujos efeitos levam algumas gerações para serem observados, principalmente, quando o tempo de vida dos indivíduos é longo e as populações são grandes. Esses impactos poderão ser melhor avaliados pela comparação com estudos de variabilidade das sementes que podem ser realizados com os microssatélites descritos, e outras perspectivas abertas por este trabalho. A preservação integral das maiores populações deve estar entre as principais medidas de conservação da diversidade da espécie.

## ABSTRACT

*Vellozia gigantea* is a narrowly endemic species to the *campos rupestres* of the Espinhaço Range, southeastern Brazil. Most of the nine known populations are inserted in the National Park of Serra do Cipó or inside the Environmental Protection Area Morro da Pedreira. Just one population is situated out of the protection area. However, the species is threatened by anthropic activities. Its stems include high richness and density of epiphytes including some rare and threatened orchids, but the knowledge about its biology and history are scarce. A primary library and an enriched genomic library were constructed and seven microsatellite primers set was isolated and characterized for *V. gigantea*. For the polymorphic loci, the allele number ranged from 9 to 13 in the primer analyses and was about two times higher with an increase of about 20 times in the sample size. Only one locus was monomorphic. Five loci were used to estimate the variability and the genetic structure in all the known populations. The species exhibited a high level of expected heterozygosity ( $H_E = 0.836$ ), similar to that found for ISSR. The high inbreeding coefficient for all populations ( $F_{IS}=0.255-0.592$ ) indicates a population substructure probably as a consequence of a restricted seed dispersion. The populations presented a moderate structuring ( $\Phi_{PT} = 0.10$ ). The results of Bayesian analysis resulted showed that the Travessão Valley is a partial barrier to gene flow, important to the variability structuring, that is grouped in two distinct genetic pool. Just one population exhibited strong evidences for a recent bottleneck. The results of this study are congruent to a wide historic distribution of the species and do not reflect actual anthropogenic impacts. These impacts could take a large number of generations to be evident, especially for large populations and long lived species. They would be probably better estimated by seeds variability research using the markers characterized in this work, and other perspectives opened by this study. Protecting entirely populations with the highest number of individuals should be a priority in the *in situ* conservation of the species.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os campos rupestres no estado de Minas Gerais, Brasil, incluem formações herbáceo-arbustivas associadas a solos litólicos, predominantemente quartzíticos. Inseridos nos biomas do Cerrado e da Caatinga, são frequentemente entremeados por matas ciliares e eventualmente salpicados de ilhas de capão. Ocorrem em altitudes a partir de 900m, ocupando de maneira disjunta as regiões mais elevadas da Cadeia do Espinhaço, desde o norte da Chapada Diamantina, na Bahia, até a Serra de Ouro Branco, em Minas Gerais. Podem ser encontrados também em outras formações geológicas, mais ao sul, nas Serras de São João d'El Rey, da Canastra e de Ibitipoca (Minas Gerais), a oeste, nas Serras dos Cristais e dos Pirineus e na Chapada dos Veadeiros (Goiás), e ao norte, nos Tepuis (norte da América do Sul) (Rapini *et al.*, 2008).

A vegetação dos campos rupestres é conhecida por apresentar um dos mais altos níveis de riqueza de espécies e de endemismo entre as numerosas formas vegetacionais encontradas no Brasil, sendo a Cadeia do Espinhaço uma das principais áreas de sua ocorrência. Estima-se que cerca de 30% das espécies nos campos rupestres são restritas a este tipo vegetacional (Giulietti *et al.*, 1997). Grande parte das espécies que ocorrem nos campos rupestres está distribuída em populações disjuntas, devido à descontinuidade destas cadeias montanhosas. Nas espécies rupícolas, esta distribuição naturalmente fragmentada é ainda mais evidente devido à descontinuidade dos afloramentos rochosos. Esta descontinuidade tem sido citada como um dos principais fatores responsáveis pela diferenciação das populações e pelo elevado grau de endemismo encontrado em áreas de campos rupestres (Giulietti & Pirani, 1988; Borba *et al.*, 2001; Jesus *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.* 2008).

A família Velloziaceae compreende cerca de 250 espécies, predominantemente de distribuição Neotropical, com aprox. 30 espécies ocorrendo na África e Madagascar, uma na China e uma na península Arábica (Mello-Silva, 2004; Mello-Silva *et al.*, 2011). O maior gênero da família, *Vellozia*, apresenta cerca de 105 espécies, englobando quase 45% das espécies de Velloziaceae. Suas espécies são conhecidas popularmente como canela-de-ema e são elementos vegetais típicos dos campos rupestres brasileiros (Giulietti & Pirani, 1988). A

Cadeia do Espinhaço nos estados de Minas Gerais e Bahia concentra grande diversidade da família (Menezes *et al.*, 1994) e é o principal centro de endemismo do gênero *Vellozia*.

Apesar de muito conspícua, sendo uma das mais altas espécies de monocotiledôneas brasileiras, excetuando-se as palmeiras, *Vellozia gigantea* N.L.Menezes & Mello-Silva é uma espécie apenas recentemente descrita, e na época de sua publicação uma única população era conhecida, ocorrendo no Parque Nacional da Serra do Cipó, na região conhecida como Alto Palácio, ocupando uma área de cerca de 20.000 m<sup>2</sup> (Mello-Silva & Menezes, 1999). *Vellozia gigantea* é a mais alta espécie conhecida da família, atingindo cerca de 6 metros de altura, e pertence a um grupo de espécies de hábito dracenoíde, acima de 2 metros de altura, constituído por outras espécies endêmicas da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais: *V. auriculata* Mello-Silva & N.L.Menezes (Serra do Ambrósio), *V. compacta* Mart. (Ouro Branco até Diamantina), *V. glabra* J.C.Mikan (Serra do Cipó até Diamantina), *V. piresiana* L.B.Sm. (Serra do Cipó) e *V. spiralis* L.B.Sm. (Grão Mogol-MG).

Recentemente, outras oito populações foram encontradas (Figura 1). Todas elas ocorrem em geral nos trechos de afloramentos rochosos voltados para leste, na drenagem da bacia do rio Doce, entre 1.200 e 1.500 metros de altitude, correspondendo aproximadamente à altitude em que ocorre a condensação de nuvens. Essas populações podem configurar manchas bastante isoladas, sobre afloramentos também isolados na matriz herbácea, ou ainda, um conjunto grande de manchas mais conectadas que, em geral, se desenvolvem ao longo de redes de drenagem, como o Rio Encantado e o Rio Preto. Os municípios de Morro do Pilar, Itambé do Mato Dentro e Itabira concentram todas as populações de *V. gigantea* em uma extensão linear total de aproximadamente 27 km (Lousada *et al.*, 2011).

A maioria dos indivíduos de *V. gigantea* está localizada dentro dos limites do Parque Nacional da Serra do Cipó ou na Área de Proteção Ambiental (APA) Morro da Pedreira, geralmente em locais de difícil acesso. Contudo, uma população recobre a Serra do Lobo, no município de Itabira, fora dos limites da APA e próxima a uma área de mineração da Companhia Vale do Rio Doce. Aparentemente, dois grandes vales (Vale do Rio do Peixe e o Vale da Serra do Lobo) podem atuar como barreiras geográficas para a dispersão da *V. gigantea*, de forma que sua distribuição pode ser agrupada em três regiões (Figura 1):

- I) Ao norte, quatro populações estão localizadas na região do Salitreiro, no município de Morro do Pilar, dentro e fora dos limites do Parque Nacional da Serra do Cipó. A área das manchas varia entre um quarto e centenas de hectares, dependendo da distribuição

dos afloramentos rochosos, e são separadas também por uma intrincada rede de drenagem. O Vale do Rio do Peixe que está ao sul dessas populações forma um cânion (Cânion do Travessão) com um desnível de 1000m e uma distância de até 2km entre as paredes no trecho em que ocorre a espécie, atingindo 400m acima do nível do mar no vale do rio. Essa altitude está bem abaixo daquela em que se observa a ocorrência das canelas-de-ema gigantes (1200 m).

- II) Entre o Vale do Rio do Peixe e o Vale da Serra do Lobo estão localizadas outras quatro populações, nos municípios de Itambé do Mato Dentro e Itabira, em manchas quase totalmente fora dos limites do Parque Nacional da Serra do Cipó.
- III) Ao sul, no município de Itabira, outro conjunto de manchas isoladas recobre a Serra do Lobo separada do maciço rochoso da Serra do Cipó por vales que chegam a 400 metros de altitude. Fora dos limites da APA, essa população ocorre em uma área bastante antropizada, com a presença de estradas, vilarejos, pastagens e próxima a uma mineração.

A Cadeia do Espinhaço é o centro de diversidade de vários grupos de plantas e estima-se que sua flora inclua mais de 4.000 espécies (Giulietti *et al.*, 1997). Os estudos florísticos nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço se intensificaram a partir da década de 1970 garantindo a descoberta de diversas espécies novas e reforçando sua alta taxa de endemismos e microendemismos (Rapini *et al.*, 2008). A distribuição das espécies dos campos rupestres, que é naturalmente fragmentada por barreiras geográficas e por especificidade de habitat, pode ser comparada à de espécies de ilhas, separadas entre si por condições ecológicas distintas que funcionam como barreiras à migração (Harley, 1995). Estimar a variabilidade genética e a estruturação espacial dessas espécies é importante para entender e testar diferentes processos evolutivos (dispersão, fragmentação, extinção) e para elaborar planos de manejo que auxiliem na preservação das espécies dentro e fora das unidades de conservação. Contribuir para a manutenção da diversidade biológica e dos recursos genéticos no território nacional e nas águas jurisdicionais é um dos objetivos do Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza – SNUC (Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000). Atualmente, a preocupação com a proteção de elementos da fauna, da flora, dos recursos hídricos, genéticos e edáficos que contribuem para a manutenção do equilíbrio ecológico são levados em

consideração em várias regiões do mundo para o planejamento de sistemas de unidades de conservação (SEMAD, 2007).

A estrutura genética das populações se refere à distribuição da variação genética, dentro das populações e entre elas, e é influenciada tanto por fatores genéticos como por fatores demográficos. Fatores demográficos incluem todos os processos que determinam a história de vida das espécies como nascimento, morte e taxa de dispersão em diferentes estágios de vida. Fatores genéticos incluem processos como mutação, deriva, recombinação e seleção (Buylia, 1994). Padrões históricos de fluxo gênico e vicariância influenciam a estrutura genética e filogeográfica das populações (Avise, 2000) e são dois dos mecanismos mais importantes utilizados para explicar a origem da disjunção espacial de populações dentro de uma espécie (Ronquist, 1997).

Diferentes marcadores moleculares podem ser utilizados para avaliar a diversidade genética e a estruturação inter e intrapopulacional em plantas. Marcadores baseados em sequências de cloroplasto têm se mostrado úteis na descrição de padrões filogeográficos e para inferir as rotas de migração de espécies (Avise, 2000; Petit *et al.*, 2003, 2005; Ramos *et al.*, 2007; Collevatti *et al.*, 2009). Os marcadores nucleares fornecem informações quanto ao fluxo gênico através de sementes e pólen (Collevatti *et al.*, 2010), variabilidade e estruturação espacial da espécie (Palma-Silva *et al.*, 2009), processos de hibridação natural (Fjellheim *et al.*, 2009) e parentesco de indivíduos (Bacles & Ennos, 2008). Juntos, marcadores plastidiais e nucleares geram uma ampla visão dos padrões evolutivos de cada espécie e são fundamentais na elaboração de planos de manejo (Martins *et al.*, 2006).

Os marcadores nucleares podem ser divididos basicamente em dois grupos, codominantes e dominantes, segundo a natureza dos dados obtidos com sua aplicação (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Os marcadores codominantes, como microssatélites e aloenzimas, permitem a distinção de genótipos homozigotos e heterozigotos, o que possibilita o cálculo de frequências genotípicas e alélicas, e através delas o fluxo gênico e o número de migrantes. O desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg em um determinado *locus* bem como o desvio do Equilíbrio de ligação entre *loci* também podem ser testados. Os marcadores dominantes, ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNAs*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), permitem apenas estimativas da variabilidade e da sua estruturação, sendo pouco informativos para estimativas do fluxo gênico dentro e entre populações. Com dados binários, genótipos heterozigotos não

podem ser diretamente identificados, ou distinguidos dos homozigotos, e a utilização de sua frequência, estimada, em fórmulas de variabilidade pode ser discutida (Nybom, 2004).

Os marcadores do tipo microssatélites (*Simple Sequence Repeats* - SSR) têm se mostrado adequados para estimar parentescos, hibridização e parâmetros populacionais (Guichoux *et al.*, 2011). Entretanto, apesar de serem conhecidos há mais de duas décadas (Litt & Luty, 1989), seu alto custo e longo tempo de obtenção foram os principais obstáculos para sua utilização nos últimos anos. Os SSRs são repetições de um a seis pares de base em sequência e podem ser encontradas em todo o genoma, especialmente em regiões intergênicas e íntrons (Ellegren, 2004). Essas regiões podem ser amplificadas pela técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) através de iniciadores (*primers*) elaborados especificamente para a sequência flanqueadora de cada marcador (*locus*) obtida através do sequenciamento de fragmentos do genoma estudado. O polimorfismo observado, ou seja, a diferença no tamanho dos produtos de PCR obtidos, se deve tanto a inserções quanto deleções que alteram o número de repetições do microssatélite, o que gera um número potencialmente elevado de alelos. O polimorfismo observado pode ser mais do que três vezes superior ao encontrado com outros marcadores codominantes em plantas, como o RFLP (Butcher *et al.*, 2000), pois o polimorfismo observado em isoenzimas é limitado por sua função metabólica e para RFLP há uma limitação no número de bandas de tamanhos diferentes que podem ser analisadas por eletroforese em gel (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A necessidade de um conhecimento prévio do genoma da espécie a ser estudada se torna um obstáculo para a utilização de marcadores tipo microssatélite, principalmente para espécies silvestres. Em um cenário em que o número de genomas completos é crescente para espécies cultivadas ou de importância econômica ([http://genomesonline.org/gold\\_statistics.htm](http://genomesonline.org/gold_statistics.htm)), a maior parte das espécies possui poucas ou nenhuma sequência disponível em bancos de dados públicos. Por isso, o emprego de bibliotecas enriquecidas é uma ferramenta indispensável para estudos de muitas espécies (Techen *et al.*, 2010). O esforço por desenvolver e aprimorar técnicas de enriquecimento (Zane *et al.*, 2002; Nunome *et al.*, 2006; Techen *et al.*, 2010), o desenvolvimento de técnicas mais modernas de sequenciamento e a possibilidade de analisar diversos produtos de PCR em uma única amostra têm permitido a aplicação de marcadores de microssatélites em diferentes espécies rompendo as barreiras dos altos custos e longos períodos de obtenção (Guichoux *et al.*, 2011). A amplificação cruzada, em que *primers* desenvolvidos para uma espécie são



utilizados para estudo de variabilidade genética em outras espécies, principalmente as congênicas, também facilita a aplicação da técnica para um número maior de táxons (Collevatti *et al.*, 1999; Zucchi *et al.*, 2002; Feres *et al.*, 2009). Como consequência, o número de trabalhos utilizando microssatélites cresceu linearmente desde a década de 1990 (Guichoux *et al.*, 2011).

Estudos de genética de populações com espécies da Cadeia do Espinhaço, por algum tempo, foram realizados essencialmente utilizando marcadores aloenzimáticos, revelando diferentes graus de variabilidade em espécies de *Acianthera*, *Bulbophyllum* e *Cattleya* (Orchidaceae; Borba *et al.*, 2001, 2005, Ribeiro *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2011), *Proteopsis* e *Minasia* (Asteraceae; Jesus *et al.*, 2001, 2009), *Melocactus* (Cactaceae; Lambert *et al.*, 2006a, 2006b), *Syngonanthus* (Eriocaulaceae; Pereira *et al.*, 2007), *Chamaecrista* (Fabaceae; Costa *et al.*, 2007; Conceição *et al.*, 2008) e duas espécies de *Vellozia* (Franceschinelli *et al.*, 2006). Comumente, estes estudos têm encontrado uma elevada estruturação genética (e.g., Jesus *et al.*, 2001) e também elevada variabilidade (e.g., Borba *et al.*, 2001) nas espécies endêmicas de campos rupestres. Entretanto, marcadores dominantes com níveis de polimorfismo mais elevados do que os encontrados com aloenzimas e com a vantagem de empregar técnicas mais baratas e menos laboriosas têm sido incorporados aos estudos de genética de populações com algumas espécies de cerrados e campos rupestres (Gomes *et al.*, 2004; 2006; Silva *et al.*, 2007; Manica-Cattani *et al.*, 2009; Cavallari *et al.*, 2010; Souza & Lovato, 2010; Barbosa, 2011; Cruz *et al.*, 2011), inclusive com *V. gigantea*, utilizando marcadores ISSR (Lousada *et al.*, 2011). No Brasil, ainda há poucos trabalhos publicados com marcadores do tipo microssatélite para espécies vegetais do bioma Cerrado (e.g., Collevatti *et al.*, 1999, 2001, 2010; Zucchi *et al.*, 2002, 2003; Martins *et al.*, 2006; Braga *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Cavallari *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2010; Telles *et al.*, 2011), abrangendo 12 espécies de 11 famílias, sendo apenas três destes estudos com espécies ocorrentes nos campos rupestres (*Lychnophora*, Asteraceae; Haber *et al.*, 2009; Rabelo *et al.*, 2011; *Coccoloba*, Polygonaceae; Moreira *et al.* 2008).

Em relação à diversidade genética, espera-se que espécies raras ou endêmicas apresentem baixos níveis de variação associada à distribuição restrita (Gitzendanner & Soltis, 2000). Por outro lado, para espécies raras com populações grandes seria esperado alto nível de variação (Ellstrand & Elam, 1993), por sofrerem menor influência da deriva genética e da endogamia. De qualquer maneira, é importante lembrar que, independentemente da

distribuição geográfica original (ampla ou restrita), a diminuição do tamanho e a fragmentação das populações (devido a atividades extrativistas, expansão das cidades, queimadas, etc.) intensificam a perda de variabilidade através da deriva genética e do aumento da endogamia (Frankham *et al.*, 2002; Hurst, 2009). As características reprodutivas de cada espécie interferem na distância de dispersão de pólen e de sementes e na taxa de cruzamento entre parentes ou de autofecundação, o que pode retardar ou acelerar a perda da diversidade genética devido à redução populacional (Ellstrand & Elam, 1993). Assim, é importante ressaltar que a determinação de parâmetros genéticos para uma determinada espécie deve ser associada à sua história filogenética e a outras características biológicas para fornecer uma informação consistente a respeito do seu status de ameaça (Gitzendanner & Soltis, 2000; Rapini *et al.*, 2008). A determinação de parâmetros genéticos populacionais e demográficos é fundamental no manejo em longo prazo de qualquer espécie, e manter a diversidade genética de espécies ameaçadas se tornou um tema central no planejamento da conservação (Falk & Holsinger, 1991).

Estudos de genética de populações de espécies raras ou endêmicas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço encontraram uma maior variabilidade relacionada ao maior tamanho populacional e ciclo de vida (Cavallari *et al.*, 2006; Jesus *et al.*, 2009) e ao sistema de cruzamento (autoincompatibilidade, hercogamia) (Gomes *et al.*, 2011; Azevedo *et al.*, 2007; Borba *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008). Baixas taxas de variabilidade foram associadas a eventos recentes de redução demográfica (Lambert *et al.*, 2006a) e ao comportamento do polinizador (Jesus *et al.*, 2001). A elevada estruturação genética observada nestes ambientes tem sido associada ao reduzido fluxo gênico entre populações disjuntas (Jesus *et al.*, 2001; Machado 2005; Lambert *et al.*, 2006a; Borba *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007), resultante da descontinuidade do habitat.

Associada ao turismo da Serra do Cipó, com porte incomum e belas flores, *V. gigantea* possui um grande potencial para ser intitulada “espécie-bandeira” (Lousada *et al.*, 2011) para a preservação dos campos rupestres em Minas Gerais. Muito pouco se sabe a respeito da biologia e do ciclo de vida de *V. gigantea*, mas Mello-Silva & Menezes (1999) destacam que a floração da espécie é irregular e a produção de novos indivíduos parece ser limitada. Apesar de parte das plantas estar dentro do limite do Parque Nacional da Serra do Cipó, a frequência de visitas por turistas, especialmente na primeira população conhecida, ameaça a espécie. Não se sabe a idade exata dos indivíduos das espécies dracenóides de

*Vellozia*, mas estimativas indicam que elas podem ter centenas de anos (Alves, 1994), de forma que estas populações podem não ter capacidade para se recuperar do impacto antrópico que vem atuando de forma intensa e rápida, a menos que sejam adotadas medidas de conservação e manejo apropriadas. Em estudos com outras espécies do gênero as plantas se mostraram perenes, bem adaptadas ao fogo e auto-incompatíveis (Sazima, 1978; Oliveira *et al.*, 1991; Alves, 1994; Ibisch *et al.*, 1995; Porembski & Barthlott, 1995; Franceschinelli *et al.*, 2006). A polinização é principalmente por abelhas (Jacobi & del Sarto, 2007), mas beija-flores e mariposas polinizam algumas espécies (Franceschinelli *et al.*, 2006). As sementes de *Vellozia*, dispersas principalmente por barocoria (Franceschinelli *et al.*, 2006; Conceição *et al.*, 2007) ou pelo vento (Ibisch *et al.*, 2001), aparentemente não atingem grandes distâncias. Ainda mais restrito é o conhecimento a respeito do genoma da espécie. Dos 327 registros de sequências depositadas para a família no GenBank, há 110 para o gênero *Vellozia*, sendo todas de RNA ribossomal ou DNA plastidial. Nenhuma sequência de *Vellozia gigantea*.

Ribeiro *et al.* (2005), estudando três populações de *V. gigantea*, constatou que a densidade da espécie varia de 0,18 a 0,46 indivíduos/m<sup>2</sup>, com 3% a 96% dos indivíduos apresentando sinais de fogo em seus caules, e com uma elevada proporção de ramos mortos nos indivíduos. Grande percentual dos indivíduos, 53% a 78%, apresenta grande quantidade de epífitas de cerca de 10 a 17 espécies distintas, especialmente de orquídeas. Algumas destas espécies são orquídeas epífitas exclusivas de *V. gigantea*, como *Grobysa cipoensis* F. Barros & R. Lourenço, espécie microendêmica da Serra do Cipó (Barros & Lourenço, 2004), e outras são ameaçadas de extinção, como *Cattleya brevipedunculata* (Cogn.) Van den Berg (Mendonça & Lins, 2000). As demais espécies de *Vellozia* arborescentes deste grupo também são conhecidas por servirem de suporte para outras espécies de orquídeas, com elevado grau de especificidade, muitas delas também raras ou ameaçadas de extinção, como *Constantia cipoensis* Porto & Brade (Werneck & Espírito-Santo, 2002; Porembski, 2004). Estas epífitas são coletadas para comercialização em grandes centros, normalmente com o ramo das plantas coletados juntamente e usados como substrato, constituindo também uma ameaça aos indivíduos de *V. gigantea*. Espécie vulnerável (Fundação Biodiversitas, 2005), com distribuição geográfica restrita e localizada em uma área altamente antropizada, a preservação de *V. gigantea* também é importante para a sobrevivência de outras espécies.

Com grande importância como forófito para outras espécies, principalmente de orquídeas, além da importância ecológica, apenas quatro estudos foram desenvolvidos a

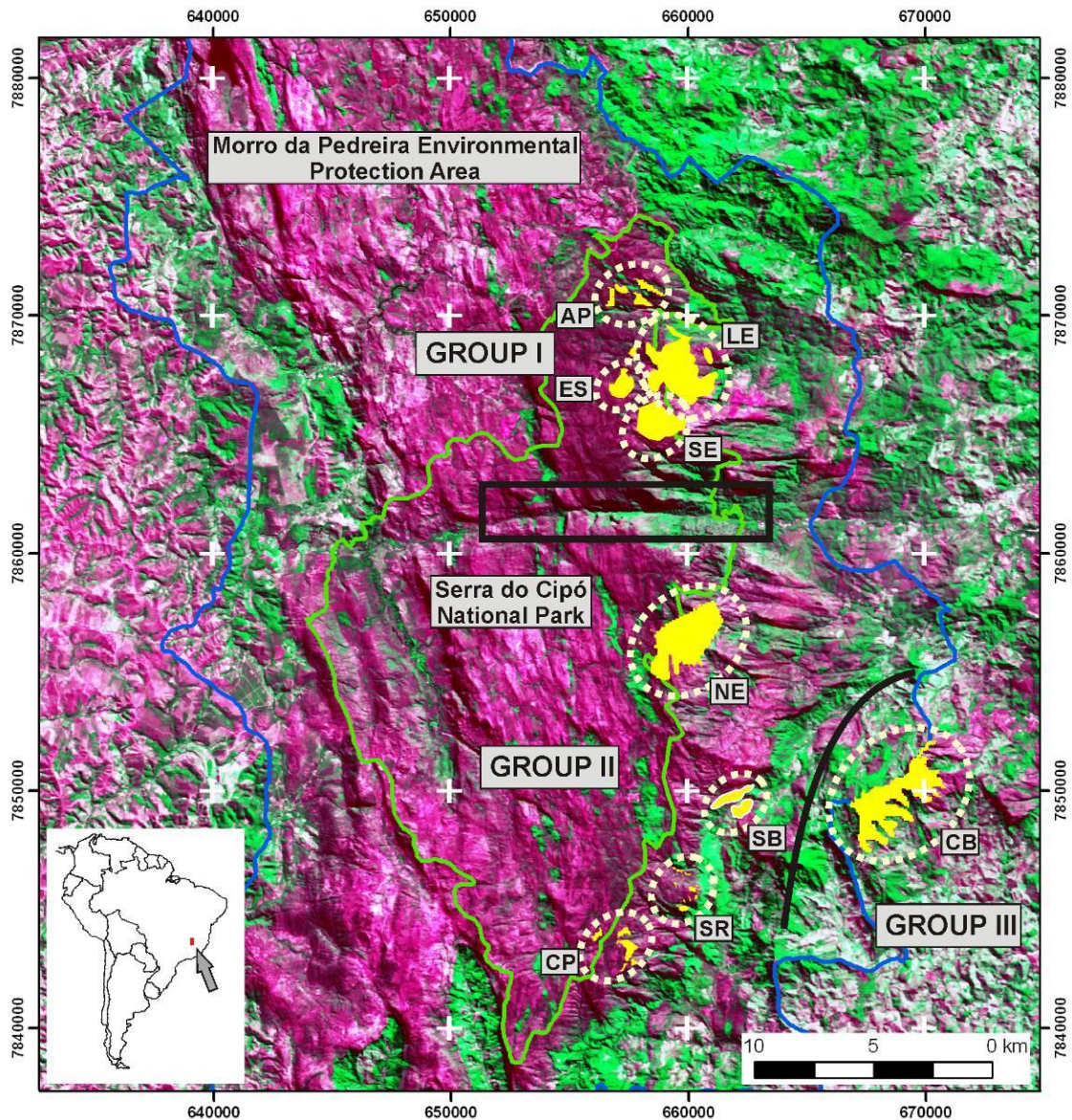
respeito da variabilidade genética de espécies da família (Franceschinelli *et al.*, 2006; Lousada, 2010; Barbosa, 2011), sendo um deles com *V. gigantea*, como mencionado anteriormente (Lousada *et al.*, 2011). Lousada *et al.* (2011) encontrou níveis moderados a altos de diversidade genética para *V. gigantea*, utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR. A diversidade intrapopulacional foi superior à encontrada para *V. compacta* (Lousada, 2010), outra espécie dracênóide também ocorrente na Cadeia do Espinhaço, porém com distribuição mais ampla, utilizando o mesmo marcador. Outras duas espécies congênicas de distribuição restrita apresentaram menor diversidade para aloenzimas (Franceschinelli *et al.*, 2006). Uma explicação para esta elevada variabilidade pode ser o ciclo de vida longo da espécie somado ao tamanho populacional relativamente grande, fatores que retardam o impacto da deriva genética na redução da diversidade. Os resultados obtidos por Lousada *et al.* (2011) indicam que *V. gigantea* seja uma espécie perene, anemocórica/barocórica (Franceschinelli *et al.* 2006) e alógama (Jacobi & Del Sarto, 2007), características biológicas descritas para outras espécies do gênero. A divergência entre as populações obtida através dos marcadores ISSR foi elevada para uma espécie endêmica de distribuição restrita apontando o Vale do Travessão como uma barreira parcial ao fluxo gênico em *V. gigantea*. Esse dado também reforça a hipótese de que a descontinuidade geográfica e de habitat da Cadeia do Espinhaço é um dos principais fatores que levam à divergência interpopulacional. Em termos de conservação, todas as populações estão de imediato ameaçadas pelos incêndios recorrentes, ateados principalmente por criadores de gado para rebrota de capins para pastagem, mesmo dentro do Parque Nacional da Serra do Cipó. Mas, ocorre também alta mortalidade por motivos ainda não comprovados, como possivelmente pelas perfurações feitas por abelhas *Xylocopa* (Hymenoptera). Desta forma, medidas imediatas de proteção são de evidente importância a médio e curto prazos.

Através de um marcador de DNA altamente variável e que pode ser transmitido por fluxo polínico, como os microssatélites, pode-se estimar o fluxo gênico gamético recente entre as populações e a variabilidade genética das populações, bem como a partição desta variabilidade em uma abordagem metapopulacional (Shepherd & Perrie, 2011). Aplicado em escala local, esse marcador fornece informações quanto ao fluxo gênico recente, ao tamanho da vizinhança genética e ao nível de endogamia (Collevatti *et al.*, 2011). A abordagem intrapopulacional também pode indicar características ecológicas (Collevatti *et al.*, 2001) de *V. gigantea* (ainda pouco conhecidas) como estratégias de reprodução e o padrão dinâmico de

ocupação e estabelecimento de uma população ao longo do tempo. Considerando a dificuldade de estudos de biologia floral para *V. gigantea*, devido à altura dos indivíduos e à irregularidade da floração e à ausência de dados biológicos para a espécie, os microssatélites permitem estimativas fundamentais para a inferência de seu padrão de dispersão gênica e o entendimento de sua dinâmica evolutiva (Hardy *et al.*, 2006).

Avaliar a diversidade genética e compreender os padrões ecológicos da *V. gigantea* contribui para a consolidação do SNUC que busca a preservação *in situ* da diversidade em longo prazo. Obtem-se assim informações importantes em relação a alguns dos objetivos básicos de manejo: proteger espécies endêmicas e ameaçadas de extinção, promover o fluxo gênico e preservar a diversidade biológica (SEMAD, 2007).

Neste contexto, esse trabalho teve como objetivos (i) desenvolver *primers* específicos para *Vellozia gigantea* a serem utilizados na amplificação de *loci* de microssatélites em estudos ecológicos e de genética de populações dessa espécie e de outras espécies do gênero baseado na conservação das regiões flangeadoras; (ii) disponibilizar sequências genômicas de *V. gigantea* em bancos de dados públicos que permitam a sua utilização em diferentes estudos baseados em polimorfismos de sequência (*Single-nucleotide Polymorphisms* - SNPs) ou associação com variações fenotípicas; (iii) utilizar os *loci* de microssatélites encontrados para avaliar a variabilidade genética da espécie e a sua estrutura espacial baseadas em cálculos de frequências genotípicas e alélicas obtidas com marcador codominante; (iv) testar a existência de um fluxo gênico restrito entre as populações pertencentes ao Grupo I, separado pelo cânion do Travessão, em relação às demais populações.



**Figura 1.** Distribuição geográfica das populações de *Vellozia gigantea* na Serra do Cipó, Cadeia do Espinhaço, sudeste do Brasil. As populações são indicadas pelas manchas amarelas dentro dos círculos pontilhados. O retângulo em preto (no centro da figura) destaca o cânion do Travessão (Vale do Rio do Peixe) e o arco em preto (no canto inferior direito) o vale da Serra do Lobo. A delimitação interna (em verde) mostra os limites do Parque Nacional da Serra do Cipó e a delimitação externa (em azul) os limites da APA Morro da Pedreira. Reproduzido de Lousada *et al.* (2011), com autorização dos autores. Para o nome e localização das populações veja a tabela 2.1 (Capítulo 2).

## **CAPÍTULO 1**

### **Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), espécie endêmica dos campos rupestres da Serra do Cipó, Minas Gerais**

## RESUMO

- *Premissa do estudo:* Os primeiros *primers* para marcadores microssatélites foram desenvolvidos para *Vellozia gigantea*, espécie endêmica e de distribuição restrita aos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço no Brasil.
- *Métodos e resultados:* Utilizando dois protocolos de biblioteca genômica, sete *loci* de microssatélites foram isolados e caracterizados para três populações de *V. gigantea*. Os *primers* amplificaram repetições di- e trinucleotídicas com um a 13 alelos por *locus*. A heterozigosidade média observada foi de 0,583 e a heterozigosidade esperada 0,753.
- *Conclusões:* Esses marcadores permitirão estudos de diversidade genética e estrutura genética espacial de *V. gigantea* e a elaboração de melhores planos de conservação e manejo, além de apresentar uso potencial em estudos taxonômicos em complexos de espécies na família.



## INTRODUÇÃO

*Vellozia gigantea* N.L.Menezes & Mello-Silva (Velloziaceae) é uma monocotiledônea de hábito dracenoide, alcançando cerca de 6m de altura, endêmica dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, leste do Brasil (Mello-Silva & Menezes, 1999). Existem apenas nove populações conhecidas da espécie, ocupando uma extensão linear de aproximadamente 27 km, mas com distribuição disjunta devido à sua ocorrência em afloramentos rochosos. Esta espécie emblemática sofreu pressão do turismo no Parque Nacional da Serra do Cipó, no estado de Minas Gerais, devido à sua arquitetura incomum e por constituir forófito para cerca de 17 espécies, incluindo a orquídea epífita exclusiva desta Velloziaceae, *Grobya cipoensis* F. Barros & R. Lourenço, e da rara *Cattleya brevipedunculata* (Rchb. f.) Van den Berg. *Vellozia gigantea* é atualmente considerada uma espécie ameaçada, devido ao distúrbio e perda de hábitat causados principalmente por intervenção antrópica, incluindo coleta de orquídeas, fogo, gado e atividade mineradora.

Este estudo objetiva o desenvolvimento de *primers* para microssatélites para serem empregados em estudos de genética de populações de *V. gigantea*, e que possam eventualmente ser aplicados em estudos similares em outras espécies de *Vellozia*, bem como em estudos taxonômicos em complexos de espécies do gênero.

## MÉTODOS E RESULTADOS

Duas bibliotecas genômicas foram utilizadas para a obtenção dos microssatélites de *V. gigantea*. Uma biblioteca primária foi construída segundo Yazbeck & Kalapothakis (2007) com algumas modificações. O DNA total (10µg) extraído de folhas jovens frescas de um indivíduo segundo o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) foi digerido com a enzima *Sau3AI* (Promega). Os fragmentos foram selecionados (<400pb) e ligados ao vetor pUC 18 previamente clivado com a enzima *BamHI* (Promega) e desfosforilado. Após transformação com células de *Escherichia coli* XL1-blue eletrocompetentes (Phoneutria) e seleção das colônias (Ampicillina 100 µg/mL, Xgal 40 µg/µL e IPTG 0,5 M), foi realizada a purificação dos plasmídeos por lise alcalina das células (Sambrook *et al.*, 1989). Uma amostra de cada clone foi aplicada em membrana de nylon carregada positivamente (Biorad) e hibridizada com sondas de oligonucleotídeos de 16pb (motivos de repetição: GATA, TATC, GACA, GGAT, TATT, TACT, CGGA, GTCA, CCGT, GAGG, GATT, CATG, CCAG, CATG, CCAG, CTTG, CAGC, TATG, TAGT, AAGT, AAGT, CAT, CAC, GTA, GAA, AAT, CTT, CAC, CCG, CAG, CA, CT e TA) marcadas com fósforo radioativo [ $\gamma$ 32P] d-ATP (10 mCi/mL - GE Healthcare) utilizando o 5' Labelling kit (GE Healthcare). Após pré-hibridização (6X SSC: 0,9 M NaCl, 0,09 M Citrato de Sódio), 0,1% SDS e 5% BLOTO), as membranas foram incubadas em tampão de hibridização (6X SSC e 0,1% SDS) contendo 5 ng/mL de sondas radioativas por 14 h a 45°C. As membranas foram lavadas para controle de estringência e expostas a um filme autoradiográfico (35 x 43 cm de filme Kodak T-Mat G/RA) a -80°C por dois períodos diferentes (4 e 16 h). Os clones positivos foram sequenciados utilizando o *primer* universal M13 em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems).

A segunda biblioteca genômica foi realizada com adaptações da técnica de enriquecimento para microssatélites descrita por Nunome *et al.* (2006). O DNA total de folhas jovens secas em sílica (5µg) foi extraído segundo o protocolo descrito por Russel *et al.* (2010) e digerido com a enzima *RsaI* (Promega). Os fragmentos gerados foram ligados a dois adaptadores (*Rsa21\_5'*-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3'/ *Rsa25\_5'*-TAGTCCACGGTAAGCAAGAGCACA-3') utilizando T4 DNA ligase (Promega) a 37°C por 6 horas. Para confirmar a ligação, uma PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada

utilizando o *Rsa21* como *primer* específico. Os *amplicons* (400 a 1600pb) foram hibridizados com sondas biotinizadas (CT<sub>8</sub>, GT<sub>8</sub>, GATA<sub>4</sub> e GACA<sub>4</sub>). Os fragmentos contendo sequências repetitivas foram recuperados utilizando esferas magnéticas (Streptavidin MagneSphere® – Promega), clonados no vetor pGEM T-Easy Vector (Promega) e transformados em células de *Escherichia coli* XL1-Blue quimiocompetentes (Sambrook *et al.*, 1989). Após seleção (Ampicilina e IPTG/X-gal), os clones recombinantes foram diluídos e lisados em água mili-Q e uma alíquota de cada foi utilizada para a PCR com o primer M13 (*forward* e *reverse*) complementar ao vetor. Os produtos de PCR acima de 400pb foram purificados com o auxílio de uma solução PEG 20% (NaCl 2,5M e Polietilenoglicol 8000 a 20%) e sequenciados em sequenciador automático ABI3730XL (Applied Biosystems). A busca por microssatélites foi realizada em todas as sequências obtidas utilizando o site Microsatellite Repeats Finder ([www.biophp.org/minitools/microsatellite\\_repeats\\_finder/demo.php](http://www.biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php)). Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000) com um tamanho de 18 a 22pb, contendo 40-60% de GC, temperatura de anelamento entre 57 e 63°C e para ampliações entre 100 e 400pb.

Ao todo, dos 160 clones da biblioteca primária foram sequenciados, 15 apresentaram microssatélites com 12 pb ou mais com diferentes motivos de repetição (TA, CT, AAT, AAG, CGG, TCTA). Contudo, foi possível o desenho de *primers* para 10 *loci*, dos quais somente o *locus* Vel01 apresentou qualidade de amplificação necessária para utilização em análises genéticas baseadas no tamanho dos alelos. Ao *primer forward* deste *locus* foi adicionado o fluoróforo HEX na extremidade 5'. As ampliações foram realizadas em volume final de 25 µL contendo 10-15ng de DNA; 2,5 µL de Tampão (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl; 1% Triton; 15,0 mM MgCl<sub>2</sub>); 0,1 mM dNTPs; 0,2µM cada *primer*; 1U de Taq polimerase (Phoentria). A PCR foi realizada em Mastercycler® (Eppendorf) com o programa, 94 °C por 2 min, seguidos por 35 ciclos de 96 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg e extensão final a 72°C por 3 min. Um total de 229 clones da biblioteca enriquecida foram sequenciados e 48 apresentaram microssatélites, todos dinucleotídicos de tema GT ou CT. Foram desenhados *primers* para 16 *loci* de microssatélites simples e perfeitos obtidos com a técnica de enriquecimento e adicionada uma cauda M13 à extremidade 5' dos *primers forwards* (Schuelke, 2000). Uma boa qualidade de amplificação foi obtida em 6 *loci* (Vel02, Vel03, Vel04, Vel05, Vel06, Vel07). As PCRs em volume final de 25 µL foram realizadas nas seguintes condições: tampão (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl; 1% Triton; 15,0 mM

MgCl<sub>2</sub>) ou Tampão IV B 5X (15,0mM MgCl<sub>2</sub>)(Phoneutria); dNTP 0,25mM; *primer forward* 0,04pmoles/ $\mu$ L, *reverse* 0,16pmoles/ $\mu$ L e 6-FAM.M13 0,16pmoles/ $\mu$ L ; 1u de Taq polymerase (Phoneutria). Para os *loci* Vel02, Vel04 e Vel05 foi utilizado BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 0,4mg/mL. As reações foram realizadas em termocicladores Biocycler (Biosystems). Para os *loci* Vel02 a Vel06 foi utilizado o seguinte programa: 94°C por 5 min; 20 ciclos de 30seg a 94°C, 45seg à temperatura de anelamento do *primer* específico e 72°C por 45seg; 28 ciclos de 30seg a 94°C, 45seg à 50°C (para anelamento do *primer* 6-FAM.M13) e 72°C por 45seg; extensão final a 72°C por 30 a 60min. Os produtos das PCRs foram analisados em sequenciador automático ABI3730XL (Applied Biosystems) e visualizados com Peak Scanner™ Software (Applied Biosystems). O macro, para Excel, Autobin (<http://www4.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco/Ressources/Logiciels/Autobin>) (Guichoux *et al.*, 2011) foi utilizado para nomeação dos alelos.

Todos os *loci* foram testados quanto ao polimorfismo em uma amostra inicial de cinco indivíduos de cinco populações. Apenas Vel07 se mostrou monomórfico para a espécie (Tabela 1.1) e por isso não foi utilizado nos testes subsequentes. Foram genotipados 24 indivíduos de três populações (oito indivíduos/população): Alto Palácio (AP), Leste da Estrutura (LE) e Salitreiro (ES). Os cálculos do número de alelos por *locus* e das médias das heterozigidades observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) foram realizados utilizando o programa GENALEX 6.4 (Peakall & Smouse, 2006) (Tabela 1.2). Mesmo com a amostragem de um número reduzido de indivíduos, e que cobre apenas um terço das populações da espécie, foram obtidos valores moderadamente elevados de heterozigosidade média observada ( $H_O = 0,583$ ) e heterozigosidade média esperada ( $H_E = 0,753$ ) para a espécie. Testes preliminares de amplificação cruzada utilizando três a oito indivíduos de outras espécies do gênero obtiveram ampliações para todos os *loci*, Vel01 (*V. auriculata* e *V. hirsuta*), Vel02 (*V. compacta*), Vel03, Vel04 e Vel05 (*V. auriculata*), Vel06 (*V. auriculata*, *V. compacta*, *V. hirsuta*) e Vel07 (*V. auriculata*). O produto das PCRs foram visualizados em gel de agarose.

**Tabela 1.1.** Características dos sete *primers* de microssatélites desenvolvidos para *Vellozia gigantea*. Vel01 foi obtido através da biblioteca genômica primária e os demais através da biblioteca enriquecida. Para cada par de *primer*: *forward* (F), *reverse* (R), temperatura de anelamento ( $T_a$ ), número de alelos (A), tamanho mínimo e máximo dos alelos. Todos os valores são baseados em 24 amostras de três populações.

<i>Locus</i>	<i>Primers (5'-3')</i>	$T_a$ (°C)	Motivo de repetição	A	Tam. (pb)
Vel01	F: HEX- TAATCTGGGCCAACTCCAG R: TGGGACAGTCGCTGAACG	60,0	(CTT) <sub>4</sub> C(CTT) <sub>2</sub>	9	320-353
Vel02	F: M13-CAGGTAATCTTCCCTCGGTGGC R: ACCGGTCCTCTAAACACGTC	67,0	(CT) <sub>19</sub>	9	221-249
Vel03	F: M13-CCTAGCCTTGATATGTCGTCGG R: GGTCCGCCAGTTAGACTTTG	60,2	(GT) <sub>18</sub>	11	140-161
Vel04	F: M13-TCTGCCTCGACCAAATCCG R: CCACCCATCACTAACATCGTTCAC	67,0	(CT) <sub>20</sub>	13	154-189
Vel05	F: M13-CGAACTCCGTGGGATGTTG R: GCACGTTCTGCTACCATCATCG	63,9	(CT) <sub>9</sub>	8	137-157
Vel06	F: 13-GAGCTGGCGCTTCTTCCATTTAC R: CTGCCGTCGATGATGATGTCC	67,0	(CT) <sub>16</sub>	12	104-132
Vel07	F: M13- AGCCGGCCACACCAAATAC R: TGCATGTGGTATTGGGACAC	61,0	(GT) <sub>8</sub>	1	145

M13 (5'-TTTTCCCAGTCACGAC-3')

**Tabela 1.2.** Diversidade genética obtida em análises iniciais de três populações\* de *Vellozia gigantea*, com tamanho amostral por população (n) = 8. Para cada população, o número de alelos (A), a heterozigosidade observada ( $H_O$ ), a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) por *locus*.

<i>Locus</i>	Alto Palácio (AP)			Leste da Estrutura (LE)			Salitreiro (ES)		
	A	$H_O$	$H_E$	A	$H_O$	$H_E$	A	$H_O$	$H_E$
Vel01	6	0,250	0,617	3	0,375	0,492	3	0,125	0,342
Vel02	7	1,000	0,892	6	0,750	0,833	6	0,875	0,833
Vel03	6	0,500	0,842	8	0,500	0,892	6	0,500	0,842
Vel04	8	0,625	0,900	6	0,750	0,783	7	0,875	0,850
VEI05	7	0,250	0,867	5	0,375	0,450	5	0,250	0,533
Vel06	6	0,750	0,817	9	1,000	0,933	6	0,750	0,833

\*Coordenadas geográficas das populações: AP (S 19°14'52,19"/ W 43°30'37,10"), LE (S 19°16'25,7"/ W 43°29'34,5"), ES (S 19°16'37,9"/ W 43°30'08,8")

## CONCLUSÕES

*Vellozia gigantea* apresentou uma baixa frequência de microssatélites em seu genoma nas duas técnicas utilizadas. A porcentagem de GC muito elevada ou muito baixa nas regiões flanqueadoras e um grande número de duplicação de sequências no genoma dificultaram a identificação de regiões adequadas ao desenho dos *primers*. Esta é a primeira iniciativa de desenvolvimento de marcadores microssatélites para a família Velloziaceae. Foram identificados seis *loci* polimórficos e um aparentemente monomórfico, sendo que este último que poderá ser empregado em estudos filogeográficos ou na delimitação taxonômica de complexos de espécies em *Vellozia*. Os seis marcadores descritos neste trabalho representam o primeiro conjunto de marcadores codominantes, neutros e altamente polimórficos. Os microssatélites serão úteis na investigação de variabilidade genética, estrutura populacional e ecologia da espécie ao longo de toda sua distribuição geográfica. As informações geradas ajudarão na elaboração de planos de manejo para preservação da espécie e na conservação da flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço.

## LITERATURA CITADA

- Doyle, J. J. & Doyle J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malause, T., Revardel, E., Salin, F. & Petit, R. J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591-611.
- Mello-Silva, R. & Menezes, N. L. 1999. Two new Brazilian Velloziaceae, *Vellozia auriculata* and *Vellozia gigantea*, and a key to related dracenoid species of *Vellozia*. *Novon* 9: 536-541.
- Nunome, T., Negoro, S., Miyatake, K., Yamaguchi, H. & Fokuoka, H. 2006. A protocol for the construction of microsatellite enriched genomic library. *Plant Molecular Biology Reporter* 24: 305-312.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. J. 2000 . Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., and S. Misener [eds.], *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey. pp . 365-386.
- Russell, A., Samuel, R., Rupp, B., Barfuss, M., Šafran, M., Besendorfer, V., et al. 2010. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon* 59: 389-404.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233–234.
- Yazbeck, G. M. & Kalapothakis E. 2007. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Research* 6: 1026-1034.



## **CAPÍTULO 2**

**Diversidade genética e estrutura populacional de *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), espécie endêmica dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, utilizando marcadores microssatélites**

## RESUMO

*Vellozia gigantea* é uma espécie de distribuição geográfica restrita endêmica dos campos rupestres da Serra do Cipó, sudeste do Brasil. Utilizando cinco *loci* de microssatélites, a variabilidade e a estruturação genética foram avaliadas com base em amostras de todas as populações conhecidas. Foi encontrada uma diversidade elevada para a espécie ( $H_E = 0,836$ ) comparável à encontrada previamente com base em ISSR. O também elevado coeficiente de endogamia nas populações ( $F_{IS}=0,255-0,592$ ) reflete uma estruturação intrapopulacional, provavelmente consequente da dispersão restrita de sementes. Uma moderada diferenciação interpopulacional foi observada ( $\Phi_{PT} = 0,10$ ). A análise Bayesiana apontou o Vale do Travessão como uma barreira parcial ao fluxo gênico na espécie, importante na estruturação da variabilidade, dividida em dois agrupamentos genéticos distintos. Apenas uma população apresentou *bottleneck* recente. A preservação integral das maiores populações está entre as principais medidas de conservação da diversidade da espécie.

## INTRODUÇÃO

Determinar a estrutura genética das populações naturais é uma parte importante de genética de populações e tem diversas aplicações na biologia evolutiva, da conservação e forense (Meirmans & Hedrick, 2011). Diferentes fatores podem influenciar a diversidade genética e a sua distribuição entre as populações, tais como a forma de vida, a distribuição geográfica, o sistema de reprodução e de dispersão das sementes (Hamrick & Godt, 1996; Nybom, 2004). Esforços significativos têm sido feitos nas últimas três décadas para descrever a flora dos campos rupestres (Rapini, 2008), mas informações a respeito da variabilidade genética não acompanham o conhecimento da diversidade de espécies e estão concentradas em poucos gêneros de algumas famílias (Asteraceae, Gomes *et al.*, 2004, Jesus *et al.*, 2009; Bromeliaceae, Cavallari *et al.*, 2006; Cactaceae, Lambert *et al.*, 2006; Leguminosae, Conceição *et al.*, 2008; Orchidaceae, Borba *et al.*, 2007, Cruz *et al.*, 2011, Ribeiro *et al.*, 2008; Velloziaceae, Lousada *et al.*, 2011).

Os campos rupestres incluem formações herbáceo-arbustivas associadas a solos litólicos, predominantemente quartzíticos. Ocorrem em altitudes a partir de 900m, ocupando de maneira disjunta as regiões mais elevadas da Cadeia do Espinhaço, desde o norte da Chapada Diamantina, na Bahia, até a Serra de Ouro Branco, em Minas Gerais. A vegetação dos campos rupestres é conhecida por apresentar um dos mais altos níveis de riqueza de espécies e de endemismo entre as numerosas formas vegetacionais encontradas no Brasil, sendo a Cadeia do Espinhaço uma das principais áreas de sua ocorrência. A Serra do Cipó, na porção sul do Espinhaço foi reconhecida pela UNESCO como reserva da biosfera por apresentar um elevado grau de endemismo de plantas e animais (Silva *et al.*, 2007). Mas muitas de suas espécies sofrem risco de extinção tornando urgente o conhecimento dos padrões de diversidade genética que orientem planos de conservação e manejo efetivos.

Na cadeia do Espinhaço, a descontinuidade geográfica e de habitat, especialmente para espécies rupícolas, tem sido citada como um dos principais fatores responsáveis pela diferenciação das populações (Borba *et al.*, 2001; Jesus *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007). Além disso, eventos recentes de colonização ou redução populacional bem como a auto-fecundação podem ser associados a uma variabilidade reduzida (Conceição

*et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008). A manutenção de uma variação moderada a alta pode ocorrer devido ao longo tempo de vida dos indivíduos (Cavallari *et al.*, 2006).

O gênero *Vellozia* é o maior gênero da família Velloziaceae com espécies conhecidas popularmente como canelas-de-ema e são elementos típicos dos campos rupestres brasileiros (Giulietti & Pirani, 1988). A Cadeia do Espinhaço nos estados de Minas Gerais e Bahia concentra grande diversidade da família (Menezes *et al.*, 1994) e é o centro de endemismo do gênero *Vellozia*. Apesar de muito conspícua, sendo uma das mais altas espécies de monocotiledôneas brasileiras, excetuando-se as palmeiras, *Vellozia gigantea* N.L.Menezes & Mello-Silva é uma espécie apenas recentemente descrita (Mello-Silva & Menezes, 1999). Endêmica dos campos rupestres da Serra do Cipó e com distribuição restrita, *V. gigantea* permite uma avaliação da diversidade em toda sua distribuição e o entendimento de processos evolutivos que regem a variabilidade atual de diferentes espécies raras e distribuição fragmentada. A canela-de-ema gigante, como é conhecida, é bastante associada ao turismo na Serra do Cipó (Lousada *et al.*, 2011). Esta espécie atua como suporte para diferentes espécies epífitas (Ribeiro *et al.*, 2005), inclusive orquídeas exclusivas (Barros & Lourenço, 2004) e em risco de extinção (Mendonça & Lins, 2000). *Vellozia gigantea* é uma espécie vulnerável (Fundação Biodiversitas, 2005), mas muito pouco se sabe a respeito de sua biologia e sua história evolutiva. Mello-Silva & Menezes (1999) destacam que a floração da espécie é irregular e a produção de novos indivíduos parece ser limitada. Os resultados obtidos por Lousada *et al.* (2011) utilizando marcadores dominantes são compatíveis com os valores associados a espécies perenes, anemocórica/barocóricas e alógamas (Nybom, 2004), características biológicas descritas para outras espécies do gênero (Alves, 1994; Franceschinelli *et al.*, 2006; Jacobi & del Sarto, 2007).

Neste estudo, foi avaliada a diversidade e a estruturação genética da espécie e a existência de barreiras geográficas ao fluxo gênico com base em cinco marcadores de microssatélites desenvolvidos para *V. gigantea* (Capítulo 1). A ocorrência de eventos recentes de redução severa do tamanho populacional (*bottlenecks*) foram estimados para identificar populações com maior risco de extinção (Piry *et al.*, 1999) devido à perda de variação genética e conseqüentemente do potencial adaptativo. Os microssatélites foram escolhidos por sua eficiência em estimar parâmetros populacionais e no entendimento de padrões de fluxo gênico (Collevatti *et al.*, 1999) e por serem adequados para a identificação de *bottlenecks* devido a sua elevada variabilidade (Cornuet & Luikart, 1996). Resultados obtidos com

marcadores ISSR (Lousada *et al.*, 2011) e com microssatélites foram comparados ressaltando as aplicações e limites de cada um na avaliação da diversidade e inferência de fatores genéticos e demográficos responsáveis por sua estruturação.

## METODOLOGIA

### *Amostragem populacional*

Folhas jovens de 187 indivíduos das nove populações conhecidas de *Vellozia gigantea* (15-24 indivíduos por população) (Tabela 2.1) foram coletadas nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço no estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil. As populações ocorrem nos municípios de Pilar, Itambé do Mato Dentro e Itabira em uma área com extensão linear de aproximadamente 27 Km (Lousada *et al.*, 2011). A população CB recobre a Serra do Lobo, fora da Área de Proteção Ambiental (APA) Morro da Pedreira e se situando próxima a uma área de mineração. Todas as outras populações estão localizadas dentro do Parque Nacional da Serra do Cipó ou da APA Morro da Pedreira. As populações foram agrupadas (Grupos I, II e III) segundo sua distribuição geográfica, baseado na presença de possíveis barreiras geográficas ao fluxo gênico (Figura 2.1). O Grupo I (populações AP, LE, ES e SE) é separado do Grupo II (populações NE, SR, CP e SB), ao sul, pelo cânion do Travessão. O Grupo III compreende a população CB, cuja localização é separada do maciço da Serra do Cipó pelo vale da Serra do Lobo. Estes grupos seguem a mesma divisão apresentada por Lousada *et al.* (2011). Após a coleta, as amostras de cada indivíduo foram mantidas em sílica gel até a extração do DNA.

### *Extração de DNA total e genotipagem para os loci de microssatélites*

O DNA total de cada indivíduo utilizado foi extraído de aproximadamente 150 mg de folhas secas, segundo o protocolo de Doyle & Doyle (1987) com modificações sugeridas por Ferreira & Grattapaglia (1995). O protocolo de CTAB (brometo de cetil-trimetil-amônio) utiliza solução tampão contendo Tris 100mM pH 8,0, EDTA (ácido etileno-diamino tetraacético) 20 mM, NaCl 1.4M, CTAB 2%, PVP (polivinilpirrolidona) 1% e  $\beta$ -mercaptoetanol 2%. A concentração do DNA foi quantificada visualmente por eletroforese em agarose 0,8% pela comparação com padrão de concentração de DNA. As amostras foram diluídas em tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0) para uma concentração final de aproximadamente 5ng/ $\mu$ L para amplificações em PCR.

Os indivíduos foram genotipados para cinco marcadores polimórficos de microssatélite desenvolvidos para *V. gigantea* (Capítulo 1). As amplificações por PCR foram

realizadas em um volume final de 25  $\mu$ L, contendo 5-30ng de DNA, de acordo com as condições específicas descritas para cada *primer* (Capítulo 1). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems) utilizando GS500 LIZ ou 400HD *size standard* como padrão de tamanho em pares de base. Os picos gerados foram visualizados com o Peak Scanner™ Software (Applied Biosystems) e a nomeação dos alelos bem como a verificação de erros de anotação dos tamanhos dos picos obtidos foram realizadas com o auxílio de um macro MS-Excel, Autobin (<http://www4.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco/Ressources/Logiciels/Autobin>) (Guichoux *et al.*, 2011). O ponto de corte estabelecido para definição de alelos diferentes foi de no mínimo 0,5 (para o *locus* Vel01) ou 1 par de base (para os demais *loci*) de acordo com o padrão de distribuição contínua dos valores obtidos dos tamanhos do alelos em cada *locus*. O nome dos alelos foi definido de acordo com o menor valor inteiro obtido em pares de base dentro da faixa de tamanho correspondente observada no Autobin.

#### *Validação dos microssatélites, variação e diversidade*

Todos os indivíduos que apresentaram picos indefinidos ou ausência de amplificação para algum *locus* foram reamplificados em novas reações, assim como aproximadamente 10% dos genótipos homozigotos, para confirmar o resultado e testar uma concentração maior de DNA. Para a análise final dos dados foram excluídos todos os indivíduos que apresentaram picos múltiplos que impedissem a definição do genótipo para pelo menos um dos *loci* ou que não apresentaram amplificação persistente para três ou mais *loci*, indicando baixa qualidade da amostra. A não amplificação persistente para um ou dois *loci* foi interpretada como homozigose para alelos nulos devido a mutações no sítio de ligação dos *primers*, para a determinação da frequência de alelos nulos. No total, 156 indivíduos foram utilizados nas análises.

O programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004) foi utilizado para testar possíveis erros de análise das amplificações devido a alelos nulos, *stuttering* ou à eliminação do maior alelo, sendo utilizadas 1.000 aleatorizações. A frequência de alelos nulos para cada *locus* foi estimada pelo método de Brookfield 2, incluído no programa, que é o mais indicado quando toda a ausência de amplificação não se deve a artefatos técnicos, mas sim a uma homozigose para alelos nulos (Brookfield *et al.*, 1996). A frequência de alelos nulos por

*locus* em cada população também foi calculada pelo método de Dempster *et al.* (1977), utilizando o programa FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007).

Para cada *locus*, o número de alelos observados ( $A$ ), a variação do tamanho dos alelos, o desequilíbrio de ligação entre pares de *loci* e as heterozigosidades observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) (Nei, 1987) foram estimados no programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). Diferentes programas foram utilizados para caracterizar a diversidade populacional.  $H_O$  e  $H_E$  (Nei, 1987), foram calculados com o programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). A riqueza alélica ( $RA$ ) foi calculada para 12 indivíduos pelo programa MSA (*Microsatellite Analyser*) 4.05 (Dieringer & Schlötterer, 2003). Testes de comparação entre médias foram realizados no programa BioStat 4.0 (Ayres *et al.*, 2005). O número médio de alelos observados ( $A$ ) e o número de alelos exclusivos ( $A_E$ ), a probabilidade de identidade através dos cinco *loci* e as heterozigosidades observada e esperada, médias e total para a espécie, foram calculadas através do programa GENALEX 6.4 (Peakall & Smouse, 2006). Neste mesmo programa foi verificada a existência de genótipos iguais entre os indivíduos amostrados. No programa FSTAT foram calculados os coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) (Weir & Cockerham, 1984) e testada a diferenciação populacional com base nas frequências genotípicas. O nível de significância de testes múltiplos foi corrigido por coeficiente de Bonferroni sequencial (Rice, 1989) ao nível de 5%. Desvios em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram observados através de teste exato (Guo & Thompson, 1992) com o programa GENEPOP *on the web*, versão 4.0.10 (Raymond & Rousset, 1995). Para cada população, a combinação das probabilidades foi realizada pelo método de Fisher (1954), que confere o mesmo peso para todos os *loci*.

### *Estrutura populacional*

Duas distâncias genéticas, distância de Nei (*unbiased genetic distance*) ( $D_N$ ) (1978) e distância de Cavalli-Sforza & Edwards ( $D_C$ ) (1967), foram estimadas para observar o efeito de cada uma delas na estrutura populacional. De acordo com Chapuis & Estoup (2007), a  $D_C$  é menos sensível à presença de alelos nulos, que tendem a superestimar as distâncias genéticas. A  $D_N$  foi calculada entre todos os pares de populações utilizando o GENALEX 6.4. Uma matriz de distâncias genéticas  $D_C$  foi construída para cada par de populações utilizando a correção *INA* descrita pelos autores, utilizando o programa FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007). Neste programa, valores de  $F_{ST}$  foram calculados pelo método *ENA* (com intervalo de



confiança baseado em  $10^7$  permutações) para cada par de populações com base nas estimativas alélicas e genótípicas corrigidas para alelos nulos pelo algoritmo de Dempster *et al.* (1977). As duas matrizes de distâncias genéticas ( $D_N$  e  $D_C$ ) foram utilizadas para a construção de um dendrograma com o algoritmo *neighbor-joining* utilizando o programa MEGA versão 5 (Tamura *et al.*, 2011). O suporte estatístico dos ramos foi calculado a partir do pacote Consense do programa PHILIP (Felsenstein, 1993). O programa GENALEX foi utilizado para realizar uma análise de coordenadas principais (PCO) com base nos valores de  $F_{ST}$  calculados para os dados originais de frequências alélicas e genótípicas.

Para testar a hipótese de isolamento por distância, os valores de  $F_{ST}$  [ $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ] par a par calculados para os dados originais foram comparados ao Ln das distâncias geográficas através do teste de Mantel (Slatkin, 1995), utilizando o programa GENALEX. Os dados originais (não corrigidos para alelos nulos) também foram utilizados na Análise de Variância Molecular (AMOVA). Três diferentes AMOVAs para estimar a diferenciação populacional em  $\Phi_{PT}$  foram realizadas com 1000 permutações. O  $\Phi_{PT}$  foi escolhido, ao invés do  $R_{ST}$  (comumente utilizado em análises de microssatélites), devido à característica dos tamanhos dos alelos, que não seguem o modelo de mutação por passos (*step-wise mutation*). Uma AMOVA foi realizada para avaliar a divisão da diversidade genética total entre as populações e dentro delas. A segunda testou o cânion do Travessão e o vale da Serra do Lobo como barreiras ao fluxo gênico, agrupando as populações em três regiões (I, II e III; Tabela 2.1). Para a terceira AMOVA, as populações foram agrupadas de acordo com os agrupamentos genéticos resultantes da análise Bayesiana (ver abaixo).

Uma análise Bayesiana foi realizada para inferir o número de agrupamentos genéticos nas populações amostradas utilizando o programa STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). O número de agrupamentos presumidos ( $K$ ) foi extraído de  $K=1$  a  $K=9$ , e 10 corridas independentes foram feitas para cada valor de  $K$ . Cada corrida foi realizada para 500.000 interações de Cadeia de Markov de Monte Carlo com um *burn-in* inicial de 100.000 interações, com *admixture model* e frequências alélicas independentes. Para inferir o número de agrupamentos (populações), foi calculada a média de cada valor de probabilidade de  $K$ , logaritmo neperiano da probabilidade [ $\ln P(D)$ ], através de todas as corridas como sugerido por Pritchard *et al.* (2000) e a estatística  $\Delta K$  de acordo com Evanno *et al.* (2005).

Para avaliar desvios em relação ao equilíbrio mutação-deriva que podem indicar *bottleneck* recente nas populações foi utilizado o software BOTTLENECK 1.2 (Cornuet &

Luikart, 1996). Três modelos diferentes de evolução de microssatélites, foram utilizados, modelo de alelos infinitos (*infinite allele model – IAM*), modelo de mutação por passos (*step-wise mutation – SMM*) (Estoup *et al.*, 1995) e o modelo de duas fases (*two-phased model*) que é um modelo intermediário entre os dois anteriores adequado para a maioria dos conjuntos de dados de microssatélite (Di Rienzo *et al.*, 1994). Para o TPM, foram considerados 95 (Piry *et al.*, 1999), 80 (Weber & Wong, 1993) e 70% (Hollatz *et al.*, 2011) de mutações de passos únicos com uma variância entre múltiplos passos de 12, como sugerido pelos autores do programa (Piry *et al.*, 1999). A significância foi obtida através do teste de Wilcoxon, mais robusto para amostras com pequeno número de *loci* polimórficos (<20).

## RESULTADOS

### *Validação dos microssatélites e diversidade*

Todos os *loci* são polimórficos em todas as populações, e não foi encontrada evidência de desequilíbrio de ligação entre os *loci* (valores de *p* ajustados para 5% de significância). Nenhum agrupamento de genótipos foi identificado, indicando que não há amostras duplicadas ou amostragem não intencional de clones. Nos dados obtidos, a presença utilização do pico com uma repetição a menos que o alelo (*stuttering*) e de eliminação do maior alelo não foram identificadas. Somente o *locus* Vel02 não apresentou alelos nulos (Tabela 2.2). Nos outros *loci*, a frequência de alelos nulos estimada variou entre 0,17 (Vel03) a 0,26 (Vel05). O *locus* Vel02 apresentou a maior  $H_0$  dentre os *loci* (0,601) (Tabela 2.2), chegando a ser fixada na população AP (Apêndice 1, Tabela A1.1). Para verificar a influência do *locus* Vel02, alguns parâmetros foram recalculados sem os valores desse *locus* e a heterozigosidade observada foi de 0,393. Nenhum dos *loci* analisados estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg com excesso de homozigotos.

Utilizando os cinco *loci* genotipados, os parâmetros avaliados apresentaram uma diversidade genética moderada a alta. Todas as populações apresentaram alelos exclusivos, variando de um (SE) a seis (CP). A maior probabilidade de identidade (PI) entre todos os cinco *loci* foi encontrada para a população ES ( $7,5 \times 10^{-4}$ ) e a menor para a população CP ( $5,1 \times 10^{-6}$ ) (Tabela 2.3) indicando uma elevada capacidade de identificação dos indivíduos nas

populações e o uso potencial em estudos de parentesco. O número de alelos variou entre 32 e 43 e a riqueza alélica entre 6,47 e 7,79. A população CP apresentou a menor  $H_O$  ( $0,351 \pm 0,209$ ) e a AP a maior ( $0,535 \pm 0,241$ ). A  $H_E$  variou entre 0,680 ( $\pm 0,145$ ) para a população ES e 0,845 ( $\pm 0,059$ ) para CP, mas não há diferença significativa (no intervalo de 95%) entre a diversidade média das populações. Todas as populações apresentaram desvio significativo em relação ao EHW. O coeficiente de endogamia foi positivo e significativamente diferente de zero para todas as populações, variando entre 0,255 e 0,592. A espécie apresentou uma  $H_O$  de 0,440 e  $H_E$  de 0,836. O  $F_{IS}$  para *V. gigantea* é de 0,479 ( $p < 0,0001$ ).

### *Estrutura populacional*

O teste de diferenciação populacional com base nas frequências genótípicas foi significativo para todos os pares de populações, exceto para os pares NE-CP, NE-SB e SR-SB (todas as populações do Grupo II). Ambas as matrizes de distância genética, utilizando  $D_C$  ou  $D_N$ , forneceram dendrogramas com a mesma topologia geral nas análises de agrupamento utilizando o algoritmo *neighbor-joining*. Os grupos que apresentaram suporte estatístico (*bootstrap*) superior a 50% para  $D_C$  (Figura 2.2) também apresentaram suporte para  $D_N$ . O grupo contendo as populações ao norte do cânion do Travessão apresentou um suporte estatístico de 94% para  $D_C$  e de 59% para  $D_N$ . LE e ES foram agrupadas com elevado suporte para  $D_C$  e  $D_N$ , 71% e 81% respectivamente. A população NE foi agrupada com as populações do norte com 63,2% para  $D_C$  e 64,7% para  $D_N$ . As distâncias de Nei resultaram em um maior número de agrupamentos com suporte acima de 50%, agrupando AP e SE (66%) e CB e SR (51%) e em uma diferenciação dos tamanhos dos ramos, sendo SB a população mais diferenciada. Os valores da  $D_C$  variaram entre 0,37 (LE-ES) e 0,60 (CB-AP). Utilizando a  $D_N$ , a população SB se mostrou altamente diferenciada, com os valores entre ela e as demais populações ficando entre 0,49 (em relação a SR) e 0,92 (em relação a AP) (Tabela 2.4), sendo que a distância entre os demais pares de populações ficou entre 0,10 (LE-ES) e 0,70 (CB-AP). As diferenças nas frequências alélicas entre as populações influenciam no cálculo das distâncias de Nei e são refletidas nos tamanhos dos ramos do dendrograma. A elevada frequência dos alelos 148 (0,700) no *locus* Vel05 e 350 no *locus* Vel01, que são raros ou ausentes em outras populações, a baixa frequência do alelo 343 (0,167) no *locus* Vel01, o alelo mais frequente nas demais populações, além da presença de dois alelos exclusivos (142

e 146 no *locus* Vel 04) com frequência superior a 5% (Apêndice 2) contribuem para a maior diferenciação da população SB pela  $D_N$ .

A análise de coordenadas principais (Figura 2.3) foi parcialmente concordante com a estrutura observada na análise de agrupamento, devido à posição de NE mais próxima das populações do sul. Os dois primeiros eixos explicaram 60,52% da variação (eixo 1 = 38,69% e eixo 2 = 21,83%). No primeiro eixo podemos observar uma separação entre as populações ao norte e ao sul do Vale do Travessão, com a população NE em posição intermediária, situando-se próxima à origem do gráfico. O teste de Mantel apresentou uma correlação positiva ( $r=0,439$ ;  $p=0,01$ ) entre o  $F_{ST}$  linearizado e a matriz de distâncias geográficas entre todos os pares de populações (Tabela 2.5). O resultado da AMOVA para dois níveis hierárquicos revelou que 90% da variação está dentro das populações ( $\Phi_{PT}=0,10$ ). Quando realizada separando-se as populações em três grupos geográficos, 5% da variação foi observada entre os grupos e 7% entre populações dentro dos grupos, os mesmos valores encontrados quando comparados os grupos obtidos na análise Bayesiana (Tabela 2.6).

Os valores de  $\ln P(D)$  e  $\Delta K$  na análise Bayesiana indicaram a ocorrência de dois agrupamentos genéticos, um deles contendo as populações localizadas ao norte do cânion do Travessão e o outro as populações ao sul (Figura 2.4). A população NE apresentou um perfil misto entre os dois agrupamentos. Dos seus 18 indivíduos, 10 apresentaram probabilidade posterior de pertencerem ao agrupamento genético do sul e oito ao do norte (devido a este resultado, a divisão das populações na AMOVA em dois grupos considerou esta população como parte do grupo sul). Dentro do grupo genético que contém as populações do norte, apenas um indivíduo (população LE) apresentou probabilidade posterior acima de 50% de pertencer ao agrupamento do sul. No agrupamento do sul, 3 indivíduos apresentaram probabilidade posterior acima de 50% de pertencer ao grupo do norte (populações CP e SB) (Figura 2.4C).

Os três modelos evolutivos IAM, SMM e TPM apontaram para a população CP ( $p<0,02$ ) um excesso de heterozigiosidade, em relação ao esperado sob o equilíbrio mutação-deriva, que é compatível com a ocorrência de um *bottleneck* recente (há menos de 0,2 a 4 vezes o tamanho populacional efetivo em gerações) e severo. Um excesso de heterozigiosidade foi identificado apenas pelo IAM na população SR. Esses resultados foram obtidos para 95, 80 e 70% de mutações de passos únicos para TPM. Dois modelos SMM e TPM identificaram uma redução significativa ( $p<0,04$ ) da heterozigiosidade esperado nas populações ES e SE

para 95 e 80% de passos únicos. A redução da heterozigosidade indica uma expansão do tamanho populacional efetivo.

**Tabela 2.1.** Populações de *Vellozia gigantea* ocorrentes na Serra do Cipó, Cadeia do Espinhaço, estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil. Grupo = grupo geográfico definido na presença de possíveis barreiras geográficas ao fluxo gênico (ver Metodologia).

<b>Município</b>	<b>Localidade</b>	<b>Código</b>	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Coordenada geográfica</b>
Morro do Pilar	Alto Palácio	AP	I	20	S 19°14'52,19"/ W 43°33'42,19"
Morro do Pilar	Leste da estrutura	LE	I	15	S 19°16'25,7"/ W 43°28'42,19"
Morro do Pilar	Salitreiro (Estrutura)	ES	I	20	S 19°16'37,9"/ W 43°33'42,19"
Morro do Pilar	Sul da estrutura	SE	I	20	S 19°18'6,0"/ W 43°28'42,19"
Itambé do Mato Dentro	Nascente do Encantado	NE	II	19	S 19°22'49,44"/ W 43°28'42,19"
Itabira	Serra da Rita	SR	II	19	S 19°28'34,8"/ W 43°28'42,19"
Itabira	Serra do Boi	CP	II	24	S 19°29'40,5"/ W 43°33'42,19"
Itambé do Mato Dentro	Serra do Lobo	SB	II	19	S 19°25'46,27"/ W 43°28'42,19"
Itabira	Sítio dos Borges	CB	III	18	S 19°26'48"/ W 43°28'42,19"

**Tabela 2.2.** Caracterização dos cinco *loci* de microssatélites de *Vellozia gigantea* utilizados neste trabalho. N = número de indivíduos genotipados para cada *locus*; A = número de alelos por *locus*; Var = amplitude do tamanho dos alelos;  $H_O$  = heterozigosidade observada;  $H_E$  = heterozigosidade esperada.

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<b>Var</b>	$H_O$	$H_E$	<b>Freq. alelos nulos</b>
Vel01	154	19	300-353	0,319	0,637	0,19
Vel02	150	17	221-264	0,601	0,855	0
Vel03	153	20	132-180	0,462	0,852	0,17
Vel04	138	21	142-193	0,357	0,803	0,19
Vel05	154	13	137-158	0,433	0,731	0,26

Nenhum dos *locus* se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para a espécie.

**Tabela 2.3.** Diversidade genética em nove populações de *Vellozia gigantea* observada em cinco loci de microssatélites.  $A$  = número de alelos observados;  $A_E$  = número de alelos exclusivos;  $RA$  = riqueza alélica;  $PI$  = probabilidade de identidade acumulada com os cinco loci;  $H_O$  = heterozigosidade média observada;  $H_E$  = heterozigosidade média esperada;  $F_{IS}$  = coeficiente de endogamia. Para o nome das populações, veja a Tabela 2.1.

População	$A$	$A_E$	$RA$	$PI$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$
AP	39	3	7,03	$5,1 \times 10^{-5}$	0,535±0,241	0,790±0,074	0,329*
LE	35	2	6,89	$2,2 \times 10^{-4}$	0,492±0,204	0,713±0,174	0,319*
ES	39	4	6,47	$7,5 \times 10^{-4}$	0,510±0,180	0,680±0,145	0,255*
SE	40	1	7,02	$2,1 \times 10^{-4}$	0,445±0,131	0,739±0,118	0,404*
NE	42	4	7,75	$3,9 \times 10^{-5}$	0,393±0,106	0,775±0,135	0,500*
SR	38	2	7,04	$2,3 \times 10^{-5}$	0,365±0,060	0,823±0,026	0,565*
CP	43	6	7,79	$5,1 \times 10^{-6}$	0,351±0,209	0,845±0,059	0,592*
SB	37	3	7,08	$2,2 \times 10^{-5}$	0,402±0,185	0,790±0,156	0,500*
CB	32	4	6,69	$3,0 \times 10^{-4}$	0,418±0,117	0,724±0,124	0,433*
Média	38,33		6,62		0,435 (0,027)	0,764 (0,020)	
espécie				$5,5 \times 10^{-8}$	0,440 (0,050)	0,836 (0,043)	0,479*

\*Desvios significativos em relação ao EHW ( $P < 0,001$ ); entre parênteses o erro padrão ( $EP = dp/\sqrt{n}$ )



**Tabela 2.4.** Matriz de distâncias genéticas  $D_N$  (Ney, 1978) (abaixo da diagonal) e  $D_C$  (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) (acima da diagonal) entre as nove populações de *Vellozia gigantea* ocorrentes na Serra do Cipó, Sudeste do Brasil, baseadas em cinco loci de microssatélites. Para o nome das populações, veja a Tabela 2.1.

<b>Populações</b>	<b>AP</b>	<b>LE</b>	<b>ES</b>	<b>SE</b>	<b>NE</b>	<b>SR</b>	<b>CP</b>	<b>SB</b>	<b>CB</b>
AP	-	0,50	0,48	0,49	0,47	0,57	0,53	0,58	0,60
LE	0,32	-	0,39	0,43	0,48	0,57	0,52	0,57	0,51
ES	0,34	0,10	-	0,46	0,52	0,56	0,56	0,56	0,57
SE	0,15	0,21	0,24	-	0,45	0,53	0,49	0,55	0,54
NE	0,15	0,32	0,31	0,26	-	0,42	0,38	0,46	0,43
SR	0,69	0,62	0,60	0,64	0,37	-	0,37	0,43	0,42
CP	0,36	0,37	0,46	0,32	0,17	0,17	-	0,46	0,44
SB	0,92	0,73	0,74	0,91	0,54	0,49	0,55	-	0,46
CB	0,70	0,36	0,46	0,59	0,41	0,23	0,26	0,72	-

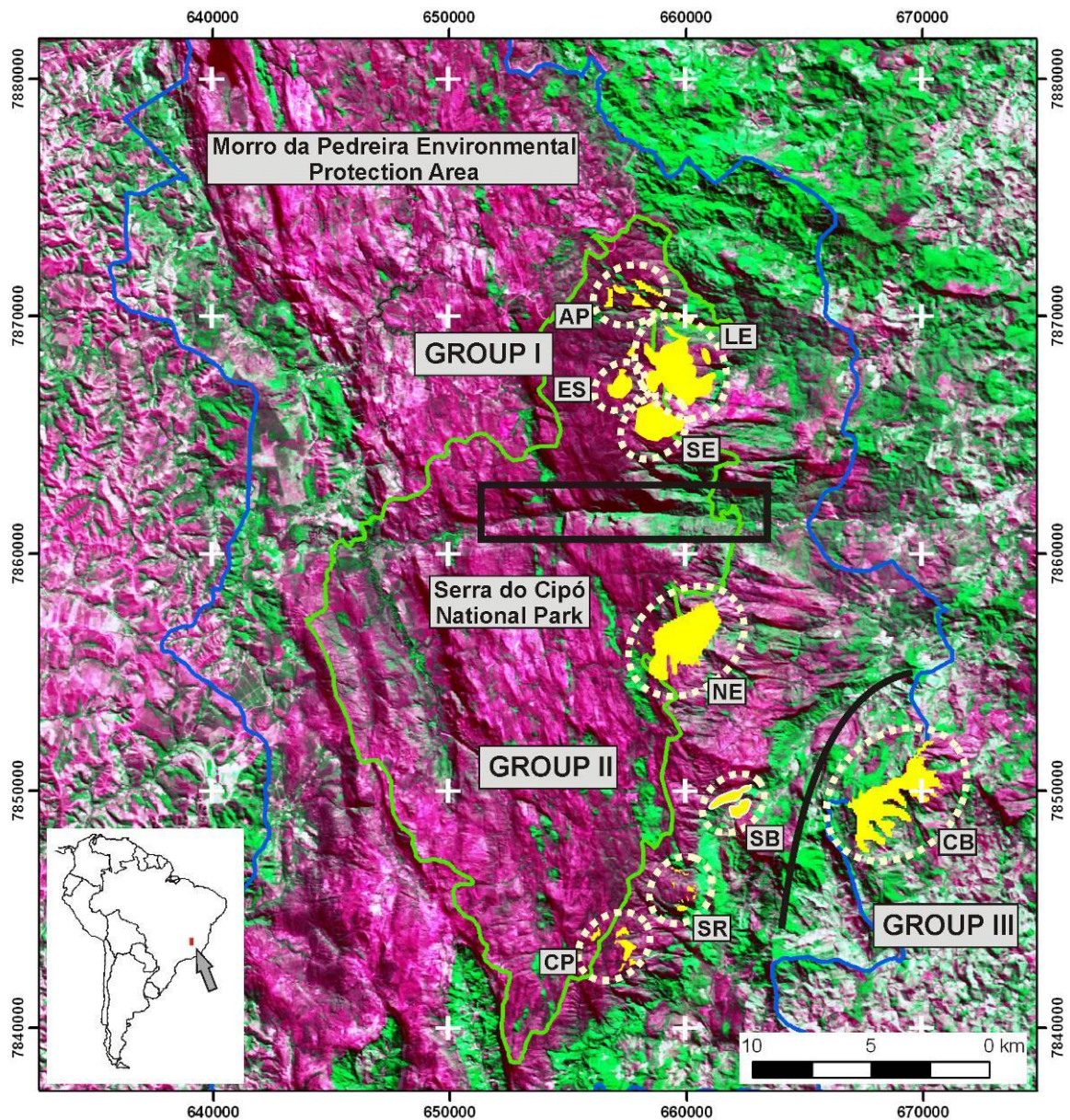
**Tabela 2.5.** Matriz de  $F_{ST}$  linearizado [ $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ ] (abaixo da diagonal), baseado em cinco *loci* de microssatélites, e distância geográfica em Km (acima da diagonal) entre as nove populações de *Vellozia gigantea* ocorrentes na Serra do Cipó, Sudeste do Brasil. Para o nome das populações, veja a Tabela 2.1.

<b>Populações</b>	<b>AP</b>	<b>LE</b>	<b>ES</b>	<b>SE</b>	<b>NE</b>	<b>SR</b>	<b>CP</b>	<b>SB</b>	<b>CB</b>
AP	-	3,48	3,42	6,9	14,89	25,62	27,33	21,53	24,64
LE	0,073	-	1,09	3,39	11,79	21,11	24,44	18,1	21,07
ES	0,099	0,029	-	3,61	11,49	22,24	24,05	18,12	21,26
SE	0,032	0,051	0,080	-	8,73	19,3	21,46	14,87	17,71
NE	0,025	0,069	0,093	0,050	-	10,76	12,73	7,18	11,84
SR	0,096	0,115	0,143	0,111	0,056	-	3,82	5,34	8,89
CP	0,049	0,069	0,113	0,058	0,021	0,013	-	8,83	12,69
SB	0,137	0,150	0,183	0,162	0,090	0,071	0,072	-	5,65
CB	0,133	0,080	0,134	0,113	0,068	0,055	0,051	0,125	-

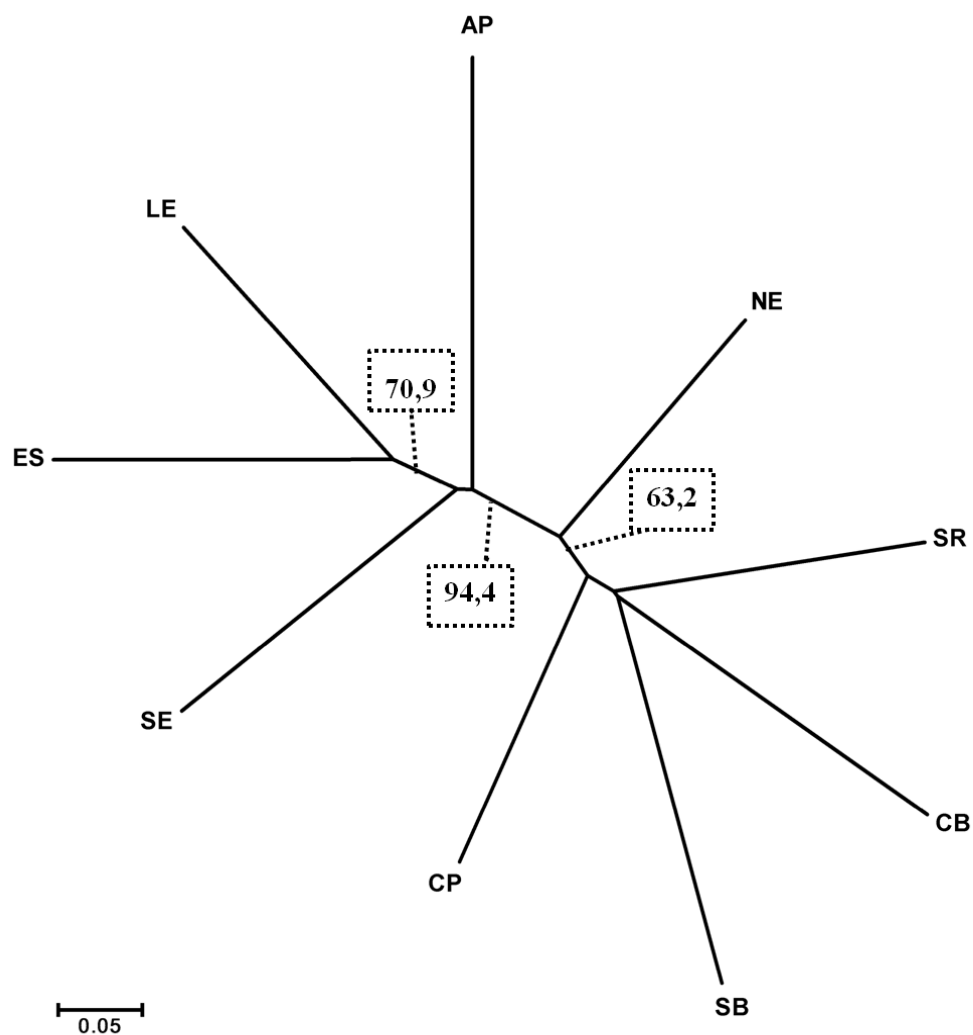
**Tabela 2.6.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para diferentes níveis hierárquicos de nove populações de *Vellozia gigantea* ocorrentes na Cadeia do Espinhaço, estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil, baseado em cinco *loci* de microssatélites.

Fonte de variação	<i>d.f.</i>	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Variância total (%)	<i>p</i>
<i>Vellozia gigantea</i>					
Entre populações	8	136,792	0,656	10%	0,001
Dentro das populações	147	845,951	5,755	90%	0,001
Três grupos geográficos (I, II e III)					
Entre grupos	1	38,583	0,314	5%	0,001
Entre populações	7	98,210	0,480	7%	0,001
Dentro das populações	147	845,951	5,755	88%	0,001
Dois grupos geográficos, de acordo com a análise Bayesiana (I e II+III)					
Entre grupos	2	55,245	0,311	5%	0,001
Entre populações	6	81,547	0,450	7%	0,001
Dentro das populações	147	845,951	5,755	88%	0,001

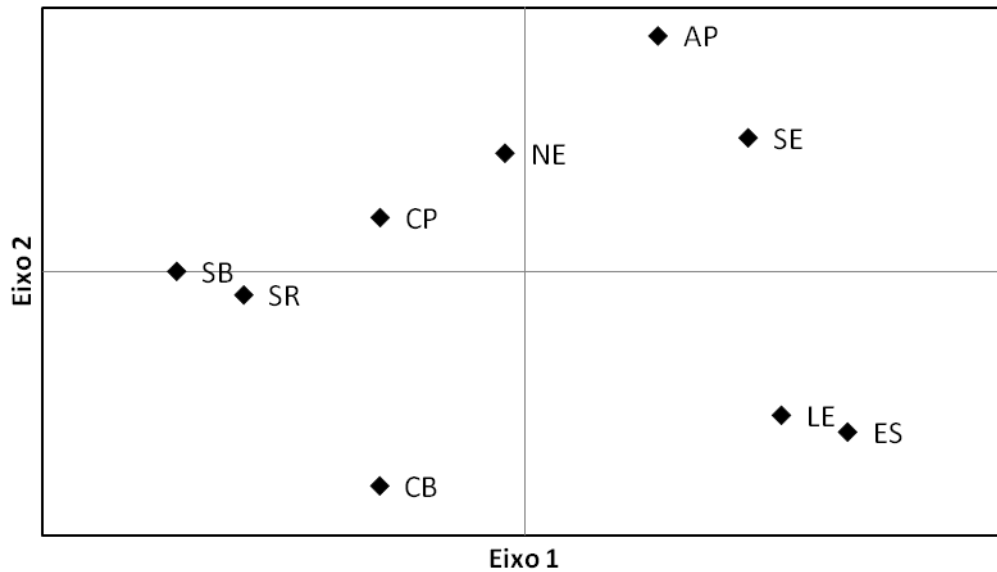
Para a descrição dos grupos geográficos veja a metodologia e Tabela 2.1.



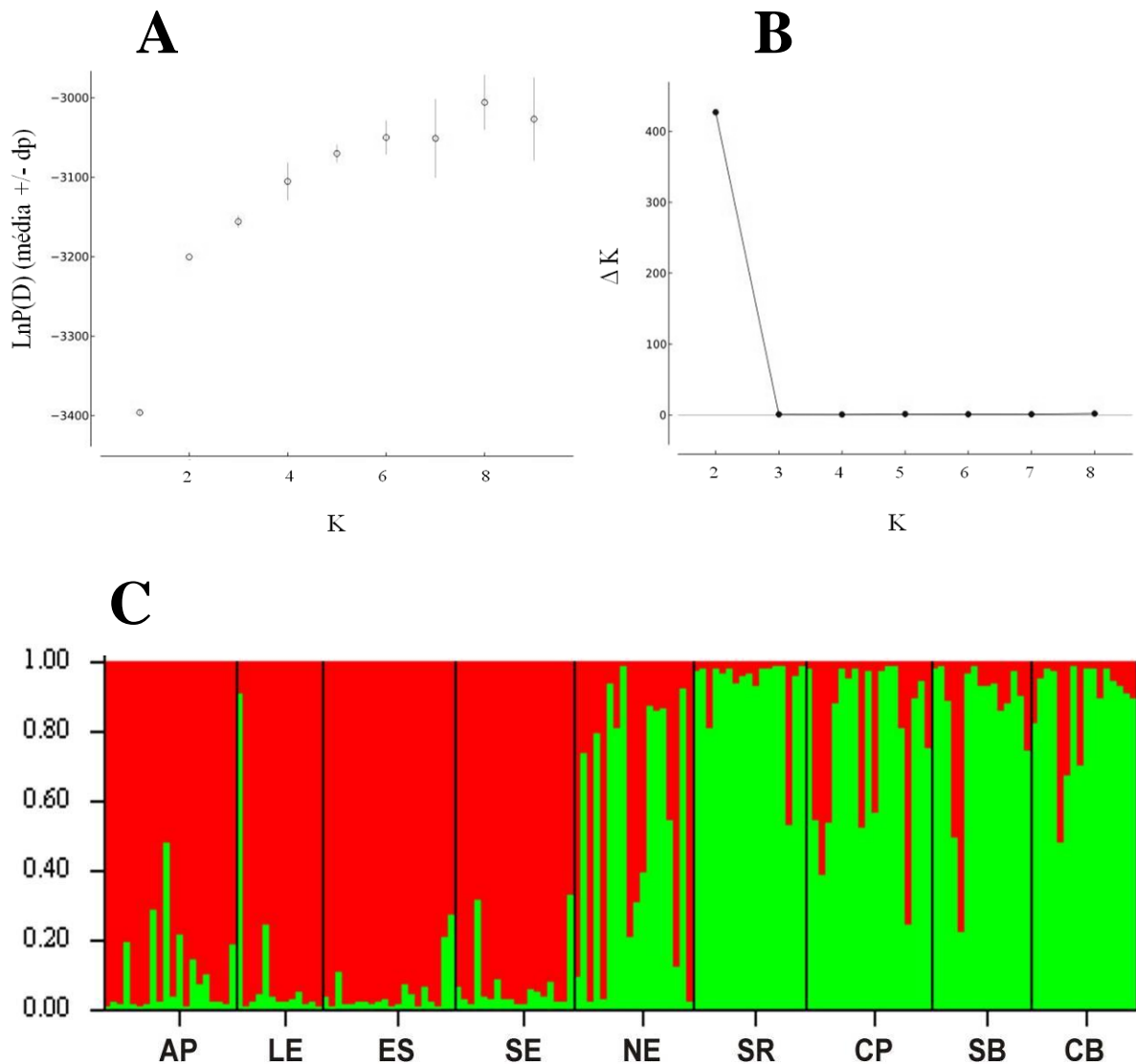
**Figura 2.1.** Distribuição geográfica das populações de *Vellozia gigantea* na região da Serra do Cipó, Cadeia do Espinhaço, Sudeste do Brasil. As populações são indicadas pelas manchas amarelas dentro dos círculos pontilhados. O retângulo em preto (no centro da figura) destaca o cânion do Travessão e o arco em preto (no canto inferior direito) o vale da Serra do Lobo. A delimitação interna (em verde) mostra os limites do Parque Nacional da Serra do Cipó e a delimitação externa (em azul) os limites da APA Morro da Pedreira. Para o nome das populações, veja a Tabela 2.1. Reproduzido de Lousada *et al.* (2011), com autorização dos autores.



**Figura 2.2.** Dendrograma mostrando as relações entre nove populações de *Vellozia gigantea*, utilizando neighbor-joining como algoritmo de agrupamento, construído a partir da matriz de distância genética par-a-par de Cavallia-Sforza & Edwards (1967), baseada em cinco *loci* microsatélites. Os valores indicam os resultados de *bootstrap* com suporte acima de 50%. Para o nome das populações, veja a Tabela 2.1.



**Figura 2.3.** Representação dos escores da análise de coordenadas principais (PCO) de nove populações de *Vellozia gigantea* ocorrentes nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço no estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil, a partir da matriz de distâncias genéticas ( $F_{ST}$  para-a-par) baseada em cinco *loci* de microssatélites. Variação acumulada nos dois primeiros eixos = 60,52% (Eixo 1 = 38,69% e Eixo 2 = 21,83%). Para o nome das populações, veja a Tabela 2.1.



**Figura 2.4.** Análise Bayesiana de 156 indivíduos de *Vellozia gigantea* ocorrentes nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço no estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil, baseada em cinco *loci* de microsatélites. **A.** Gráfico da média  $\pm$  o desvio padrão de LnP(D) para 10 corridas. **B.** Gráfico de  $\Delta K$ . **C.** Representação gráfica dos diferentes agrupamentos genéticos para  $K=2$ , com a probabilidade posterior de cada indivíduo pertencer a cada um dos grupos. Para visualização, as populações estão separadas por barras verticais. Para o nome das populações, veja a Tabela 2.1.

## DISCUSSÃO

### *Validação dos microssatélites*

Entre os cinco *loci* analisados, apenas Vel02 não apresentou alelos nulos. Entretanto, a ausência de excesso de genótipos homozigotos na maior parte das classes de tamanho de alelos (van Oosterhout *et al.*, 2004) pode apenas refletir a sua ligação a uma região codificadora próxima (Ellegren, 2004) sob efeito de seleção, visto que este *locus* apresentou uma elevada heterozigosidade, chegando a ser fixada na população AP (Apêndice 1, Tabela A1.1). Para verificar o efeito de Vel02 na heterozigosidade,  $H_O$  e  $H_E$  foram calculados excluindo este *locus*. O resultado foi uma redução ainda maior da heterozigosidade observada (de 0,440 para 0,393), sendo que a heterozigosidade esperada sob EHW e o coeficiente de endogamia permaneceram praticamente inalterados (0,823 e 0,476 respectivamente), além de manter o excesso significativo de homozigotos em relação ao EHW, justificando a inclusão deste *locus* no restante das análises. Dois resultados obtidos descartam a influência das superestimativas de  $F_{ST}$  e das distâncias genéticas resultantes da presença de alelos nulos (Chapuis & Estoup, 2007), a manutenção da estrutura geral do dendrograma por algoritmo de *neighbor-joining* utilizando as duas distâncias genéticas e a manutenção das relações entre as populações na PCO (dados não mostrados) utilizando os valores  $F_{ST}$  entre pares de populações obtidos após correção das frequências genótípicas para alelos nulos (Chapuis & Estoup, 2007). A partir desses dados, os marcadores desenvolvidos podem ser utilizados com confiança para as demais análises de variabilidade e estruturação em *V. gigantea*.

Um dos principais problemas nas análises de microssatélites é a presença de alelos nulos (Dewoody *et al.*, 2006) gerados por mutações nos sítios de ligação dos *primers* que impedem a amplificação. Nos *loci* onde ocorrem, os alelos nulos podem levar a uma redução da heterozigosidade observada em relação à heterozigosidade esperada sob o EHW e a um excesso de homozigotos em todas as classes de tamanho dos alelos. Porém, a redução observada não pode ser distinguida da redução indicativa de endogamia quando as populações não estão no equilíbrio (van Oosterhout *et al.*, 2006). Uma indicação de que o desvio em relação ao EHW se deve a eventos demográficos ou a características reprodutivas e não à presença de alelos nulos é que os últimos tendem a afetar apenas alguns *loci*, enquanto os primeiros levam a um excesso de homozigotos em todos os *loci* (Dewoody *et al.*, 2006).



Os procedimentos de validação dos marcadores de microsatélite desenvolvidos neste trabalho comprovam a confiabilidade dos resultados obtidos com esses marcadores na avaliação da diversidade e estruturação genética de *V. gigantea*.

#### *Diversidade e estruturação populacional*

*Vellozia gigantea* apresentou uma diversidade genética moderada a alta, com a heterozigosidade esperada semelhante à encontrada para *V. epidendroides* (Franceschinelli *et al.*, 2006), espécie perene e autoincompatível mas com distribuição mais ampla, utilizando outro marcador codominante (aloenzimas). A diversidade encontrada foi um pouco superior à descrita para *V. compacta* ( $H_E=0,235$ ; ISSR) (Lousada, 2010), também de distribuição mais ampla, considerando a diferença dos marcadores utilizados (Nybom, 2004). Uma diversidade genética elevada foi relatada para outras espécies endêmicas (Arakaki *et al.*, 2010; Palma-Silva *et al.*, 2009), incluindo espécies dos campos rupestres (Borba *et al.*, 2001; Cavallari *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2011). Contudo, a maior parte das espécies endêmicas apresentam uma diversidade menor que suas espécies congênicas de distribuição mais ampla (Gitzendanner & Soltis, 2000). O excesso de homozigotos em relação ao esperado sob EHW e o elevado coeficiente de endogamia encontrado em todas as populações indica a ocorrência de estruturação intrapopulacional, ou seja, que a variabilidade não é distribuída ao acaso. Essa estruturação é provavelmente um reflexo da dispersão restrita das sementes como descrito para outras espécies do gênero *Vellozia* (Franceschinelli *et al.*, 2006). A formação de grupos de indivíduos aparentados resulta em endogamia devido ao cruzamento entre indivíduos muito proximamente relacionados.

O valor observado para a heterozigosidade esperada em *V. gigantea* foi aproximadamente três vezes maior que o encontrado para a espécie por Lousada *et al.* (2011) utilizando um marcador dominante (ISSR), uma proporção que está de acordo com a relação descrita por Nybom (2004) entre os dois tipos de marcadores para diversidades semelhantes. A população ES apresentou a menor diversidade genética, o oposto do que foi encontrado utilizando marcadores ISSR (Lousada *et al.*, 2011). Contudo, para marcadores microsatélites não houve diferença significativa entre as estimativas de diversidade de cada população. A ausência de relação entre as menores populações e as menores diversidades, indicam que a deriva genética não foi fundamental na determinação da estrutura genética observada (Elstrand & Elam, 1993). Microsatélites e ISSR identificaram que a maior parte da variação

(90% e 72% respectivamente) está distribuída dentro das populações. Valores iguais ou maiores de diversidade interpopulacional são esperados para marcadores dominantes em relação aos microssatélites (Nybom, 2004). Uma moderada diferenciação interpopulacional também foi encontrada para outras espécies raras, de distribuição disjunta e de reprodução cruzada (Clark-Tapia & Molina-Freaner, 2003; Cruz, *et al.*, 2011). É importante ressaltar que devido ao elevado tempo de vida estimado para os indivíduos (Alves, 1994), a estrutura genética observada pode não corresponder à estrutura atual. Uma fragmentação da distribuição pode levar um grande número de gerações para que sejam observadas alterações na heterozigosidade (Frankham *et al.* 2002). Para isso seria necessário um estudo comparando a estruturação entre adultos e sementes.

Os dois grupos genéticos bem definidos observados através da análise Bayesiana apontam o Vale do Travessão como uma barreira parcial ao fluxo gênico na espécie. Esse resultado foi congruente com a análise de coordenadas principais e com a análise de agrupamento utilizando distâncias genéticas de Cavalli-Sforza & Edwards ou distâncias de Nei. A posição geneticamente intermediária da população NE entre os dois grupos está de acordo com a sua posição geográfica. Segundo os resultados obtidos, o Vale da Serra do Lobo não representa uma barreira geográfica. Esses resultados confirmam a indicação sugerida por marcadores dominantes para a espécie (Lousada *et al.* 2011). Porém alternativamente, estes resultados podem refletir um gradiente norte-sul de estruturação da variabilidade, assim como observado para populações de *Vellozia hirsuta* na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais (Barbosa, 2011), mas mais fortemente evidenciado pela presença da barreira do cânion do Travessão. Mesmo com estruturação de variabilidade em forma de gradiente, descontinuidades geográficas formadas por depressões parecem ser importantes barreiras ao fluxo gênico em espécies de *Vellozia*, constituindo inclusive significativas quebras filogeográficas (Lousada, 2010; Barbosa, 2011).

A correlação positiva e significativa entre o  $F_{ST}$  linearizado e as distâncias geográficas parece refletir o reduzido fluxo gênico entre as populações ao norte e as ao sul do Vale do Travessão, uma vez que não há indicação de isolamento por distância entre as populações dentro de cada grupo (dados não mostrados). Resultado similar ( $r=0,474$ ) foi obtido para marcadores dominantes (Lousada *et al.*, 2011). O resultado das probabilidades posteriores dos indivíduos na análise Bayesiana indica que o fluxo gênico é maior a partir do Grupo geográfico I em direção ao Grupo II + III do que o fluxo em sentido contrário.

O número de alelos e a distribuição das frequências são resultados de um equilíbrio entre mutação e deriva genética. Quando há uma alteração recente do tamanho populacional, esse equilíbrio é desfeito e haverá uma diferença entre a heterozigosidade esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg e a esperada sob o equilíbrio mutação-deriva para o número de alelos observados em uma população de mesmo tamanho efetivo (Cornuet & Luikart, 1996). Uma redução severa do tamanho efetivo de uma população, *bottleneck*, leva a uma redução do número de alelos de forma mais rápida do que a redução da heterozigosidade e conseqüentemente a um excesso de heterozigosidade (Luikart & Cornuet, 1998). A relação entre a heterozigosidade e o número de alelos está relacionada com o modelo que descreve o processo mutacional envolvido. Sob o modelo de alelos infinitos (IAM), cada mutação gera um novo alelo enquanto pelo modelo de mutação por passos (SMM) cada mutação pode reduzir ou aumentar o tamanho de um alelo em uma unidade de repetição. O modelo de duas fases (TPM) é intermediário entre os anteriores pois considera que a maior parte das mutações ocorrem por passos únicos (SMM). Os microssatélites dinucleotídicos tendem a apresentar uma mistura entre mutações de passos únicos e de passos múltiplos (Di Rienzo *et al.*, 1994), enquanto os trinucleotídicos tendem a seguir o SMM (Shriver *et al.*, 1993). Além disso, o IAM tende a apontar excesso de heterozigosidade para os *loci* e o SMM deficiência de heterozigosidade, por isso, a identificação de alteração do tamanho populacional foi avaliado sob três modelos populacionais. A identificação de um excesso de heterozigosidade pelos três modelos mutacionais indica que a população CP sofreu uma grande redução do seu tamanho populacional efetivo, que pode ser devido a um evento de dispersão a longa distância ou vicariância. Um número maior de *loci* (no mínimo 10) seriam necessários para aumentar o poder estatístico de detecção de *bottleneck* recente e confirmar a redução da população SR pois o IAM tem maior tendência a apontar falsos *bottlenecks* em relação ao SMM (Luikart & Cornuet, 1998). A deficiência de heterozigosidade nas populações ES e SE indica um aumento do número de alelos que pode ser resultado da presença de imigrantes de uma população geneticamente diferente, embora essa deficiência não tenha sido apontada pelo IAM, mais conservador (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart & Cornuet, 1998), ou quando a proporção de mutações por passos únicos sob o modelo mutacional TPM foi de 70%.

A elevada diversidade encontrada em todas as populações de *V. gigantea* é congruente com uma distribuição histórica mais ampla apontada por dados de sequências de cloroplasto (Silva-Pereira *et al.*, dados não publicados). Se historicamente o Vale do Travessão não era

preponderante na formação de grupos geográficos, as análises de estruturação o apontam como uma barreira parcial ao fluxo gênico e responsável pela estrutura recente da espécie.

O presente trabalho juntamente com o estudo realizado por Lousada *et al.* (2011) fornecem uma ampla visão sobre a diversidade de *V. gigantea* e permitem a comparação entre os dois marcadores genéticos utilizados, microssatélites e ISSR. Através de marcadores dominantes, como o ISSR, RAPD e AFLP, não é possível distinguir indivíduos homocigotos e heterocigotos. Mas apesar dessa limitação, o ISSR apresenta vantagens em relação aos microssatélites quanto ao tempo de desenvolvimento e obtenção dos resultados. Os dois trabalhos abrangeram todas as populações conhecidas para *V. gigantea* e mostraram que, sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma da espécie e em um período reduzido, o ISSR é eficiente na avaliação da diversidade genética total e da partição da variabilidade na espécie. Esse marcador também foi capaz de indicar barreiras geográficas ao fluxo gênico. Embora a biologia de *V. gigantea* seja pouco conhecida, os dados obtidos com ISSR são congruentes com as características biológicas descritas para outras espécies do gênero (autoincompatíveis, perenes, com dispersão baro/anemocórica de sementes) e afirmam sua eficácia para estudos preliminares especialmente de espécies silvestres, cujo conhecimento a respeito da biologia, da história e do genoma é restrito. Os microssatélites, por outro lado, fornecem informações importantes para a determinação da estruturação inter-populacional seja por análises de agrupamento ou de atribuição. A identificação dos indivíduos heterocigotos possibilita a verificação de fatores que alteram o cruzamento aleatório dentro das populações. Por serem codominantes e altamente polimórficos, os microssatélites também permitem avaliar a ocorrência de eventos demográficos que alteram a diversidade das populações como redução (*bottlenecks*) ou aumento do tamanho populacional e migração bem como estimar o tamanho populacional efetivo e a taxa de migração. Essas informações são importantes para entender os fatores biológicos ou físicos que regem a diversidade da espécie e assim elaborar estratégias adequadas de preservação.

#### *Implicações para conservação*

Devido à baixa diferenciação entre populações, com a maior parte da variabilidade localizada dentro de cada população (todas com níveis elevados de variabilidade), planos de conservação *in situ* devem priorizar a proteção de populações com maior número de indivíduos. Assim, a preservação das populações LE, NE e CB é importante na manutenção

da diversidade da espécie pois consistem nas populações com maior número de indivíduos e representam os principais agrupamentos genéticos. Além disso, NE reúne as características dos dois grupos e parece ser fundamental para a manutenção da troca de informação genética entre eles. A população CP, de tamanho reduzido, também merece atenção especial pois contém o maior número de alelos exclusivos e apresentou evidência de *bottleneck* recente, indicando que esta constitui uma unidade evolutiva distinta. Seu tamanho populacional efetivo (histórico) reduzido pelo *bottleneck* a torna ainda mais sensível à degradação antrópica atual (Cornuet & Luikart, 1996). A maior parte da área ocupada por cada uma das populações citadas está localizada fora dos limites do Parque Nacional da Serra do Cipó, sendo que CB está localizada quase totalmente fora da APA Morro da Pedreira e próxima a uma mineração. Lousada *et al.* (2011) ressaltam que CB é a única que não está incluída no Plano de Manejo da Serra do Cipó aprovado em 2009 e que a preservação de *Vellozia gigantea* está intimamente relacionada à preservação da endêmica e diversa flora dos campos rupestres.

## LITERATURA CITADA

- Alves, R. J. V. 1994. Morphological age-determination and longevity in some *Vellozia* populations in Brazil. *Folia Geobotanica & Fitotaxonomica* 29: 55-59.
- Arakaki, M., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Speranza, P. R. 2010. Characterization of polymorphic microsatellite loci in *Haageocereus* (Trichocereae, Cactaceae). *American Journal of Botany* e17–e19.
- Ayres, M., Ayres-Jr, M., Ayres, D. L., Santos, A. S. 2005. BioEstat 4.0 Aplicações estatísticas nas áreas da ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Marmirauá, Belém.
- Barbosa, A. R. 2011. Biosistemática do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada em análise filogeográfica e genética de populações. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Barros, F. & Lourenço, R. A. 2004. Synopsis of the Brazilian orchid genus *Grobya*, with the description of two new species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145: 119-127.
- Borba, E. L., Felix, J. M., Solferini, V. N. & Semir, J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419-428.
- Borba, E. L., Funch, R. R., Ribeiro, P. L., Smidt, E. C. & Silva-Pereira, V. 2007. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 267: 129-146.
- Brookfield, J. F. Y., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5: 453-455.
- Carlsson, J. 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99: 616-623.
- Cavallari, M. M., Forzza, R. C., Veasey, E. A., Zucchi, M. I. & Oliveira, G. C. X. 2006. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation* 15: 4357-4373.
- Cavalli-Sforza, L. L & Edwards, A. W. F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *The American Journal of Human Genetics* 19: 233-257.

- Chapuis, M. P., & Estoup, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 621-631.
- Clark-Tapia, R. & Freaner-Molina, F. 2003. The genetic structure of a columnar cactus with disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. *Heredity* 90: 443-450.
- Collevatti, R. G., Brondani, R. V. & Grattapaglia, D. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity* 88: 419-428.
- Conceição, A. S., Queiroz, L. P., Lambert, S. M., Pereira, A. C. S., Borba, E. L. 2008. Biosystematics of *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* 270: 183-207.
- Cornuet, J.-M. & Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Cruz, D. T., Selbah-Schnadelbach, A., Lambert, S. M., Ribeiro, P. L., Borba, E. L. 2011. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongate* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the *campo rupestre* vegetation in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 294: 87-98.
- Dempster, A. P., Laird, N. M., Rubin, D. B. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society B* 39:1-38.
- Dewoody, J., Nason, J. D., Hipkins, V. D. 2006. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Molecular Ecology Notes* 6: 951-957.
- Dieringer, D. & Schlötterer, C. 2003. Microsatellite analyzer (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167-169.
- Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M., Freimer, N. B. 1994. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 3166-3170.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- El Mousadik, A. & Petit, R. J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic of Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 832-839.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews* 5: 435-445.

- Ellstrand, N. C. & Elam, D. R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet. 1995. Microsatellite variation in honey Bee (*Apis mellifera* L.) Populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics Society of America* 140: 679-695.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics Online* 1:47–50.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fisher, R, 1954. Statistical Methods for Research Workers. 12 ed. Oliver & Boyd, Edinburgh.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília.
- Felsenstein, J. 1993. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c*. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Franceschinelli, E. V., Jacobi, C. M., Drummond, M. G. & Resende, M. F. S. 2006. The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Annals of Botany* 97: 585-592.
- Fundação Biodiversitas. 2005. Lista da flora brasileira ameaçada de extinção. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Brasil.
- Gitzendanner, M. A. & Soltis, P. S. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783-792.
- Giulietti A. M. & Pirani J. R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: P. E. Vanzolini & W. R. Heyer (eds.). Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 39–69.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malause, T., Revardel, E., Salin, F. & Petit, R. J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591-611.



- Gomes, V., Collevatti, R. G., Silveira, F. A. O. & Fernandes, G. W. 2004. The distribution of genetic variability in *Baccharis concinna* (Asteraceae), an endemic, dioecious and threatened shrub of rupestrian fields of Brazil. *Conservation Genetics* 5: 157-165.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Guo, S. W. & Thompson, E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Hamrick, J. L. & Godt, M. J. W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 351: 1291-1298.
- Jacobi, C. M. & del Sarto, M. C. L. 2007. Pollination of two species of *Vellozia* (Velloziaceae) from high-altitude quartzitic grasslands, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 325-333.
- Jesus, F. F., Solferini, V. N., Semir, J. & Prado, P. I. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 226: 59-68.
- Jesus, F. F., Abreu, A. G., Semir, J. & Solferini, V. N. 2009. Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 277: 187-196.
- Lambert, S. M., Borba, E. L., Machado, M. C. & Andrade, S. C. S. 2006. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. *Annals of Botany* 97: 389-403.
- Lousada, J. M. 2010. Genética da conservação de duas espécies de *Vellozia* (Velloziaceae), *V. gigantea* e *V. compacta*, endêmicas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Lousada, J. M., Borba, E. L., Ribeiro, K. T., Ribeiro, L. C. & Lovato, M. B. 2011. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with landscape in Espinhaço Range, southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* 139: 431-440.
- Luikart, G. & Cornuet, J-M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12: 228-237.

- Meirmans, P. G., Hedrick, P. W. 2011. Assessing population structure:  $F_{ST}$  and related measures. *Molecular Ecology Resources* 11: 5-18.
- Mello-Silva, R. & Menezes, N. L. 1999. Two new Brazilian Velloziaceae, *Vellozia auriculata* and *Vellozia gigantea*, and a key to related dracenoid species of *Vellozia*. *Novon* 9: 536-541.
- Mendonça, M. P. & Lins, L. V. 2000. Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção de Minas Gerais. Fundação Biodiversitas e Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, Belo Horizonte.
- Menezes, N. L., Mello-Silva, R. & Mayo, S. J. 1994. Cladistic analysis of the Velloziaceae. *Kew Bulletin* 49: 71-92.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13:1143–1155.
- Palma-Silva, C., Lexer, C., Paggi, C. M., Barbará, T., Bered, F., Bodanese-Zanettini, M. H. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503-512.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pereira, A. C. S., Borba, E. L. & Giulietti, A. M. 2007. Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 401-416.
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J. M. 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90: 502–503.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rapini, A., Ribeiro, P. L., Lambert, S. & Pirani, J. R. 2008. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 16-24.

- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Rice, W. R. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Ribeiro, L. C., Ribeiro, K. T., Madeira, J. A., Paiva, C. L. & Filippo, D. C. 2005. Riqueza e abundância de epífitas sobre canelas de ema gigantes (*Vellozia gigantea* N.L. Menezes e Mello-Silva) na Serra do Cipó (MG): três populações sob diferentes níveis de proteção. *VII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu-MG*.
- Ribeiro, P. L., Borba, E. L., Smidt, E. C., Lambert, S. M., Schnadelbach, A. S. & van den Berg, C. 2008. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution* 270: 109–137.
- Silva, R. M., Fernandes, G. W. & Lovato, M. B. 2007. Genetic variation in two *Chamaecrista* species (Leguminosae), one endangered and narrowly distributed and another widespread in the Serra do Espinhaço, Brazil. *Canadian Journal of Botany* 85: 629-636.
- Shriver, M. D., Jin, L., Chakraborty, R., Boerwinkle, E. 1993. VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model a computer simulation approach. *Genetics* 134: 983-993.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011 MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* doi: 10.1093/molbev/msr121.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535 – 538.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram desenvolvidos sete pares de *primers* para *loci* de microssatélites isolados de *Vellozia gigantea*. A utilidade destes marcadores em análises de variabilidade e na compreensão de fatores biológicos e demográficos que regulam a diversidade da espécie foi demonstrada através de diferentes análises utilizando cinco dos sete *loci*. Todos os marcadores caracterizados amplificaram em pelo menos uma das três espécies congênicas utilizadas nos testes preliminares, comprovando a conservação das regiões flanqueadoras dos microssatélites e indicando o uso potencialmente amplo destes marcadores dentro do gênero. Assim como os *primers*, as sequências de DNA genômico obtidas serão disponibilizadas publicamente e fazem parte do primeiro esforço de conhecimento do genoma de espécies de Velloziaceae. Informações importantes que servirão de base para outros estudos de genética de populações e taxonomia, dentre outros.

As bibliotecas genômicas primárias geralmente possibilitam o isolamento de microssatélites com um número maior de motivos de repetição diferentes em relação às enriquecidas, o que é interessante em estudos de espécies silvestres com pouca ou nenhuma informação quanto ao genoma. Contudo, o rendimento dessas bibliotecas quando comparadas às diferentes metodologias de enriquecimento para microssatélites é muito menor (Zane *et al.* 2002). A biblioteca genômica primária para *V. gigantea* apresentou um rendimento baixo (em termos de proporção de clones contendo microssatélites) embora dentro do esperado para plantas (Zane *et al.* 2002) e apenas um *locus* pôde ser utilizado para análises de variabilidade. Com a biblioteca primária, diferentes motivos de repetição foram encontrados, sendo TA o mais frequente, e inclusive um minissatélite (com três repetições de 10pb) foi identificado. Repetições de TA são as mais frequentes em plantas (Zane *et al.* 2002), mas a análise de fragmentos com base em microssatélites com esse motivo são dificultadas pela elevada mutação dos alelos durante as ampliações por PCR. O rendimento da biblioteca enriquecida também foi reduzido, talvez pela escolha inadequada das sondas, com motivos de repetição coincidentemente de baixa frequência na espécie, embora CT seja o segundo motivo de repetição com maior frequência em embriófitas (Tóth *et al.*, 2000). Dentre os microssatélites isolados com a biblioteca enriquecida, foram selecionados os simples e perfeitos devido à menor possibilidade de homoplasia quando as análises são baseadas no tamanho dos

fragmentos amplificados (Estoup *et al.* 1995; Guichoux *et al.* 2011) e devido ao pequeno tempo disponível para a caracterização dos marcadores. Novos *primers* podem ser desenhados para os demais *loci* encontrados uma vez que microssatélites imperfeitos e compostos são amplamente utilizados na literatura e parecem ser mais adequados para a detecção de expansão ou redução populacional por se adequarem melhor ao modelo de alelos infinitos (Cornuet *et al.* 1996).

Em geral, as plantas têm baixa frequência de microssatélites, o que parece se confirmar em *V. gigantea*. Mas outros fatores dificultaram o isolamento de microssatélites na espécie. As regiões flangeadoras são bastante repetitivas, com grandes sequências contendo uma proporção indesejada de GC (abaixo de 40% ou acima de 60%) o que impede a identificação de regiões adequadas ao desenho de *primers*. As análises das sequências geradas com as duas bibliotecas mostraram um grande número de sequências repetidas entre clones diferentes, apontando para uma elevada taxa de regiões repetitivas no genoma.

A associação entre microssatélites e *transposons* (Ellegren, 2004) foi indicada como sendo responsável por duplicações de sequências ao longo dos cromossomos e é comum em lepidópteros mas também tem sido descrita para outros animais (Megléczy *et al.*, 2007) e plantas (Li *et al.*, 2000; Tero *et al.*, 2006). Dentro dessas regiões, a conservação de pequenas sequências entre espécies foi utilizada para sugerir um novo marcador molecular. Como uma ou as duas regiões flangeadoras dos microssatélites foram identificadas como duplicadas, o desenho de *primers* com base nessas sequências pode gerar a amplificação de diferentes fragmentos ou a ausência de amplificação. A comparação entre sequências dos diferentes clones é trabalhosa, mas permite a eliminação de um grande número de regiões de microssatélites inadequadas ao desenho de *primers*. Porém, *primers* desenhados sobre sequências repetidas, não identificadas, pode explicar o grande número de regiões com amplificação de picos múltiplos ou os insucessos nas amplificações. Embora poucos microssatélites com boa amplificação tenham sido obtidos, eles se mostraram bastante polimórficos e eficientes na descrição da diversidade da espécie.

Com algumas ressalvas em relação às análises dos resultados, a transferência de *primers* entre espécies congênicas tem sido utilizada com bons resultados (Primmer *et al.*, 1996; Feres *et al.*, 2009). Como o polimorfismo de um determinado *locus* pode variar entre as espécies, os *locus* Vel07 monomórfico para *Vellozia gigantea* pode apresentar polimorfismo em outras espécies do gênero. Além disso, se uma baixa taxa de polimorfismo for encontrada

entre diferentes espécies, essa região pode ser útil na delimitação taxonômica dentro do gênero, sendo aplicável a taxonomia dos diversos complexos de espécie em *Vellozia* (Barbosa, 2011).

Utilizando oito indivíduos nos testes iniciais de variabilidade dos marcadores, foi encontrada uma variação de oito a 13 alelos por *locus*. Por ter sido caracterizado tardiamente, o *locus* Vel06 não foi utilizado na genotipagem dos indivíduos para as análises de diversidade. Dentre os cinco *loci* utilizados, o número de alelos praticamente dobrou (13 a 21 alelos por *locus*) quando a amostragem passou a ser pouco menos do que 20 vezes o número de indivíduos (138-154). O número médio de alelos por *locus* foi de 6,11 nos testes iniciais para 7,66 com o aumento da amostragem. Quanto maior o número de indivíduos maior a probabilidade de se amostrar alelos raros, consequentemente aumentando o número de alelos observados por *locus*. A pequena variação no número médio de alelos amostrados para cada *locus* indica que a amostragem abrangeu grande parte da variação dos marcadores utilizados.

Os resultados obtidos neste trabalho vêm complementar as informações a respeito da diversidade de *V. gigantea* fornecidos por marcadores dominantes, ISSR, e fazem parte de um projeto mais amplo que também tem empregado sequenciamento de regiões espaçadoras plastidiais para realização de análises filogeográficas. A junção destes conjuntos de dados possibilitarão a determinação de unidades evolutivas significativas na espécie, que será fundamental para elaboração de um plano de conservação e manejo para a mesma. Mas embora os dados moleculares forneçam indicações quanto às características biológicas da espécie (perene, autoincompatível, com dispersão restrita de sementes), novos estudos são necessários para entender a biologia reprodutiva da espécie. A floração irregular e indivíduos muito altos distribuídos em uma ampla área de afloramentos rochosos dificultam a realização de estudos de biologia floral para a espécie. Os microssatélites caracterizados neste trabalho podem ser utilizados em estudos de parentesco para estimativas diretas do fluxo gênico (por pólen ou sementes) e de tamanhos de vizinhanças genéticas que independem da observação do comportamento do polinizador.

Por ser codominante e altamente polimórfico, os microssatélites podem ser utilizados para avaliar a ocorrência de eventos demográficos recentes de redução ou expansão populacional. Nesta análise, a ocorrência de redução ou expansão do tamanho populacional efetivo é indicada com base no número de alelos observados e a na heterozigosidade esperada. Como o tamanho efetivo histórico e o nível de diversidade são geralmente desconhecidos,

este método é útil para detectar a ocorrência de *bottleneck* (Cornuet & Luikart, 1996) na ausência de dados históricos.

O tamanho populacional de acordo com a diversidade amostrada bem como o fluxo gênico entre populações ou grupos de populações podem ser estimados através de programas de amostragem de genealogias, que geram estimativas mais reais dos parâmetros populacionais (tamanho populacional efetivo e taxa de migração) que as estimativas realizadas com base em diferenciação populacional como o  $F_{ST}$  por exemplo (Kuhner *et al.*, 2008). Estas análises podem ser utilizadas para inferir a atuação de diferentes forças evolutivas sob as populações e informam o grau de suporte estatístico de suas inferências, estimativas importantes na avaliação da capacidade da descontinuidade geográfica em reduzir a troca de informação genética entre populações e entre grupo de populações (Vale do Travessão). A análise Bayesiana realizada poderá direcionar a escolha do modelo populacional a ser utilizado pois mostrou que há evidência suficiente de estruturação geográfica para justificar uma análise subpopulacional. Estas estimativas populacionais serão realizadas posteriormente com base na continuação dos estudos e análises já iniciados.

Este estudo abre a perspectiva de diferentes trabalhos principalmente dentro do gênero *Vellozia* com a disponibilização de *primers* e sequências que são ferramentas potenciais para aplicação em estudos de variabilidade e taxonomia. Além dos *loci* de microssatélites caracterizados neste trabalho, outros microssatélites foram isolados e podem ser utilizados em estudos de parentesco após o desenho de novos *primers*. Um maior número de *loci* reduz a probabilidade de identidade e reforçam as análises de parentesco. As primeiras informações quanto ao genoma de *Vellozia gigantea* devem direcionar as escolhas dos procedimentos técnicos de isolamento de microssatélites para outras espécies dentro da família, pois as características gerais devem ser conservadas entre espécies próximas. A comparação dos resultados experimentais obtidos com microssatélite e ISSR (Lousada *et al.* 2011) a partir da mesma amostragem contribui para a escolha do marcador a ser utilizado de acordo com os objetivos de cada estudo. As informações obtidas com microssatélites quanto à influência da distribuição disjunta das populações, no fluxo gênico (pólen e semente) e na estruturação da diversidade de *Vellozia gigantea*, podem ajudar a compreender a estruturação de outras espécies de distribuição restrita e fragmentada. Esses dados foram baseados em toda a distribuição geográfica da espécie e podem servir de base para avaliar e propor barreiras ao fluxo gênico em outras espécies da mesma região. Há ainda a perspectiva de estudo

combinando os dados de microssatélites com marcadores plastidiais. Juntos, esses marcadores são mais efetivos para detectar flutuações demográficas e ajudar a separar os efeitos do fluxo gênico por pólen daquele promovido pelas sementes na estruturação populacional recente (Palma-Silva *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.* 2010).



## BIBLIOGRAFIA GERAL

- Alves, R. J. V. 1994. Morphological age-determination and longevity in some *Vellozia* populations in Brazil. *Folia Geobotanica & Fitotaxonomica* 29: 55-59.
- Arakaki, M, Soltis, D. E., Soltis, P. S., Speranza, P. R. 2010. Characterization of polymorphic microsatellite loci in *Haageocereus* (Trichocereae, Cactaceae). *American Journal of Botany* e17–e19.
- Avarez-Buyllia, E. R. & Garay, A. A. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution* 48: 437-453.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.
- Ayres, M., Ayres-Jr, M., Ayres, D. L., Santos, A. S. 2005. BioEstat 4.0 Aplicações estatísticas nas áreas da ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Marmirauá, Belém.
- Azevedo, M. T. A., Borba, E. L., Semir, J. & Solferini, V. N. 2007. Very high genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 33-40.
- Bacles, C. F. E. & Ennos, R. A. 2008. Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape. *Heredity* 101: 368–380.
- Barbosa, A. R. 2011. Biosistemática do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada em análise filogeográfica e genética de populações. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Barros, F. & Lourenço, R. A. 2004. Synopsis of the Brazilian orchid genus *Grobya*, with the description of two new species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145: 119-127.
- Braga, A. C., Reis, A. M. M., Leoi, L. T., Pereira, R. W. & Collevatti, R. G. 2007. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology Notes* 7: 53-56.
- Borba, E. L., Felix, J. M., Solferini, V. N. & Semir, J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419-428.
- Borba, E. L., Funch, R. R., Ribeiro, P. L., Smidt, E. C. & Silva-Pereira, V. 2007. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis*

- sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 267: 129-146.
- Brookfield, J. F. Y., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5: 453-455.
- Butcher, P. A., Decroocq, S., Gray, Y. & Moran, G. F. 2000. Development, inheritance and cross-species amplification of microsatellite markeres from *Acacia mangium*. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1282-1290.
- Carlsson, J. 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99: 616-623.
- Cavallari, M. M., Forzza, R. C., Veasey, E. A., Zucchi, M. I. & Oliveira, G. C. X. 2006. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation* 15: 4357-4373.
- Cavalli-Sforza, L. L & Edwards, A. W. F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *The American Journal of Human Genetics* 19: 233-257.
- Chapuis, M. P., & Estoup, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 621-631.
- Clark-Tapia, R. & Freaner-Molina, F. 2003. The genetic structure of a columnar cactus with disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. *Heredity* 90: 443-450.
- Collevatti, R. G., Brondani, R. V. & Grattapaglia, D. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity* 88: 419-428.
- Collevatti, R. G., Grattapaglia, D. & Hay, J. D. 2001. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity* 86: 60-67.
- Collevatti, R. G., Rabelo, S. G. & Vieira, R. F. 2009. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany* 104: 655-664.
- Collevatti, R. G., Estolano, R., Garcia, S. F. & Hay, J. D. 2010. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. *Tree Genetics & Genomes* 6: 555-564.

- Conceição, A. S., Queiroz, L. P., Lampert, S. M., Pereira, A. C. S., Borba, E. L. 2008. Biosystematics of *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* 270: 183-207.
- Cornuet, J-M. & Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Costa, C. B. N., Lambert, S. M., Borba, E. L. & Queiroz, L. P. 2007. Post-zygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Annals of Botany* 99: 625-635.
- Cruz, D. T., Selbah-Schnadelbach, A., Lambert, S. M., Ribeiro, P. L., Borba, E. L. 2011. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongate* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the *campo rupestre* vegetation in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 294: 87-98.
- Dempster, A. P., Laird, N. M., Rubin, D. B. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society B* 39:1-38.
- Dewoody, J., Nason, J. D., Hipkins, V. D. 2006. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Molecular Ecology Notes* 6: 951-957.
- Dieringer, D. & Schlötterer, C. 2003. Microsatellite analyzer (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167-169.
- Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M., Freimer, N. B. 1994. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 3166-3170.
- Doyle, J. J. & Doyle J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- El Mousadik, A. & Petit, R. J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic of Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 832-839.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
- Ellstrand, N. C. & Elam, D. R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.

- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet. 1995. Microsatellite variation in honey Bee (*Apis mellifera* L.) Populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics Society of America* 140: 679-695.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Falk, D. A. & Holsinger, K. E. 1991. Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York.
- Felsenstein, J. 1993. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c*. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Feres, J. M., Martinez, M. L. L., Martinez, C. A., Mastriner, M. A. & Marin, A. L. A. 2009. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. *Molecular Ecology Resources* 9: 434-437.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA/CENARGEN, Brasília.
- Franceschinelli, E. V., Jacobi, C. M., Drummond, M. G. & Resende, M. F. S. 2006. The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Annals of Botany* 97: 585-592.
- Fisher, R., 1954. *Statistical Methods for Research Workers*. 12 ed., Oliver & Boyd, Edinburgh.
- Fjellheim, S., Jorgensen, M. H., Kjos, M., Borgen, L. 2009. A molecular study of hybridization and homoploid hybrid speciation in *Argyranthemum* (Asteraceae) on Tenerife, the Canary Islands. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159, 19-31.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fundação Biodiversitas. 2005. Lista da flora brasileira ameaçada de extinção. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Brasil.
- Gitzendanner, M. A. & Soltis, P. S. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 86: 783-792.

- Giulietti A. M. & Pirani J. R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: P. E. Vanzolini & W. R. Heyer (eds.). Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 39–69.
- Giulietti, A. M., Pirani, J. R. & Harley, R. M. 1997. Espinhaço Range region - Eastern Brazil. In: S. D. Davis, V. H. Heywood, O. Herrera-MacBryde, J. Villa-Lobos, J. & A. C. Hamilton (eds.). Centres of Plant Diversity, a guide and strategy for their conservation. IUCN Publications Unit, Cambridge, pp. 397-404.
- Gomes, V., Collevatti, R. G., Silveira, F. A. O. & Fernandes, G. W. 2004. The distribution of genetic variability in *Baccharis concinna* (Asteraceae), an endemic, dioecious and threatened shrub of rupestrian fields of Brazil. *Conservation Genetics* 5: 157-165.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malaussé, T., Revardel, E., Salin, F. & Petit, R. J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591-611.
- Guo, S. W. & Thompson, E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Haber, L. H., Cavallari, M. M., Santos, F. R. C., Marques, M. O. M., Gimenes, M. A. & Zucchi, M. I. 2009. Development and characterization of microsatellite markers for *Lychnophora pinaster*: a study for conservation of a native medicinal plant. *Molecular Ecology Resources* 9: 811-814.
- Hamrick, J. L. & Godt, M. J. W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 351: 1291-1298.
- Hardy, J. O., Maggia, L., Bandou, E., Breyne, P., Caron, H., Chevallier, M., Doligez, A., Dutech, C., Dremer, A., Latouche-Hallé, C., Troispoux, V., Veron, V. & Degen, B. 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology* 15: 559-571.
- Harley, R. M. 1995. Introdução. In: B. L. Stannard (ed.). Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 1-40.
- Hurst, L. D., 2009. Genetics and the understanding of selection. *Nature Reviews* 10: 83-93.

- Ibisch, P. L., Rauer, G., Rudolph, D. & Barthlott, W. 1995. Floristic, biogeographical and vegetational aspects of Precambrian rock outcrops (inselbergs) in Eastern Bolivia. *Flora* 190: 299-314.
- Ibisch, P. L., Nowicki, C., Vasquez, R. & Koch, K. 2001. Taxonomy and biology of Andean Velloziaceae: *Vellozia andina* sp. nov. and notes on *Barbaceniopsis* (including *Barbaceniopsis castillonii* comb. nov.). *Systematic Botany* 26: 5-16.
- Jacobi, C. M. & del Sarto, M. C. L. 2007. Pollination of two species of *Vellozia* (Velloziaceae) from high-altitude quartzitic grasslands, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 21: 325–333.
- Jesus, F. F., Solferini, V. N., Semir, J. & Prado, P. I. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 226: 59–68.
- Jesus, F. F., Abreu, A. G., Semir, J. & Solferini, V. N. 2009. Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 277: 187-196.
- Kuhner, M. K. 2008. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 86-93.
- Lambert, S. M., Borba, E. L., Machado, M. C. & Andrade, S. C. S. 2006a. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. *Annals of Botany* 97: 389-403.
- Lambert, S. M., Machado, M. C. & Borba, E. L. 2006b. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus*  $\times$  *albicephalus* (*Melocactus ernestii*  $\times$  *M. glaucescens*) in North-eastern Brazil. *Plant Species Biology* 21:93-108.
- Li, C. D., Rosnagel, B. G., Scoles, G. J. 2000. The development of oat microstellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1259-1268.
- Litt, M. & Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44:397-401.

- Lousada, J. M. 2010. Genética da conservação de duas espécies de *Vellozia* (Velloziaceae), *V. gigantea* e *V. compacta*, endêmicas dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Lousada, J. M., Borba, E. L., Ribeiro, K. T., Ribeiro, L. C. & Lovato, M. B. 2011. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with landscape in Espinhaço Range, southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* 139: 431-440.
- Luikart, G. & Cornuet, J-M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12: 228-237.
- Machado, M. C. 2005. O gênero *Discocactus* Pfeiff. (Cactaceae) no estado da Bahia, Brasil: variabilidade morfológica, variabilidade genética, taxonomia e conservação. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil.
- Manica-Cattani, M. F., Zacaria, J., Pauletti, G., Atti-Serafini, L. & Echeverrigaray, S. 2009. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology* 69: 375-380.
- Martins, K., Chaves, L. J., Buso, G. S. C. & Kageyama, P. Y. 2006. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. *Conservation Genetics* 7: 957-969.
- Meirmans, P. G., Hedrick, P. W. 2011. Assessing population structure:  $F_{ST}$  and related measures. *Molecular Ecology Resources* 11: 5-18.
- Megléczy, E., Anderson, S. J., Bouguet, D., Butchers, R., Caldas, A., Cassel-Ludhagen, A., d'Aciert, A. C., Dawson, D. A., Faure, N., Fauvelot, C., Franck, P., Harper, G., Keyghobdi, N., Kluetsch, C., Muthulakshmi, M., Nagaraju, J., Patt, A., Péténian, F., Silvain, J., Wilcock, H. R. 2007. Microsatellite flanking region similarities among different loci within insect species. *Insect Molecular Biology* 16: 175-185.
- Mello-Silva, R. & Menezes, N. L. 1999. Two new Brazilian Velloziaceae, *Vellozia auriculata* and *Vellozia gigantea*, and a key to related dracenoid species of *Vellozia*. *Novon* 9: 536-541.
- Mello-Silva, R. 2004. Velloziaceae. In: Smith N, Mori SA, Henderson A, Stevenson DW, Heald SV. eds. Flowering plants of the Neotropics. Princeton, NJ: Princeton University Press, 490 – 491.

- Mello-Silva, R., Santos, D. Y. A., Salatino, M. L. F., Motta, L. B. Cattai, M. B. Sasaki, D. Lovo, J., Pita, P. B., Rocini, C. Rodrigues, C. D. N., Zarrei, M., Chase, M. W. 2011. Five vicarious genera from Gondwana: the Velloziaceae as shown by molecules and morphology. *Annals of Botany* 108: 87 – 102.
- Mendonça, M. P. & Lins, L. V. 2000. Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção de Minas Gerais. Fundação Biodiversitas e Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, Belo Horizonte.
- Menezes, N. L., Mello-Silva, R. & Mayo, S. J. 1994. Cladistic analysis of the Velloziaceae. *Kew Bulletin* 49: 71-92.
- Moreira, R. G., Mccauley, R. A., Cortés-Palomec, A. C., Lovato, M. B., Fernandes, G. W., Oyama, K. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae), an endangered species endemic to the Serra do Cipó, Brazil. *Molecular Ecology Resources* 8: 854-856.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nunome, T., Negoro, S., Miyatake, K., Yamaguchi, H. & Fokuoka, H. 2006. A protocol for the construction of microsatellite enriched genomic library. *Plant Molecular Biology Reporter* 24: 305-312.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13:1143–1155.
- Oliveira, P. E., Gibbs, P. E. & Bianchi, M. 1991. Pollination and breeding system of *Vellozia squamata* (Liliales, Velloziaceae) - a species of the Brazilian cerrados. *Botanica Acta* 104: 392–398.
- Palma-Silva, C., Lexer, C., Paggi, C. M., Barbará, T., Bered, F., Bodanese-Zanettini, M. H. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503-512.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pereira, A. C. S., Borba, E. L. & Giulietti, A. M. 2007. Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada



- Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 401-416.
- Pereira, M. F., Bandeira, L. F., Blanco, J. F., Ciampi, A. Y., Coelho, A. S. G. 2008. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species. *Molecular Ecology Resources* 8: 1329-1331.
- Petit, R. J., Aguinalde, I., de Beaulieu, J. L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J. P., Rendell, S. & Vendramin, G. G. 2003. Glacial refugia, hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1565-1565.
- Petit, R. J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. & Vendramin, G. G., 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 89-701.
- Pinheiro, F., Barros, F., Palma-Silva, C., Fay, M. F., Lexer, C., Cozzolino, S. 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography* 38: 1923-1935.
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J. M. 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90: 502-503.
- Porembski, R. S. 2004. Epiphytic orchids on arborescent Velloziaceae and Cyperaceae: extremes of phorophyte specialisation. *Nordic Journal of Botany* 23: 505-512.
- Porembski, S. & Barthlott, W. 1995. On the occurrence of a velamen radicum in Cyperaceae and Velloziaceae. *Nordic Journal of Botany* 15: 625-629.
- Primmer, C. R., Moller, A. P., Ellegren, H. 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Ramos, A. C. S., Lemos-Filho, J. P., Ribeiro, R. A., Santos, F. R. & Lovato, M. B. 2007. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. *Annals of Botany* 100: 1219-1228.

- Rabelo, S. G., Teixeira, C. F., Telles, M. P. C. & Collevatti, R. G. 2011. Development and characterization of microsatellite markers for *Lychnophora ericoides*, an endangered Cerrado shrub species. *Conservation Genetics Resources* (DOI: 10.1007/s12686-011-9447-y).
- Rapini, A., Ribeiro, P. L., Lambert, S. & Pirani, J. R. 2008. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 16-24.
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Ribeiro, L. C., Ribeiro, K. T., Madeira, J. A., Paiva, C. L. & Filippo, D. C. 2005. Riqueza e abundância de epífitas sobre canelas de ema gigantes (*Vellozia gigantea* N.L. Menezes e Mello-Silva) na Serra do Cipó (MG): três populações sob diferentes níveis de proteção. *VII Congresso de Ecologia do Brasil*, Caxambu-MG.
- Ribeiro, P. L., Borba, E. L., Smidt, E. C., Lambert, S. M., Schnadelbach, A. S. & van den Berg, C. 2008. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution* 270: 109–137.
- Rice, W. R. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Ronquist, F. 1997. Dispersal-vicariance analysis: a new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46:195-203.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. J. 2000 . Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., and S. Misener [eds.], *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey. pp . 365-386.
- Russell, A., Samuel, R., Rupp, B., Barfuss, M., Šafran, M., Besendorfer, V., et al. 2010. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon* 59: 389-404.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santos, M. O., Sasaki, R. P., Ferreira, T. H. S., Resente, R. M. S., Chiari, L., Karia, C. T., Faleiro, F. G., Jungmann, L., Zucchi, M. I. & Souza, A. P. 2009. Polymorphic microsatellite loci for *Stylosanthes macrocephala* Ferr. et Costa, a tropical forage legume. *Conservation Genetics Resource* 1: 481-486.

- Sazima, M. 1978. Biologia floral de espécies de Velloziaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233–234.
- SEMAD - Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. 2007. Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Rola Moça, incluindo a Estação Ecológica de Fechos.
- Shepherd, L. D. & Perrie, L. R. 2011. Microsatellite DNA analyses of a highly disjunct New Zealand tree reveal strong differentiation and imply a formerly more continuous distribution. *Molecular Ecology* 20: 1389-1400.
- Shriver, M. D., Jin, L., Chakraborty, R., Boerwinkle, E. 1993. VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model a computer simulation approach. *Genetics* 134: 983-993.
- Silva, R. M., Fernandes, G. W. & Lovato, M. B. 2007. Genetic variation in two *Chamaecrista* species (Leguminosae), one endangered and narrowly distributed and another widespread in the Serra do Espinhaço, Brazil. *Canadian Journal of Botany* 85: 629-636.
- Siqueira, M. V. B. M., Pinheiro, T. T., Borges, A., Valle, T. L., Zatarim, M. & Veasey, E. A. 2010. Microsatellite polymorphisms in Cassava landraces from the Cerrado biome, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Biochemical Genetics* 48: 879-895.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Souza, H. A. V. & Lovato, M. B. 2010. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 49-56.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Techen, N., Arias, R., Glynn, N. C., Pan, Z. Khan, I. A. & Scheffler, B. E. 2010. Optimized construction of microsatellite-enriched libraries. *Molecular Ecology Resources* 10: 508-515.

- Telles, M. P. C., Peixoto, F. P., Lima, J. S., Resente, L. V., Vianello, R. P., Walter, M. E. M. T. & Collevatti, R. G. 2011. Development of microsatellite markers for the endangered neotropical tree species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). *Genetics and Molecular Research* 10: 321-325.
- Tero, N., Neumeier, H., Gudavalli, R., Schlötterer, C. 2006. *Silene tatarica* microsatellites are frequently located in repetitive DNA. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 1612-1619.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535 – 538.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Werneck, M. S. & Espírito-Santo, M. M. 2002. Species diversity and abundance of vascular epiphytes on *Vellozia piresiana* in Brazil. *Biotropica* 34: 51-57.
- Yazbeck, G. M. & Kalapothakis E. 2007. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Research* 6: 1026-1034.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zucchi, M. I., Brondani, R. P. V., Pinheiro, J. B., Brondani, C. & Vencovsky, R. 2002. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Molecular Ecology Notes* 2: 512-513.
- Zucchi, M. I., Brondani, R. P. V., Pinheiro, J. B., Chaves, L. J., Coelho, A. S. G. C. & Vencovsky, R. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology* 26: 449-457.

## APÊNDICE 1

**Tabela A1.1** Diversidade genética em quatro populações de *Vellozia gigantea* (localizadas ao norte do Vale do Travessão) observada em cinco loci de microssatélites. PI = probabilidade de identidade acumulada com os cinco loci;  $N$  = número de indivíduos utilizados nas estimativas;  $A$  = número de alelos observados;  $R_A$  = riqueza alélica;  $H_O$  = heterozigosidade observada;  $H_E$  = heterozigosidade esperada;  $H_S$  = média das heterozigosidades;  $F_{IS}$  = coeficiente de endogamia. Para o nome das populações, veja a Tabela 2.1.

População/ Locus	$N$	$A$	$R_A$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$	$N$	$A$	$R_A$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$
<b>AP (3)</b> $PI = 5,1 \times 10^{-5}$ 0,329*							<b>ES (4)</b> $PI = 7,5 \times 10^{-4}$ 0,255*					
Vel01	19	8	5,850	<u>0,368</u>	<u>0,647</u>	0,438	20	8	5,446	<u>0,400</u>	<u>0,540</u>	0,264
Vel02	20	8	6,768	1,000	0,854	-0,176	20	7	5,775	0,750	0,803	0,067
Vel03	19	6	5,669	0,474	0,826	0,434	20	8	6,226	<u>0,400</u>	<u>0,791</u>	0,501*
Vel04	20	9	7,454	<u>0,500</u>	<u>0,831</u>	0,404*	20	9	6,540	0,700	0,799	0,126
Vel05	18	8	6,348	<u>0,333</u>	<u>0,79</u>	0,585*	20	7	4,678	<u>0,300</u>	<u>0,469</u>	0,367
<b>LE (2)</b> $PI = 2,2 \times 10^{-4}$ 0,319*							<b>SE (1)</b> $PI = 2,1 \times 10^{-4}$ 0,404*					
Vel01	13	4	3,380	0,308	0,397	0,232	18	6	4,492	0,333	0,505	0,346
Vel02	13	8	7,407	0,846	0,871	0,029	17	8	6,580	0,588	0,784	0,256
Vel03	12	8	6,998	<u>0,417</u>	<u>0,851</u>	0,522	18	9	6,640	0,556	0,817	0,327
Vel04	12	7	6,337	0,583	0,786	0,267	16	10	7,513	<u>0,250</u>	<u>0,778</u>	0,686*
Vel05	13	8	6,575	<u>0,308</u>	<u>0,662</u>	0,545	18	7	5,829	<u>0,500</u>	<u>0,808</u>	0,388*

Entre parênteses, o número de alelos exclusivos em cada população; valores de  $H_O$  e  $H_E$  sublinhados quando há desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \*valores significativos de  $F_{IS}$  após correção do  $p$ -valor ao nível de 5% de significância.

**Tabela A1.2.** Diversidade genética em cinco populações de *Vellozia gigantea* (localizadas ao sul do Vale do Travessão) observada em cinco loci de microssatélites. PI = probabilidade de identidade acumulada com os cinco loci; *N* = número de indivíduos utilizados nas estimativas; *A* = número de alelos observados; *R<sub>A</sub>* = riqueza alélica; *H<sub>O</sub>* = heterozigosidade observada; *H<sub>E</sub>* = heterozigosidade esperada; *H<sub>S</sub>* = heterozigosidade esperada média; *F<sub>IS</sub>* = coeficiente de endogamia. Para o nome das populações, veja a Tabela 2.1.

População / Locus	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>R<sub>A</sub></i>	<i>H<sub>O</sub></i>	<i>H<sub>E</sub></i>	<i>F<sub>IS</sub></i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>R<sub>A</sub></i>	<i>H<sub>O</sub></i>	<i>H<sub>E</sub></i>	<i>F<sub>IS</sub></i>
	NE (4) <i>PI</i> = 3,9 x 10 <sup>-5</sup>			0.500*			SB (3) <i>PI</i> = 2,2 x 10 <sup>-5</sup>			0.500*		
Vel01	18	7	4.962	<u>0,222</u>	<u>0,511</u>	0.572*	15	7	6.481	<u>0,333</u>	<u>0,860</u>	0.621*
Vel02	16	7	6.365	<u>0,438</u>	<u>0,815</u>	0.471*	15	8	7.464	<u>0,533</u>	<u>0,880</u>	0.403
Vel03	17	10	8.387	<u>0,529</u>	<u>0,870</u>	0.399*	15	10	7.740	0,600	0,832	0.286
Vel04	15	8	6.880	<u>0,333</u>	<u>0,802</u>	0.593*	13	8	7.705	<u>0,077</u>	<u>0,895</u>	0.917*
Vel05	18	10	8.367	<u>0,444</u>	<u>0,876</u>	0.500*	15	4	3.447	0,467	0,480	0.030
	SR (2) <i>PI</i> = 2,3 x 10 <sup>-5</sup>			0.565*			CB (4) <i>PI</i> = 3 x 10 <sup>-4</sup>			0.433*		
Vel01	16	10	7.528	<u>0,375</u>	<u>0,833</u>	0.558*	16	6	4.503	<u>0,375</u>	<u>0,573</u>	0.353
Vel02	16	9	7.598	<u>0,250</u>	<u>0,861</u>	0.716*	14	8	7.083	<u>0,429</u>	<u>0,852</u>	0.506*
Vel03	17	7	6.198	<u>0,412</u>	<u>0,831</u>	0.512*	16	10	8.016	<u>0,563</u>	<u>0,875</u>	0.365*
Vel04	16	6	5.705	<u>0,375</u>	<u>0,813</u>	0.547*	9	3	3.000	0,222	0,601	0.644
Vel05	17	6	5.221	<u>0,412</u>	<u>0,781</u>	0.480	16	5	4.732	0,500	0,718	0.310
	CP (6) = 5,1 x 10 <sup>-6</sup>			0.592*								
Vel01	19	6	5.565	<u>0,158</u>	<u>0,778</u>	0.801*						
Vel02	19	11	8.875	<u>0,579</u>	<u>0,902</u>	0.364*						
Vel03	19	9	7.333	<u>0,211</u>	<u>0,868</u>	0.762*						
Vel04	17	6	5.018	<u>0,176</u>	<u>0,772</u>	0.777*						
Vel05	19	11	8.989	<u>0,632</u>	<u>0,908</u>	0.310						

Entre parênteses, o número de alelos exclusivos em cada população; valores de *H<sub>O</sub>* e *H<sub>E</sub>* sublinhados quando há desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \*valores significativos de *F<sub>IS</sub>* após correção do *p*-valor ao nível de 5% de significância.

## APÊNDICE 2

**Tabela A2.1.** Frequência alélica em cinco *loci* microssatélites em nove populações de *Vellozia gigantea* ocorrentes na Serra do Cipó, Cadeia do Espinhaço, estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil. *N*=número de indivíduos amostrados por população para o *locus*. Para o nome das populações, veja a Tabela 2.1.

<i>Locus</i>	Alelo	Pop AP	Pop LE	Pop ES	Pop SE	Pop NE	Pop SR	Pop CP	Pop SB	Pop CB
<b>Vel01</b>	<i>N</i>	19	13	20	18	18	16	19	15	16
	300	0,053	--	0,025	--	--	0,031	--	--	0,031
	304	--	--	--	--	--	--	--	0,033	--
	313	--	--	--	--	--	0,031	--	--	--
	314	--	0,038	--	--	--	--	--	--	--
	320	0,079	--	0,050	--	0,028	0,063	--	--	--
	334	--	--	--	0,028	--	--	--	--	--
	339	0,026	--	--	--	--	--	--	--	--
	340	0,132	0,038	--	--	0,028	0,031	--	--	0,031
	341	--	--	0,050	--	--	--	--	--	--
	342	0,079	--	0,075	0,139	0,111	0,031	0,211	0,200	0,031
	343	0,579	0,769	0,675	0,694	0,694	0,313	0,395	0,167	0,625
	344	--	--	--	--	--	--	0,105	--	--
	345	--	--	--	--	0,028	--	--	--	--
	346	--	--	0,025	--	--	--	--	--	--
	348	0,026	--	--	--	--	--	--	--	--
	350	--	--	--	0,028	--	0,031	--	0,100	--
	351	0,026	--	0,025	0,056	--	0,094	0,132	0,100	--
352	--	--	--	--	0,056	0,250	0,053	0,200	0,063	
353	--	0,154	0,075	0,056	0,056	0,125	0,105	0,200	0,219	
<b>VEI02</b>	<i>N</i>	20	13	20	17	16	16	19	15	14
	221	--	0,231	0,225	0,088	--	--	--	--	--
	229	0,025	--	--	0,029	--	--	0,053	--	--
	231	--	--	--	0,265	0,063	0,063	0,105	0,167	0,286
	233	0,125	0,077	0,275	0,059	0,219	0,031	0,132	0,133	--
	235	0,225	0,231	0,275	0,382	--	0,156	0,105	0,067	--
	237	0,200	0,038	0,100	--	0,344	0,281	0,211	0,100	0,143
	239	0,200	0,154	0,050	0,059	0,063	0,094	0,053	0,200	0,107
	241	0,125	0,077	0,025	0,059	0,094	--	0,105	--	0,036
	243	0,050	--	--	--	0,156	0,063	0,026	0,067	0,214
	245	0,050	0,077	0,050	--	0,063	0,031	--	0,067	0,107
	247	--	--	--	--	--	0,094	--	0,200	0,071
	249	--	0,115	--	0,059	--	--	--	--	--
	253	--	--	--	--	--	--	--	--	0,036
	257	--	--	--	--	--	0,188	--	--	--

	<b>260</b>	--	--	--	--	--	--	0,132	--	--
	<b>262</b>	--	--	--	--	--	--	0,026	--	--
	<b>264</b>	--	--	--	--	--	--	0,053	--	--
<b>VEI03</b>	<i>N</i>	<i>19</i>	<i>12</i>	<i>20</i>	<i>18</i>	<i>17</i>	<i>17</i>	<i>19</i>	<i>15</i>	<i>16</i>
	<b>132</b>	--	--	--	--	0,029	--	--	--	--
	<b>138</b>	--	--	--	--	0,059	0,059	0,132	0,067	0,031
	<b>140</b>	--	0,042	--	0,028	0,088	0,294	0,053	0,100	0,250
	<b>142</b>	0,158	0,208	0,125	0,083	0,088	--	0,158	0,333	0,156
	<b>145</b>	--	--	0,025	0,028	--	--	--	0,033	--
	<b>147</b>	0,237	--	0,375	0,222	0,294	0,088	0,026	0,033	0,094
	<b>149</b>	0,263	0,250	--	0,222	0,176	--	0,053	--	--
	<b>151</b>	0,158	--	0,050	0,028	--	--	--	0,100	0,094
	<b>153</b>	0,132	0,208	0,225	--	--	--	--	0,233	0,031
	<b>155</b>	--	--	0,025	0,028	--	0,206	0,158	0,033	--
	<b>157</b>	--	0,042	--	--	0,059	0,029	0,237	--	0,188
	<b>159</b>	--	0,042	0,125	0,056	0,059	0,147	--	--	--
	<b>161</b>	0,053	0,167	--	--	0,088	0,176	0,158	0,033	--
	<b>162</b>	--	--	0,050	--	--	--	--	--	--
	<b>164</b>	--	0,042	--	0,306	--	--	--	0,033	--
	<b>166</b>	--	--	--	--	--	--	0,026	--	--
	<b>172</b>	--	--	--	--	0,059	--	--	--	--
	<b>174</b>	--	--	--	--	--	--	--	--	0,031
	<b>178</b>	--	--	--	--	--	--	--	--	0,094
	<b>180</b>	--	--	--	--	--	--	--	--	0,031
<b>Vel04</b>	<i>N</i>	<i>20</i>	<i>12</i>	<i>20</i>	<i>16</i>	<i>15</i>	<i>16</i>	<i>17</i>	<i>13</i>	<i>9</i>
	<b>142</b>	--	--	--	--	--	--	--	0,077	--
	<b>144</b>	--	--	--	0,188	0,033	0,156	0,118	0,077	--
	<b>146</b>	--	--	--	--	--	--	--	0,077	--
	<b>154</b>	0,350	0,333	0,375	0,438	0,400	0,125	0,353	0,154	--
	<b>156</b>	0,075	0,083	0,075	0,031	0,100	0,313	0,235	--	0,556
	<b>160</b>	--	0,333	0,150	0,063	0,100	--	0,029	0,192	0,111
	<b>162</b>	--	--	--	0,031	--	0,063	--	--	--
	<b>164</b>	0,125	0,083	--	--	--	--	--	--	--
	<b>168</b>	0,050	--	0,025	0,031	--	--	--	--	--
	<b>170</b>	0,050	--	0,200	--	--	--	--	--	--
	<b>172</b>	--	--	0,025	0,031	--	--	--	--	--
	<b>174</b>	0,050	--	--	0,063	--	0,094	0,029	0,154	--
	<b>175</b>	--	--	--	--	0,100	0,250	0,235	0,115	0,333
	<b>177</b>	--	0,042	0,100	0,063	--	--	--	0,154	--
	<b>180</b>	0,050	--	--	0,063	--	--	--	--	--
	<b>182</b>	--	0,083	--	--	--	--	--	--	--
	<b>183</b>	--	--	--	--	0,067	--	--	--	--
	<b>185</b>	0,175	--	0,025	--	--	--	--	--	--
	<b>187</b>	0,075	--	--	--	--	--	--	--	--



	<b>189</b>	--	0,042	0,025	--	0,033	--	--	--	--
	<b>193</b>	--	--	--	--	0,167	--	--	--	--
<b>Vel05</b>	<i>N</i>	<i>18</i>	<i>13</i>	<i>20</i>	<i>18</i>	<i>18</i>	<i>17</i>	<i>19</i>	<i>15</i>	<i>16</i>
	<b>137</b>	--	0,077	0,025	0,028	0,056	--	0,079	--	--
	<b>141</b>	--	--	--	--	--	--	0,026	--	--
	<b>146</b>	0,028	0,038	--	--	0,083	--	0,053	--	--
	<b>148</b>	0,028	--	0,050	--	0,278	0,235	0,105	0,700	0,063
	<b>150</b>	0,056	--	--	--	0,111	0,029	0,053	0,067	--
	<b>151</b>	0,111	--	--	0,083	0,083	0,324	0,184	--	0,094
	<b>152</b>	0,083	0,038	0,050	0,111	0,056	0,088	0,105	0,033	0,156
	<b>153</b>	0,056	0,577	0,725	0,250	0,083	0,265	0,158	0,200	0,469
	<b>154</b>	0,306	0,038	0,025	0,306	0,056	--	0,105	--	--
	<b>155</b>	--	0,077	--	--	0,028	0,059	0,105	--	0,219
	<b>156</b>	--	0,115	--	0,028	--	--	0,026	--	--
	<b>157</b>	0,333	0,038	0,100	0,194	0,167	--	--	--	--
	<b>158</b>	--	--	0,025	--	--	--	--	--	--