

María Cristina López Roberts



Diversidade e estrutura genética em *Masdevallia scandens* Rolfe, *M. solomonii* Luer & Vásquez e *M. yungasensis* Hashimoto subsp. *yungasensis* (Orchidaceae), espécies endêmicas e ameaçadas dos *Yungas* da Bolívia

Feira de Santana, Bahia

Outubro de 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



**Diversidade e estrutura genética em *Masdevallia scandens* Rolfe,
M. solomonii Luer & Vásquez e *M. yungasensis* Hashimoto
subsp. *yungasensis* (Orchidaceae), espécies endêmicas e
ameaçadas dos *Yungas* da Bolívia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Cássio van den Berg (UEFS)

Co-orientador: Dr. Jorge Gonzáles - Astorga

Feira de Santana, Bahia

Outubro de 2011

Ficha catalográfica: Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

L859d López Roberts, María Cristina
Diversidade e estrutura genética em *Masdevallia scandens* Rolfe, *M. solomonii* Luer & Vásquez e *M. yungasensis* Hashimoto subsp. *yungasensis* (Orchidaceae), espécies endêmicas e ameaçadas dos Yungas da Bolívia / María Cristina López Roberts. – Feira de Santana - Bahia, 2011.
viii, 91 f. : il.

Orientador: Cássio van den Berg
Co-Orientador: Jorge Gonzáles - Astorga

Dissertação (Mestrado Botânica)– Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2011.

1. *Masdevallia*. 2. Orchidaceae. 3. Orquídeas - Diversidade genética. 4. Orquídeas - Conservação. I. Berg, Cássio van den. II. Gonzáles - Astorga, Jorge. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Departamento de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 582.594.2

"O temor do SENHOR é o princípio da sabedoria"

Provérbios 1:7

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser ele a minha fortaleza e o motivo da minha alegria.

A minha família: os meus pais Olga e Carlos, pelo amor incondicional, e aos meus irmãos Nilton, Roberto e Jimena por serem os melhores exemplos de perseverança e superação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de Mestrado concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) que possibilitou o desenvolvimento do presente estudo.

Agradeço ao Prof. Cássio van den Berg por acreditar no meu projeto e me apoiar em todo momento, ante todo por ser o meu amigo.

Ao Prof. Jorge Gonzáles Astorga pelas sugestões e a orientação durante o planejamento desta pesquisa, e por ter acompanhado o desenvolvimento da mesma apesar da distância.

Aos professores da pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos e pelas palavras de alento. Especialmente ao Prof. Eddy Oliveira, por pensar comigo.

A todos os meus colegas da Pós-Graduação da Botânica pela ajuda, paciência e carinho demonstrado. Principalmente aos da minha turma: Juliana, Jumara, Alisson, Davi e Michela.

Ao pessoal do LAMOL, LAPEM, BIOMOL e LENT por toda colaboração durante a etapa de laboratório. Em particular ao Prof. Ari, a Elvia Souza, Ricardo, Dissinho, Gorete, Catinha e Rita.

Ao Paulo Ricardo, Paty Luz, Tarciso, Catharina e Laura, por dispor um tempo para me ensinar as técnicas de laboratório com tanta paciência.

Aos estagiários dessa época no LAMOL: Bárbara, Evandro, Thiago, Danniela, Vitoria e Priscila, pelos sorrisos compartilhados entre PCRs e géis.

À Tânia Moura, Maisa Campi e Adna Sousa, por me auxiliar durante o meu estágio na UNICAMP.

A meus queridos amigos: Anderson Machado, Ana Luiza Córtes, Claudia Bastos, Elisa Sukanuma, Floriano Pastore, Ariane Barbosa, Thiago Arruda e Elena, Samia, Lia

Andrade, Hibert Huallya e Alan Cequeira, por cuidar de mim. Reconheço o amor de Deus em vocês.

Aos meus queridos revisores e amigos: Anderson, Marla, Juliana, Domingos, Ariane e Alan, por me ensinar e ajudar a escrever corretamente em português.

*Agradeço a Eduardo Leite Borba e Daiane Cruz por fornecer a matriz de dados de *Catleya elongata* para recalcular alguns índices de divergência genética.*

A todos os meus anjos:

Pessoal da secretaria da Pós: Adriana, Gardênia, Alberto e Helton, pela paciência e ajuda permanente.

Pessoal da vigilância do LABIO: Luciana, Elisangela, Juci, Jakson, Serjão, Joselito, Andre e Crisóstomo, por cuidar da minha saída e da minha chegada na UEFES durante todo este tempo.

Pessoal da limpeza da UEFES, por me ensinar a ser simples e colaboradora.

A meus amigos bolivianos:

Elmer, Karen, Eduardo, Arely e Jorge Quezada por me ajudar a realizar as viagens de coleta.

Á Gabriela, Iván, Beatriz, Natali, Pablito, Amira, Lorena e Paolo, por não me deixar de amar apesar das distâncias e perdoar a minha ausência.

Ao pessoal do Herbário Nacional da Bolívia por me ajudar com as permissões de coleta e por ter sempre um espaço para mim. Especialmente a Stephan Beck, Mónica Moraes, Rosaisela Meneses, Gisela Carrasco, Alfredo Fuentes, Edgar Mayta e Rossi de Michel.

Finalmente, agradeço ao Professor Roberto Vásquez, um exemplo de amor à ciência, quem me ajudou a descobrir o fascinante mundo das orquídeas.

MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
ÍNDICE	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO GERAL	1
RESUMEN	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
OBJETIVOS	7
MARCO REFERENCIAL	8
METODOLOGIA GERAL	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO 1 – Microsatellite marker development for the threatened orchid <i>Masdevallia solomonii</i> (Orchidaceae)	47
Abstract	48
Methods and Results	49
Conclusions	52
Literature Cited	52
CAPÍTULO 2 – Diversidade e estrutura genética em <i>Masdevallia solomonii</i>, <i>Masdevallia yungasensis</i> e <i>Masdevallia scandens</i>, orquídeas endêmicas dos Yungas da Bolívia, implicações para a conservação	58
Resumo	59
Introdução	60
Metodologia	62
Resultados	66
Discussão	77

Referências bibliográficas	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
APÊNDICE 1	90
APÊNDICE 2	91

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1:** Parque Nacional e Área Natural de Manejo Integrado Cotapata (PN-ANMI Cotapata), La Paz, Bolívia; Cortesia: Sevilla-Callejo (2010). 20
- Figura 2:** Floresta nebulosa montana e floresta montana inferior, correspondentes ao PN-ANMI Cotapata 22
- Figura 3:** Características do microhabitat em uma das populações de *Masdevallia* ocorrente na trilha pré-colombiana Chojllapata do PN-ANMI Cotapata. 22
- Figura 4:** Características florais: A) *Masdevallia scandens*, B) *M. solomonii*, C) *M. yungasensis*.....21
- Figura 5:** Padrões fenológicos em: A) *Masdevallia scandens*, B) *M. solomonii*, C) *M. yungasensis*. (Dados não publicados de Moya *et al.*). 25
- Figura 6:** Localização das populações de *Masdevallia scandens* (MSC), *M. solomonii* (MSO) e *M. yungasensis* (MY) ocorrentes nas trilhas pré-colombianas Chojllapata, Sillutinkara, e na localidade de Chuspipata dentro do PN-ANMI Cotapata. 26

CAPITULO 2

- Figura 1:** Localização das populações de *Masdevallia scandens* (MSC), *M. solomonii* (MSO) e *M. yungasensis* (MY) ocorrentes nas trilhas pré-colombianas Chojllapata, Sillutinkara, e na localidade de Chuspipata dentro do PN-ANMI Cotapata. 61
- Figura 2:** Árvore de consenso de maioria, com as relações genéticas entre as populações de *M. solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens*, baseado na estimativa das distâncias genéticas de Nei (1978) e construído usando o algoritmo de Neighbor joining, com 1000 replicações de reamostragem dos locos para cálculo dos valores de bootstrap. Ver tabela 3 para nomes das populações. 67
- Figura 3:** ΔK calculado como $\Delta K = m | L''(K) | / s [L (K)]$. O valor desta distribuição modal é o verdadeiro K ou o mais alto nível de estrutura. 68
- Figura 4:** Representação gráfica dos diferentes agrupamentos genéticos para K = 3 gerados através da análise Bayesiana no STRUCTURE, correspondentes a *M. solomonii* (MSO), *M. yungasensis* (MY) e *M. scandens* (MSC) ocorrentes no PN-ANMI Cotapata,

baseado na informação de 10 locos microssatélites, modelo de mistura e locos correlacionados. 68

Figura 5: Histogramas que representam as frequências de indivíduos híbridos/introgridos, segundo os valores do *Hybrid Index* (Buerkle, 2005) em populações simpátricas de *Masdevallia solomonii* (MSO), *M. scandens* (MSC) e *M. yungasensis* (MY). A) Graus de hibridação/introgressão em indivíduos de MSO que crescem em simpatria com MY; população de referência = população pura MSO, população alternativa = população pura MY. B) Graus de hibridação/introgressão em indivíduos de MSC que crescem em simpatria com MSO e MY; população de referência = população pura MSO, população alternativa = população pura MY. C) Graus de hibridação/introgressão em indivíduos de MY que crescem em simpatria com MSO; população de referência = população pura MY, população alternativa = população pura MSO. 69

Figura 6: Fluxo gênico proposto para um possível cenário de manejo e conservação das populações de *Masdevallia scandens*, *M. solomonii* e *M. yungasensis*, baseado em dados demográficos e a informação genética das populações avaliadas no PN-ANMI Cotapata. * = populações com registros antigos de indivíduos de alguma das outras espécies em simpatria, N = tamanho populacional, F_{IS} = coeficiente de endogamia (F_{IS}), N_a = número de alelos, e entre parênteses o número de alelos exclusivos, quadro amarelo = população na qual se requer re-alocar indivíduos. 82

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1: Programas de PCR para amplificação de locos microssatélites em <i>Masdevallia solomonii</i> , <i>M. scandens</i> e <i>M. yungasensis</i>	29
---	----

CAPITULO 1

Table 1: Characterization of thirteen microsatellite markers developed for <i>Masdevallia solomonii</i> . For each primer pair we show the forward and reverse sequences (5' to 3'), expected size based on the cloned fragment*, repeat motif, optimal PCR amplification conditions, and GenBank access number.	53-54
--	-------

Table 2: Results of initial microsatellite marker screening in one population of <i>M. solomonii</i> (N=24) in the PN-ANMI Cotapata, Bolivia. For each marker, we present number of alleles (A), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_E), polymorphism information content (PIC) and P values for the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test.	55
---	----

CAPITULO 2

Tabela 1: Populações de <i>Masdevallia solomonii</i> , <i>M. yungasensis</i> e <i>M. scandens</i> ocorrentes no PN-ANMI Cotapata (Bolívia).	62
---	----

Tabela 2: Caracterização da variabilidade genética de dez locos microssatélites em populações de <i>Masdevallia solomonii</i> , <i>M. yungasensis</i> e <i>M. scandens</i> ocorrentes no PN-ANMI Cotapata, Bolívia.	65
---	----

Tabela 3: Caracterização da variabilidade genética das populações de <i>Masdevallia solomonii</i> , <i>M. yungasensis</i> e <i>M. scandens</i> ocorrentes no PN-ANMI Cotapata, Bolívia.	66
---	----

Tabela 4: Teste Exato de Fisher, para desvios EHW em populações de <i>Masdevallia solomonii</i>	71
---	----

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) em seis populações de <i>Masdevallia solomonii</i>	71
---	----

Tabela 6: Índices de divergência genética entre populações de <i>Masdevallia solomonii</i>	71
Tabela 7: Teste exato de Fisher para desvios HWE em populações de <i>Masdevallia yungasensis</i>	72
Tabela 8: Análise de variância molecular (AMOVA) em três populações de <i>Masdevallia yungasensis</i>	73
Tabela 9: Índices de divergência genética entre populações de <i>Masdevallia yungasensis</i>	73
Tabela 10: Teste Exato de Fisher para desvios HWE em populações de <i>Masdevallia scandens</i>	74
Tabela 11: Análise de variância molecular (AMOVA) em populações de <i>Masdevallia scandens</i>	75
Tabela 12: Índices de divergência genética entre populações de <i>Masdevallia scandens</i>	75

RESUMO GERAL

Masdevallia scandens, *M. solomonii* e *M. yungasensis* são orquídeas endêmicas das florestas úmidas montanas dos Yungas da Bolívia. Por essas espécies apresentarem populações pequenas e habitats restritos, a fragmentação e perda das florestas primárias nos Yungas constituem-se em um fator de ameaça para estes táxons. Considerando que o êxito na conservação das espécies raras, ameaçadas ou em perigo depende da manutenção de sua diversidade genética e que esta informação não se encontra disponível para a maioria das orquídeas nativas, o presente estudo teve por finalidade desenvolver marcadores moleculares microssatélites para *M. solomonii* e determinar o potencial de transferibilidade em *M. scandens* e *M. yungasensis*, permitindo desta maneira, avaliar a diversidade e estrutura genética das populações ocorrentes no Parque Nacional e Área Natural de Manejo Integrado (PN-ANMI Cotapata), Bolívia. Dez pares de *primers* microssatélites desenhados para *M. solomonii* foram utilizados com sucesso em *M. yungasensis* e *M. scandens*. As populações das três espécies apresentaram elevada diversidade genética com número médio de alelos por locos de 13,7 em *M. solomonii*, 12, 9 em *M. yungasensis* e 9,2 em *M. scandens*. A heterozigidade esperada foi maior do que a observada na maioria das populações, encontrando-se desvios significativos do Equilíbrio Hardy Weinberg. O coeficiente de endogamia foi alto em *M. solomonii* ($G_{IS} = 0,270 \pm 0,101$) e *M. yungasensis* ($G_{IS} = 0,203 \pm 0,069$), comparadas com *M. scandens* ($G_{IS} = 0,121 \pm 0,088$). Os valores de divergência genética mostraram uma maior estruturação das populações de *Masdevallia solomonii* e *M. yungasensis* em comparação com *M. scandens*. As populações simpátricas apresentaram indivíduos com ascendência mista, revelando que processos de hibridação/introgressão entre estas espécies têm acontecido. Nessa perspectiva, o presente estudo mostrou que em tais populações, o controle da endogamia local e a preservação da integridade genética dos indivíduos não introgrididos poderiam ser algumas das medidas prioritárias para a conservação das espécies.

Palavras - chave: Conservação, diversidade genética, *Masdevallia*, microssatélites, Orchidaceae.

RESUMEN

Masdevallia scandens, *M. solomonii* y *M. yungasensis* son orquídeas endémicas de los bosques montanos húmedos de las Yungas de Bolivia. Debido a que estas especies presentan poblaciones pequeñas y hábitats restringidos, la fragmentación y pérdida de los bosques primarios en las Yungas se constituye en un factor de amenaza para estos taxones. Considerando que el éxito en la conservación de especies raras, amenazadas o en peligro depende del mantenimiento de su diversidad genética y que esta información no se encuentra disponible para la mayoría de las orquídeas nativas, el presente estudio tuvo por objetivo el desarrollo de marcadores moleculares microsatélites para *M. solomonii* y determinar el potencial de transferibilidad en *M. scandens* y *M. yungasensis*, permitiendo de este modo evaluar la diversidad y estructura genética de las poblaciones presentes en el Parque Nacional y Área Natural de Manejo Integrado (PN-ANMI Cotapata), Bolivia. Diez pares de *primers* microsatélites diseñados para *M. solomonii* fueron transferidos con éxito a *M. yungasensis* y *M. scandens*. Las poblaciones de las tres especies presentaron elevada diversidad genética con un promedio de alelos por *locus* de 13.7 en *M. solomonii*, 12.9 en *M. yungasensis* y 9.2 en *M. scandens*. La heterocigosidad esperada fue mayor que la observada en la mayoría de las poblaciones, encontrándose desvíos significativos del Equilibrio Hardy Weinberg. El coeficiente de endogamia fue alto en *M. solomonii* ($G_{IS} = 0.270 \pm 0.101$) y *M. yungasensis* ($G_{IS} = 0.203 \pm 0.069$), comparadas con *M. scandens* ($G_{IS} = 0.121 \pm 0.088$). Los valores de divergencia genética mostraron una mayor estructuración de las poblaciones de *Masdevallia solomonii* y *M. yungasensis* en comparación con *M. scandens*. Las poblaciones simpátricas presentaron individuos con ascendencia mixta, revelando que procesos de hibridación/introgresión han ocurrido entre las mencionadas especies. En ese contexto, la información generada en el presente estudio indica que en estas poblaciones subdivididas, el control de la endogamia local y la preservación de la integridad genética de los individuos no introgridos pueden ser algunas de las medidas prioritarias para la conservación de estas especies.

Palabras claves: Conservación, diversidad genética, *Masdevallia*, microsatélites, Orchidaceae.

INTRODUÇÃO GERAL

A Bolívia é um dos 11 países com maior biodiversidade do planeta, devido principalmente à variedade de nichos ecológicos, ecótonos e heterogeneidade de habitats (Ibisch, 1998). Estas características contribuem para que o país tenha a sua riqueza florística estimada em aproximadamente 20.000 espécies (Beck, 1998), sendo 1.500 apenas em Orchidaceae (Vásquez & Ibisch, 2004).

A região com a maior diversidade de orquídeas na Bolívia corresponde às florestas montanhosas dos Yungas, que apesar de ocuparem apenas 4% do território nacional, concentram 60% das espécies, com uma taxa de endemismo de 80% (Vásquez & Ibisch, 2004). A subtribo Pleurothallidinae é a que possui o maior número de espécies na região, das quais 47% são endêmicas e destas, 40% encontram-se ameaçadas (Vásquez & Ibisch, 2000).

Masdevallia Ruiz & Pav. é um dos gêneros mais diversos de Pleurothallidinae, superado só por *Lephantes* Sw., *Pleurothallis* R.Br. e *Stelis* Sw. Na Bolívia foram registradas 49 espécies, sendo 80% destas endêmicas (Vasquez & Ibisch, 2000). Estima-se que o número de espécies seja ainda maior na ecorregião dos Yungas, uma vez que esta é considerada centro de diversidade de orquídeas e epífitas em geral (Krömer *et al.*, 2007).

A grande riqueza de orquídeas epífitas nas florestas montanas úmidas tropicais é resultado de uma intensa especiação devido à interação de múltiplos fatores (Ackerman, 1998), principalmente: 1) a fragmentação do habitat, que promoveria a especiação alopátrica (Templeton, 1981); 2) o particionamento do nicho (Gentry & Dodson, 1987), uma vez que a superfície total disponível nas árvores hospedeiras é muito maior do que no solo, e que as diferentes zonas da árvore apresentam um conjunto heterogêneo de ambientes, onde a especiação pode ser acrescentada pelas adaptações morfológicas que permitiriam uma vantagem para a sobrevivência em cada um destes microhabitats; e 3) a especificidade pelo polinizador (Gentry & Dodson, 1987).

Estudos recentes mostram que as florestas montanas incluídas dentro do Parque Nacional e Área Natural de Manejo Integrado Cotapata (PN-ANMI Cotapata) nos Yungas de La Paz constituem um dos ecossistemas com maior riqueza de espécies de orquídeas do mundo (Krömer *et al.*, 2005). A elevada riqueza de orquídeas nesta região pode ser explicada pela interação entre a heterogeneidade topográfica e gradiente altitudinal, que

deram lugar a uma variedade de climas e diferentes tipos de microhábitats capazes de suportar uma vegetação diversa (Jiménez & Miranda, 2007).

Uma avaliação do estado de conservação das ecorregiões terrestres da América Latina e Caribe (Dinerstein *et al.*, 1995) mostrou que os Yungas bolivianos encontram-se entre as cinco ecorregiões consideradas de “Prioridade um” para a conservação. Entretanto, a região é também uma das mais afetadas pela crescente pressão humana na Bolívia (Hanagarth & Arce, 1986; Ribera, 1995) tendo sido considerada em estado de conservação crítico (Araujo & Ibsch, 2000).

As florestas nos Yungas estão sendo rapidamente devastadas, devido principalmente à utilização das florestas primárias para o estabelecimento de práticas agrícolas e de pastoreio, as quais frequentemente envolvem a queimada não controlada, além dos assentamentos humanos ilegais e atividades de mineiração. O desmatamento originado pelo contínuo uso da floresta desde tempos pré-colombianos até a atualidade vem tendo um impacto negativo sobre a diversidade de espécies de orquídeas, principalmente epífitas (Krömer, 2003).

A diminuição da riqueza de orquídeas epífitas, devido à perda de florestas primárias, poderia afetar aproximadamente 90% das espécies (Krömer *et al.*, 2007). Além disso, algumas orquídeas com potencial ornamental são extraídas indiscriminadamente, ocasionando uma diminuição das populações, o que poderia levá-las a um estado crítico de conservação. Por esta razão, a maioria das espécies endêmicas sofre algum grau de ameaça. É o caso de *Masdevallia scandens* Rolfe, *M. solomonii* Luer & Vásquez e *M. yungasensis* Hashimoto subsp. *yungasensis*, que se encontram na Lista Vermelha de espécies ameaçadas da flora boliviana (Meneses & Beck, 2005). Estas espécies foram categorizadas como vulneráveis (VU), segundo critérios da IUCN (1997), por serem endêmicas em nível local, com populações muito pequenas e frágeis, de hábitats restritos e ameaçados para a sobrevivência em curto ou médio prazo (Vásquez & Ibsch, 2000).

Devido ao fato das espécies raras e/ou ameaçadas geralmente caracterizarem-se por apresentar tamanhos populacionais pequenos e estarem geograficamente isoladas, a fragmentação natural ou antrópica dos hábitats tem profundos impactos sobre elas, principalmente na perda da diversidade genética (Vasseur, 2001) e consequente diminuição do seu potencial adaptativo (Frankham *et al.*, 2002).

Em populações pequenas os processos de deriva genética e endogamia são aumentados, influenciando em conjunto, os padrões de diversidade genética e sucesso

reprodutivo (*fitness*). A deriva genética muda a distribuição da variação genética de duas maneiras: i) diminuindo a variação dentro da população (perda de heterozigosidade e eventual fixação de alelos), e ii) aumentando a diferenciação entre populações. A redução na reprodução e sobrevivência, devido a processos acelerados de endogamia, acrescenta o risco de extinção das populações naturais (Frankham, 1995).

Considerando que o êxito na conservação de populações de espécies raras, ameaçadas ou em perigo depende da manutenção de sua diversidade genética (Frankham *et al.*, 2002), e que tal informação não está disponível para a maioria das espécies nativas, durante os últimos anos tem se dado maior ênfase aos estudos genéticos destinados à conservação. Estes estudos são muito úteis para selecionar populações que devem receber prioridade para a conservação e na proposta de estratégias de manejo *in situ* e *ex situ* (Ávila-Díaz & Oyama, 2007).

Conhecer como está distribuída a variabilidade genética dentro de populações naturais nos fornece uma perspectiva histórica das mudanças evolutivas que caracterizam as espécies, permitindo predizer como as populações poderiam responder a futuros eventos de origem natural ou antrópico. A informação da estrutura genética populacional, em conjunto com o conhecimento dos sistemas reprodutivos das espécies e seus requerimentos ecológicos, constitui a base para a conservação e manejo de unidades evolutivamente significativas (Ávila-Díaz & Oyama, 2007).

Estudos recentes em *Masdevallia yungasensis* e *M. solomonii* (Moya, com. pess.) têm relatado a existência de indivíduos que compartilham características fenotípicas de ambas as espécies (morfotipos intermediários), sugerindo a possibilidade de hibridação natural entre estas. Embora a hibridação natural tenha sido demonstrada para várias espécies de orquídeas, por exemplo, em *Cypripedium* L. (Case, 1993), *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski (Hedrán, 1996), *Ophrys* L. (Nielsen & Siegismund, 1999), *Platanthera* Rich. (Soliva & Widmer, 2003) e *Liparis* Rich. (Chung *et al.*, 2005), a determinação da ocorrência de hibridação exige uma análise em nível genético. Além disso, muitas vezes a hibridação pode ter ocorrido em um passado recente e através de retrocruzamentos permanece na população uma quantidade de indivíduos introgridos, cuja identificação é difícil e só pode ser feita com segurança através de dados moleculares.

Com base no anteriormente exposto, para conhecer como estão se desenvolvendo estes processos genéticos nas populações de interesse, é necessária a utilização de marcadores moleculares altamente informativos.

Os microssatélites têm sido relatados como os marcadores moleculares mais efetivos para a estimativa de parâmetros populacionais e para análise da estrutura populacional, fluxo gênico, estruturas de *pedigree* e a incidência da deriva genética (Heywood & Iriondo, 2003; Oliveira *et al.*, 2006). Isto se deve ao fato destes marcadores encontrarem-se bem distribuídos no genoma vegetal, podendo detectar locos simples, altamente polimórficos e de natureza codominante (Morgante & Olivieri, 1993; Hancock, 1999). Além disso, diferentes estudos têm mostrado que, devido à homologia das sequências de genomas de espécies próximas, a transferabilidade de marcadores moleculares microssatélites é viável.

A capacidade de transferir e aplicar de um conjunto de *primers* para amplificar determinados locos microssatélites pode facilitar significativamente os estudos entre espécies estreitamente relacionadas. Isso se torna muito importante quando se conta com orçamentos limitados para estudos genéticos dirigidos à conservação de táxons endêmicos, reduzindo o custo para desenvolver microssatélites específicos para espécies do mesmo gênero (Pinheiro *et al.*, 2009).

Em este contexto, o presente estudo teve a finalidade de avaliar a diversidade e estrutura genética em populações de *Masdevallia scandens*, *M. solomonii* e *M. yungasensis* presentes dentro do PN-ANMI Cotapata, mediante o desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites, de modo a gerar subsídios para o estabelecimento de medidas de conservação efetivas.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a diversidade e estrutura genética em populações de *Masdevallia scandens*, *M. solomonii* e *M. yungasensis* ocorrentes no PN-ANMI Cotapata Bolívia, a modo de gerar subsídios para o estabelecimento de medidas de conservação efetivas.

Os objetivos específicos:

- Desenvolver marcadores moleculares microssatélites para *Masdevallia solomonii* e determinar o potencial de transferibilidade em *M. scandens* e *M. yungasensis*.
- Avaliar a diversidade e estrutura genética em populações de *Masdevallia scandens*, *M. solomonii* e *M. yungasensis* ao longo de um gradiente altitudinal de 2.500 – 3.200 m.s.n.m no PN-ANMI Cotapata, Bolívia.
- Determinar o grau de endogamia em *Masdevallia scandens*, *M. solomonii* e *M. yungasensis*.
- Verificar a existência de híbridos interespecíficos ou indivíduos introgridos nas populações estudadas.
- Delinear medidas para a conservação e/ou manejo das populações avaliadas.

NÍVEL E DISTRIBUIÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

A diversidade genética pode ser analisada em diferentes níveis: indivíduos, populações e espécies. Nos indivíduos, esta é evidenciada pela presença de homozigotos ou heterozigotos. Dentro das populações, interessa conhecer que indivíduos apresentam alelos diferentes, uma vez que nas espécies diplóides não podem ocorrer mais de dois alelos por loco, portanto nenhum indivíduo pode apresentar toda a diversidade existente na população. No nível específico, a diversidade pode ser evidenciada observando a variação das frequências alélicas entre as populações (Lowe *et al.*, 2005).

Características diversas da história de vida de uma espécie determinam a manutenção de diferentes níveis de diversidade genética e a distribuição desta entre as suas populações (Hamrick & Godt, 1996). A maneira a qual a variabilidade genética esta distribuída entre e dentro das populações é conhecida como estruturação genética. Esta se refere à distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e tempo, como resultado da ação das forças evolutivas (mutação, migração, seleção e deriva genética) que atuam de diferentes modos em cada espécie e população (Hamrick, 1982).

Medidas da variabilidade e estrutura genética

Diferentes parâmetros têm sido descritos para o estudo da variabilidade e estrutura genética dentro e entre as populações naturais (Berg & Hamrick, 1997, Cole, 2003). Os principais são:

- **Porcentagem de locos polimórficos (P)**. Definido como a porcentagem de *loci* amostrados que são polimórficos. Um loco é considerado polimórfico se apresenta mais de um alelo. No entanto, para um loco ser polimórfico, o alelo mais comum dentro deste, deveria se apresentar em frequências menores a 95% ou 99, dependendo do critério a ser utilizado.
- **Riqueza alélica (AR)**. Medida do número médio de alelos independente do tamanho da amostra.
- **Alelos por loco (Na)**. Número de alelos por loco polimórfico.
- **Heterozigosidade total (He)**. Denominado também como diversidade gênica ou diversidade genética total. É calculada de acordo com a seguinte equação:

$$H_e = 1 - \sum (p)^2$$

Onde p é a frequência de cada alelo encontrado em um determinado loco.

- **Heterozigosidade média ($\overline{H_e}$).** Conhecido também como diversidade gênica média ou índice de polimorfismo. Corresponde à proporção de locos heterozigotos por indivíduo assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. É definida como:

$$\overline{H_e} = \sum \frac{H_e}{n}$$

Onde n é o número total de locos analisados.

- **Heterozigosidade observada (H_o).** É a frequência observada de indivíduos heterozigotos na população.
- **Coefficiente de endogamia (F_{IS} , G_{IS}).** Conhecido como índice de fixação, mede a probabilidade de que os indivíduos sejam idênticos por ascendência. Este parâmetro é amplamente utilizado para descrever a estrutura da população (Nagylaki, 1998).
- **Proporção da diversidade genética entre populações (F_{ST} , R_{ST} , G_{ST} , G'_{ST} , G''_{ST} , e D).** Refere-se ao nível de diferenciação genética entre as populações estudadas. O cálculo de cada uma dessas estimativas considera um modelo que explica a evolução dos locos microssatélites. O coeficiente F_{ST} é baseado no modelo “Alelos Infinitos” (Kimura & Crow, 1964) e estimado pela estatística F de Wright (Weir & Cockerham, 1984); enquanto o coeficiente R_{ST} , considera o modelo “Mutações aos Passos” (Ohta & Kimura, 1973), estimado pela estatística R_{ST} de Slatkin (Slatkin, 1995).

O coeficiente G_{ST} (Nei, 1987) é uma extensão direta do trabalho de Wright (1943), baseado na comparação da heterozigosidade (diversidade gênica) dentro e entre as populações; deste derivam-se o G'_{ST} (Hedrick, 1999) e G''_{ST} (Hedrick, 2005). Mais recentemente, têm-se proposto o índice D (Jost, 2008) baseado no número efetivo de alelos.

- **Fluxo gênico (Nm).** Refere-se ao número de migrantes por geração (o produto do tamanho populacional, N , e a proporção de imigração, m). O número efetivo de migrantes ($N_e m$) pode ser calculado a partir da estatística F_{ST} , uma vez que o fluxo gênico encontra-se inversamente relacionado com o nível de diferenciação entre as populações.

$$N_e m = \frac{1 - F_{ST}}{4 \times F_{ST}}$$

- **Número total de alelos (A).**

A porcentagem de locos polimórficos (P), o número total de alelos (A) e a diversidade genética (He) podem ser calculados como valores totais para as espécies ou como a média das populações individuais, designadas como P_s ou P_p , respectivamente (Cole, 2003). Ambas as medidas são importantes para o desenvolvimento de estratégias de conservação (Hamrick *et al.*, 2006).

A frequência de heterozigotos pode também ser considerada como um indicador da diversidade genética (Weir, 1996), uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes, representando melhor a variação existente. No entanto, a heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (Nei, 1973) é considerada uma medida mais apropriada para representar a variação nas populações naturais. O número de alelos por loco e a heterozigosidade esperada são muito influenciados pela deriva genética, em razão dos alelos raros (com frequência inferior a 0,05) não serem retidos em pequenas amostras (Raposo *et al.*, 2007).

FATORES QUE INFLUENCIAM A DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA

Devido a seu caráter sedentário, as plantas desenvolvem uma forte estrutura genética em uma variedade de escalas espaciais (Vekemans & Hardy, 2004). Em determinadas circunstâncias, por exemplo, a colonização de novos habitats a estrutura genética espacial (SGS) pode se desenvolver rapidamente e ser muito persistente (Epperson, 1990).

Dentro de uma população, a repartição da variação é devida em grande parte à forma de vida e ao sistema de reprodução. A esse respeito, têm-se identificado algumas tendências, como por exemplo, espécies autógamas geralmente mantêm uma forte estrutura genética em comparação com as espécies alógamas (Hamrick *et al.*, 1992); um padrão similar acontece com plantas cuja dispersão de sementes é mediada pela gravidade em comparação àquelas espécies zoocóricas (Degen *et al.*, 2004). Isso denota que, além da possível influência de fatores altamente localizados, como a variação espacial na distribuição das espécies e seleção por variação do microhabitat (Epperson, 1993), a SGS é fundamentalmente correlacionada com o grau de limitação na dispersão de sementes e pólen (Degen *et al.*, 2004; Vekemans & Hardy, 2004; Cavers *et al.*, 2005).

Sistemas reprodutivos

Os sistemas reprodutivos são considerados, em geral, determinantes na composição e distribuição da variabilidade genética em populações vegetais (Lande & Shemske, 1985). Em interação com o tipo de sistema reprodutivo, a forma de vida tem uma forte influência na diversidade genética de uma espécie. Assim, por exemplo, alguns estudos revelam que as espécies anuais autógamas apresentam menos locos polimórficos e diversidade genética (H_e), a qual se encontra partilhada entre as suas populações; em contraste, as espécies perenes e alógamas apresentam uma alta diversidade genética relativa e pequena diferenciação entre as suas populações (Hamrick *et al.*, 2006).

A estrutura floral das orquídeas é altamente especializada para a polinização cruzada mediada por insetos (Dressler, 1981). A diversidade de morfologias florais e estratégias reprodutivas (por exemplo, o engodo sexual e alimentar) evitam a ocorrência de autopolinização espontânea em orquídeas. Contudo, em alguns casos, quando estes mecanismos são ineficientes ou inexistentes, barreiras genéticas, como a presença de alelos recessivos, podem evitar que frutos sejam formados através de autopolinização (Tremblay, 1992).

As orquídeas são tipicamente autocompatíveis, e por isso as barreiras genéticas frequentemente se apresentam em espécies polinizadas por insetos que permanecem sobre as flores e inflorescências por longo tempo e que favorecem a geitonogamia (dípteros, por exemplo; Christensen, 1994; Borba *et al.*, 2001). Dessa maneira, os cruzamentos não-aleatórios podem resultar de autogamia mediada por insetos, autopolinização geitonogâmica e endogamia biparental (Wong & Sun, 1999).

Em plantas a endogamia acontece principalmente por duas vias: i) através de autofecundação, e ii) através de cruzamentos entre indivíduos emparentados ou endogamia biparental (Ellstrand & Elam, 1993). A autofecundação é a forma mais extrema de endogamia. Esta pode ser evitada por mecanismos de autocompatibilidade ou por dioecia (Barret & Kohn, 1991). Entretanto, a endogamia biparental parece ocorrer principalmente quando as populações são pequenas, ou quando os indivíduos apresentam agrupamento espacial, resultado da dispersão restrita de pólen e sementes (Turner *et al.*, 1982).

Depressão endogâmica

A depressão endogâmica ocorre quando a autofecundação produz uma descendência menos viável ou menos fértil em relação à derivada da fecundação cruzada na média da população (Slate *et al.*, 2004). A redução na fertilidade deve-se à expressão de alelos recessivos letais na progênie, que ocorre quando espécies que são de natureza alógama passam a experimentar processos endogâmicos. Dessa forma, a depressão endogâmica parece explicar a evolução e manutenção dos sistemas reprodutivos que favorecem a fertilização cruzada (Husband & Schemske, 1996).

A magnitude de depressão endogâmica experimentada por uma espécie é fortemente influenciada pelas características demográficas da população e sistema de cruzamentos dentro dela. Os modelos clássicos de depressão endogâmica prevêm que uma população com uma história longa de efeitos gargalo e isolamento deixaria de ser severamente afetada pela endogamia porque os alelos deletérios na condição homozigótica são eliminados através da exposição repetida à seleção natural ao longo das gerações (Lande & Schemske, 1985).

Fluxo gênico

A estruturação genética reflete o número de alelos trocados entre as populações, sendo o maior efeito deste fluxo gênico, a alteração da composição genética dos próprios indivíduos ao introduzir nova variação, gerando novas combinações gênicas sobre as quais a seleção pode potencialmente atuar (Stalkin, 1985; Balloux & Moulin, 2002). Em interação com os sistemas de reprodução cruzada, o fluxo gênico entre as populações incrementa o tamanho populacional efetivo providenciando a capacidade de resistir às mudanças aleatórias nas frequências alélicas (deriva genética), preservando a diversidade genética e reduzindo a endogamia (Ellstrand, 1992).

O fluxo gênico homogeneiza as frequências alélicas entre as populações (Balloux & Moulin, 2002). Quando este é elevado, opõe-se à adaptação local (ou seja, à fixação de alelos, que é favorecida em condições locais) e, portanto, também impede o processo de especiação (Barton & Hewitt, 1985).

A dispersão e o estabelecimento de genes dentro de novos *pools* gênicos através do fluxo gênico é o fator evolutivo que modela a composição genética das espécies (Hamrick, 1987). Este aspecto é especialmente importante para compreender os limites do fluxo gênico em habitats que sofrem fragmentação antrópica, onde o tamanho populacional é

drasticamente reduzido em comparação às condições antes dos distúrbios (Trapnell *et al.*, 2005).

Em orquídeas, o nível de estruturação genética é grandemente influenciado pelo comportamento do polinizador, uma vez que sob condições naturais a proporção de sementes por fruto é predominantemente dependente do polinizador (Cozzolino & Widmer, 2005; Tremblay *et al.*, 2005). Na maioria dos casos, o intercâmbio gênico entre as populações, gerado pelo movimento das sementes, pode ser ainda mais importante do que o pólen (Peakall & Beattie, 1991). Isso se deve ao fato das orquídeas possuírem sementes muito pequenas, as quais podem ser dispersas pelo vento a longas distâncias (Dressler, 1993; Ackerman & Ward, 1999), promovendo, assim, a homogeneidade genética entre as populações.

No entanto, alguns estudos têm mostrado que a maioria das sementes de orquídeas se estabelece perto e embaixo da planta mãe, dando lugar a uma estrutura genética espacial em fina escala (entre indivíduos dentro das populações) (Chung *et al.*, 2004; Trapnell *et al.*, 2004; Alcântara *et al.*, 2006).

EPIFITISMO E DIVERSIDADE GENÉTICA

Embora a maioria das orquídeas sejam epífitas (20.000 espécies, aproximadamente), grande parte dos estudos da diversidade genética tem sido dirigida a orquídeas terrestres (Forrest *et al.*, 2004), existindo poucos trabalhos publicados sobre epífitas (Murren, 2003; Trapnell *et al.*, 2004; Alcântara *et al.*, 2006, Vargas *et al.*, 2006).

Considerando que as orquídeas epífitas encontram-se distribuídas em três dimensões, um indivíduo pode estar rodeado por mais indivíduos do que se fosse terrestre. Isto afetaria a distribuição espacial da variação genética dentro das populações. Desta maneira, dependendo do modo predominante de reprodução, a estrutura genética de uma orquídea epífita poderia diferir entre o plano vertical e horizontal dentro da árvore, (Trapnell *et al.*, 2004).

Em epífitas que têm especificidade pelo forófito (hospedeiro), a ação da deriva genética e os eventos fundadores podem determinar a estrutura genética das populações (Tremblay & Ackerman, 2001). Em um nível biogeográfico, a distribuição descontínua das epífitas (*patches*) tem sido sugerida como uma força que induz o isolamento entre as

populações e promove uma rápida evolução (Gentry & Dodson, 1987; Tremblay & Ackerman, 2001).

O fluxo gênico em espécies epífitas tem sido mencionado como podendo ser mais susceptível a mudanças ambientais do que em outras formas de vida, principalmente devido às características do hábitat, a distribuição em *patches* e as estratégias de polinização específicas das espécies envolvidas (Ackerman & Ward, 1999; Tremblay & Ackerman, 2001; González-Astorga *et al.*, 2004; Trapnell *et al.*, 2005). Além disso, mudanças na dinâmica do polinizador afetariam mais intensamente as pequenas populações restritas aos remanescentes de vegetação, quando comparadas com as grandes populações (Alcántara, *et al.*, 2006).

Alguns estudos em orquídeas epífitas têm mostrado que, em geral, elas “guardam” alta diversidade genética e uma baixa estrutura populacional (Borba *et al.*, 2001; Trapnell *et al.*, 2005; Avila-Diaz & Oyama, 2007), constituindo-se este fato em uma vantagem adaptativa para viver em hábitats descontínuos e com frequentes mudanças (Ávila-Díaz & Oyama, 2007).

Tudo o anteriormente mencionado mostra que as epífitas representam um modelo ideal para estudar a estrutura genética populacional e a especiação genética, devido ao hábito de colonização, os padrões desiguais de distribuição ecológica e geográfica, assim como as estratégias específicas de polinização que apresentam (Ackerman & Ward, 1999).

HIBRIDAÇÃO NATURAL EM ORCHIDACEAE

A hibridação é um processo que acontece predominantemente em plantas (Anderson, 1949; Stebbins, 1959; Arnold, 1992), nas quais pode atuar como um rápido processo de evolução (Arnold, 1997) que promove a especiação (especiação híbrida), ou como uma via que incrementa a variabilidade em espécies parentais através da introgressão (Klier *et al.*, 1991).

A ocorrência de hibridação introgressiva (*i.e.* introgressão) tem sugerido a hipótese que esta é tanto o resultado de uma hibridação natural, porém também um passo intermediário para outros eventos evolutivos. Neste sentido, Arnold (1992) indica que a introgressão poderia ocasionar: a) a redução de barreiras para a reprodução sexual, b) uma mudança no valor adaptativo no táxon que é introgridido, c) um mecanismo de expansão

das linhagens geradas em habitats que diferem da dos táxons parentais, ou d) um evento de especiação híbrida.

A especiação híbrida pode ocorrer por uma de duas vias: especiação homoplóide, que envolve a hibridação entre dois táxons sem mudança na ploidia, e a especiação alopoliplóide, quando os descendentes da hibridação sofrem posterior poliploidização para restauração da fertilidade (Hegarty & Hiscock, 2004). Os híbridos derivados podem se estabelecer por diferentes mecanismos: apomixia, formação de barreiras de esterilidade cromossômica, isolamento ecológico como resultado da colonização de novos habitats, ou formação de barreiras reprodutivas extrínsecas, tais como adaptação a diferentes polinizadores em relação às espécies parentais (Barton & Hewitt, 1985).

Embora a maioria dos híbridos naturais apresente uma redução na viabilidade do pólen e sementes, os indivíduos híbridos férteis podem atuar como vias para a introgressão e fluxo gênico entre parentais (Anderson, 1949) ou chegar a serem novas espécies se estes estiverem reprodutivamente isolados de ambos parentais (Arnold, 1992, Ungerer *et al.*, 1998). Enquanto os híbridos alopoliplóides geralmente não dão lugar à introgressão com os seus parentais, devido às diferenças na ploidia (Petit *et al.*, 1999), nos híbridos homoplóides outros fatores devem influenciar o isolamento pós-zigótico dos parentais.

A especiação híbrida homoplóide é mais difícil de definir uma vez que se retrocruzamentos estiverem envolvidos, a fração de cada parental raramente vai ser de 50%. Os híbridos homoplóides podem estar apenas fracamente isolados reprodutivamente, sendo difíceis de distinguir das espécies parentais devido ao ganho de alelos por hibridação e introgressão, ou a persistência de polimorfismos ancestrais (Mallet, 2007).

Hibridação em orquídeas

As barreiras que evitam a hibridação dentro das espécies de orquídeas são geralmente mecânicas ajudando a que espécies próximas forem potencialmente inter-férteis (van der Pijl & Dodson, 1966; Borba & Semir, 1999; Borba *et al.*, 2001). Os principais fatores que previnem a hibridação em Orchidaceae são os mecanismos pré-polinização, tais como: a especificidade pelo polinizador, fenologias separadas e barreiras mecânicas (van der Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981; Gill, 1989), enquanto as barreiras genéticas (pós-polinização) entre espécies próximas com frequência são débeis ou ausentes (van der Pijl & Dodson, 1966, Dressler, 1981).

Em Orchidaceae, os híbridos naturais são esporádicos e usualmente ocorrem entre espécies próximas que crescem em simpatria. Eles podem ser encontrados como indivíduos isolados ou dentro de populações hibridogênicas (Barton & Hewitt, 1985). Híbridos interespecíficos têm sido reportados em diferentes gêneros de Orchidaceae correspondentes a espécies de regiões temperadas, como *Pterostylis* (Sharma & Jones 1999), *Orchis* (Pellegrino *et al.*, 2000), *Cypripedium* (Klier *et al.*, 1991) e *Dactylorhiza* (Hedrén, 1996); existindo poucos casos bem documentados em gêneros tropicais (Nielsen & Siegiesmund, 1999), *Bulbophyllum* Thouars (Azevedo *et al.*, 2006), e *Epidendrum* L. (Pinheiro *et al.*, 2010).

Poucos híbridos naturais têm sido reportados em *Masdevallia* (Luer, 2000; Luer 2003 *apud* Abdele, 2007), entre eles: *Masdevallia* \times *splendida*, proveniente do cruzamento entre e *M. veitchiana* e *M. barleana*. Entre os possíveis híbridos naturais encontram-se *M. \times alvaroi*, *M. \times ligiae*, *M. \times mystica*, *M. \times parlatoreana*.

A identificação de híbridos naturais através da observação dos caracteres morfológicos eventualmente cria problemas na sobreposição dos caracteres híbridos com aqueles das espécies parentais, já que os híbridos resultantes de retrocruzamento ou introgressão são difíceis de identificar (Mallet, 2007). Este problema é agora resolvido através do uso de técnicas moleculares tais como: padrões de bandejamento de isoenzimas, DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), sequenciamento de DNA e microssatélites (SSRs).

MARCADORES MICROSSATÉLITES

Os microssatélites são sequências simples repetidas (SSRs) dispostos em *tandem*, observados principalmente no genoma nuclear dos organismos eucarióticos (Powell *et al.*, 1996, Li *et al.*, 2002); em plantas os microssatélites estão também presentes nos cloroplastos (Cato & Richardson, 1996; Provan *et al.*, 2001) e mitocôndrias (Soranzo *et al.*, 1999).

Os SSRs não estão regularmente distribuídos dentro do genoma vegetal, existindo padrões específicos de distribuição nas sequências codificantes e não-codificantes, íntrons e regiões intergênicas. A frequência diferencial na qual os SSRs se apresentam dentro das mesmas parece se relacionar com as suas possíveis funções. Nesse sentido, alguns estudos indicam que os SSRs estão associados com a regulação e/ou o funcionamento de genes (Kashi & Soller, 1999; Tóth *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2002) e outras funções celulares (Li *et*

al., 2002), razão pela qual têm sido encontrados dentro ou próximos a genes, particularmente dentro de regiões não-codificantes 5' (Fujimori *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

As regiões que flanqueiam os microssatélites podem apresentar sequências de DNA geralmente conservadas entre os indivíduos da mesma espécie, o que permite a seleção de iniciadores específicos (*primers*) que amplificam por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) os fragmentos que contêm as sequências repetitivas (Oliveira *et al.*, 2006). Esta técnica revela o polimorfismo de um loco com base nas diferenças no número de repetições do motivo microssatélite naquele loco (Tautz, 1984).

Características

As sequências de microssatélites podem estar constituídas por 1-6 nucleotídeos repetidos, sendo denominados de acordo com o tipo de repetição: mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexa- nucleotídeos (motivo microssatélite). O número de repetições varia aleatoriamente (frequentemente 5-20 vezes) com um tamanho mínimo de 12 pares de bases (Ellegren, 2004).

Um loco microssatélite homocigoto tem o mesmo número de repetições em ambos os cromossomos homólogos, enquanto um loco heterocigoto apresenta diferente número de repetições para cada alelo (por exemplo, um alelo pode conter 10 repetições e o outro 12). Dentro da população, um mesmo loco pode conter em conjunto diferentes alelos com diferentes números de repetições (Oliveira *et al.*, 2006).

Os alelos microssatélites podem ser visualizados por métodos electroforéticos. Estes podem ser idênticos em estado (por exemplo, ter tamanho idêntico), embora não são necessariamente idênticos por descendência (homoplasia), devido a mutações convergentes que se produziram nas linhagens (Oliveira *et al.*, 2006).

Segundo o tipo sequências repetidas, os microssatélites podem ser classificados em: (i) motivos simples perfeitos, consistentes em uma sequência simples repetida (por exemplo: [AGG]_n); (ii) simples imperfeitos, quando se apresentam em uma ou mais unidades repetidas de diferentes tamanhos (exemplo: [AAC]_n[ACT] [AAC]_{n+1}); (iii) compostos perfeitos, quando apresentam dois ou mais motivos repetitivos diferentes e do mesmo tamanho (*e.g.*, [AGG]_n[AATC]_n); (iv) e compostos imperfeitos, quando são interrompidos por uma ou mais repetições de diferentes tamanhos (por exemplo, [GGAT]_n[ACT][GTAA]_{n+1}).

Mecanismos mutacionais

Os marcadores microsatélites apresentam uma alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração, constituindo-se, desta forma, na classe mais polimórfica de marcadores moleculares conhecidos na atualidade (Eisen, 1999). As mutações são causadas por alterações no número das unidades de repetição, sendo que a maioria dessas alterações resulta de mudanças no número integral de cópias das unidades de repetição (Eisen, 1999). Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a elevada taxa de mutação e a variabilidade dos microsatélites, as mais aceitas foram descritas por Eisen (1999), da seguinte maneira:

- *Crossing-over* desigual entre as cromátides, resultante da recombinação entre cromossomos homólogos que não foram alinhados corretamente.
- O deslizamento da DNA-polimerase durante a replicação do DNA, que ocorre em regiões do DNA que contêm sequências curtas repetidas em série, ocasionado por uma elevada taxa de erros de pareamento decorrentes do “escorregamento” da fita durante a replicação.

Em células pré-germinativas, as mencionadas alterações podem ser transmitidas aos descendentes (Ellegren, 2004).

Diferentes modelos mutacionais são utilizados para determinar o número de alelos esperados em uma população a partir de dados de heterozigotos observados e também para a análise estatística da variação genética. Os mais utilizados são:

- **Modelo “Alelos Infinitos” IAM (Kimura e Crow, 1964)**. Propõe que cada mutação em um loco microsatélite cria aleatoriamente, um novo alelo sem relação conhecida com outros alelos criados, não existindo pelo tanto, uma relação de ancestralidade entre eles.
- **Modelo “Mutações aos Passos” MMP (Ohta e Kimura, 1973)**. Sugere que cada aumento ou diminuição de uma unidade de repetição em um alelo microsatélite corresponde a passos evolutivos na formação dos alelos; sendo possível desta maneira, considerar uma relação de ancestralidade entre eles.

Considerando o processo de mutação em locos microsatélites tipicamente ocorrendo a taxas elevadas e com alterações em etapas (Modelo de Mutações aos Passos) no tamanho dos alelos, poderiam-se introduzir desvios quando se utilizam medidas clássicas de

diferenciação populacional baseadas na identidade dos alelos, por exemplo, o F_{ST} e a distância genética de Nei (1978).

A taxa de mutação é um parâmetro crítico nos modelos de genética populacional, uma vez que permite relacionar a variabilidade em locos microssatélites e a história de uma população ou a história de uma porção do genoma. Por exemplo, considerando a hipótese do modelo geral de mutação por passos, o conhecimento da taxa de mutação permitiria estimar o tempo de divergência entre as espécies (Goldstein *et al.*, 1995) e o tamanho efetivo populacional destas espécies (Slatkin, 1995).

Transferabilidade

A probabilidade de sucesso de uma amplificação heteróloga para uma sequência de DNA via PCR está inversamente relacionada a distancia evolutiva entre duas espécies (Zucchi, 2003). Nesse sentido, Barbará e colaboradores (2007) relataram que a transferabilidade parece bem sucedida, principalmente no nível infra-genérico, com uma estimativa de sucesso de até 60% em dicotiledôneas e de 40% em monocotiledôneas estreitamente relacionadas.

No entanto, se estima que entre gêneros as taxas de transferabilidade alcançadas sejam apenas ao redor de 10% em eudicotiledôneas, valor que é pouco provável de se obter em algumas monocotiledôneas como as orquídeas, sem ter que desenvolver novos marcadores. Uma exceção entre as monocotiledôneas são as radiações adaptativas com baixos níveis de divergência em Bromeliaceae, onde os marcadores são facilmente transferidos tanto entre as espécies da mesma subfamília quanto fora dela (Palma-Silva *et al.*, 2006; Barbará *et al.*, 2007).

Em orquídeas, têm-se relatado o sucesso na transferibilidade de *primers* microssatélites desenvolvidos para espécies pertencentes ao mesmo gênero (Swarts, *et al.*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2008) ou até entre diferentes gêneros (Cortés-Palomec *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2009).

METODOLOGIA GERAL

Área de estudo

O "Parque Nacional y Área Natural de Manejo Integrado Cotapata" (PN-ANMI Cotapata) encontra-se localizado na Cordilheira Andina Oriental, entre a vertente oriental da Cordilheira Real e os Yungas de La Paz, (16° S 68° O), e entre as províncias Murillo e Nor Yungas do Departamento de La Paz (Bolívia). Abrange uma área de 61.000 ha em altitudes que variam de 1100 a 5600 *m.s.n.m.* (Sevilla-Callejo & Mata-Olmo, 2007). Este amplo gradiente de altitude origina uma grande variedade de climas e de tipos de vegetação. A heterogeneidade topográfica também foi afetada por antigas e recentes atividades humanas, como a construção de trilhas pré-colombianas e estradas.

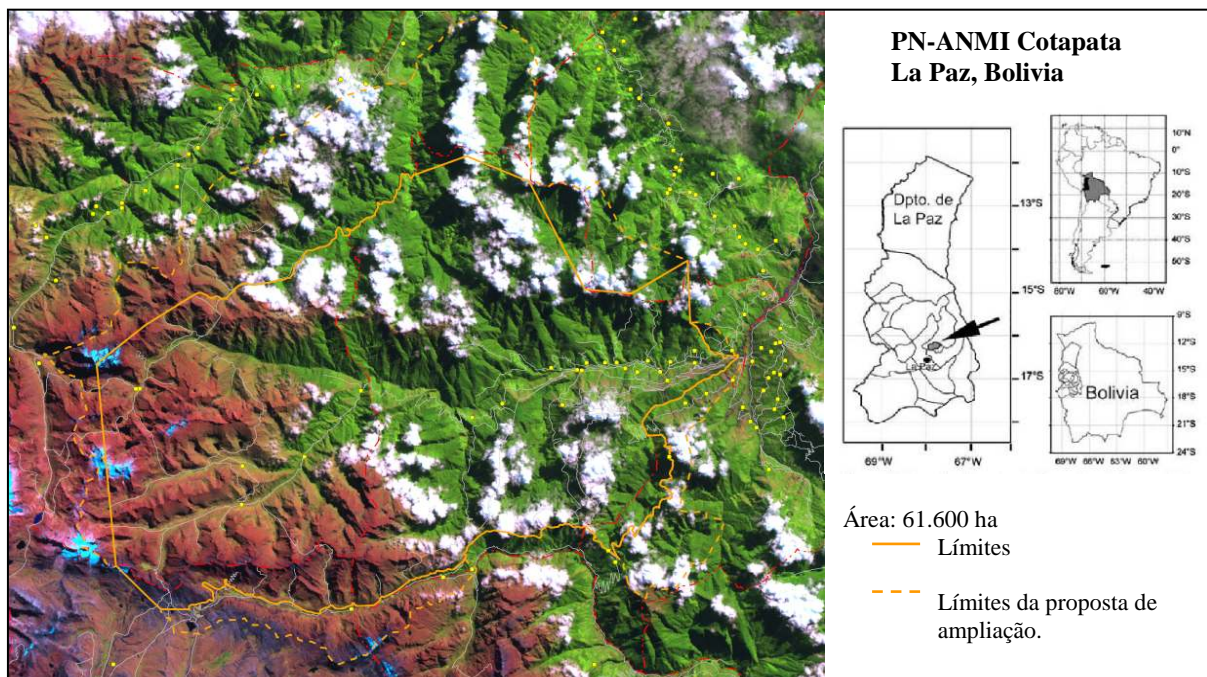


Figura 1: Parque Nacional e Área Natural de Manejo Integrado Cotapata (PN-ANMI Cotapata), La Paz, Bolívia; Cortesia: Sevilla-Callejo (2010).

Segundo critérios de estrutura da vegetação e composição florística de espécies, Gerold *et al.* (2008) nos Yungas podem ser reconhecidos três tipos de formações vegetais:

Floresta montana inferior

Com um limite superior de 2.150 m, possui um dossel alto e denso (20 m de altura) com árvores emergentes de até 35 m. *Myrsine coriacea* (Sw.) R.Br. ex Roem. & Schult. é a espécie arbórea dominante, enquanto *Blechnum ensiforme* Liebm. e *Philodendron ornatum* Schott prevalecem no sub-dossel.

Floresta montana nebular superior

Este tipo de floresta se caracteriza pela incidência persistente de núvens, o que ocasiona um clima úmido e frio. Predominam *Podocarpus oleifolius* D. Don ex Lamb., *Weinmannia crassiflora* Ruíz & Pavón, e *Clusia multiflora* Kunth. O dossel é fechado e mais baixo do que a floresta montana inferior, chegando até 15 m. A abundância de epífitas, principalmente briófitas é de ser ressaltada, estimando-se uma capa briofítica sobre o solo de quase 45%.

Floresta nebular sub-andina

Apresenta-se acima de 2.800 m, com predomínio de árvores de *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. e *Podocarpus rusbyi* J.Buchholz & N.E.Gray. O dossel aberto chega até 10 m. Arbustos escleromórficos como *Miconia* spp. Ruiz & Pav., *Gaultheria pernettyoides* Sleumer, *Gynoxys* spp. Cass, *Ilex* spp. L. e *Escallonia myrtilloides* L.f. são abundantes. A cobertura briofítica na superfície do solo aumenta até 75%, com domínio de diferentes espécies de *Sphagnum* L.

Nos Yungas, Orchidaceae encontra-se principalmente representada por *Stelis* Sw., *Pleurothallis* R.Br., *Epidendrum* L. e *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Vásquez *et al.*, 2003, 2004; Jiménez & Miranda, 2007), sendo que 314 espécies ocorrem entre 350 a 4.000 m (Krömer *et al.*, 2005), e aproximadamente 255 entre 1.300 a 3.400 m.s.n.m. (Jiménez & Miranda, 2007).

No sudeste do PN-ANMI Cotapata encontram-se duas trilhas pré-colombianas: Chojllapata e Sillutinkara, as quais foram construídas atravessando os mencionados tipos de florestas (Figura 2).



Figura 2: Floresta nebulosa montana e floresta montana inferior, correspondentes ao PN-ANMI Cotapata.

A trilha pré-colombiana Chojllapata está localizada na parte alta das montanhas (1.300 – 3.400 m.s.n.m) e se caracteriza por apresentar zonas pouco antropizadas, com vegetação bem preservada, e a presença de grandes árvores de *Clusia* spp. L., que expõem 80% de cobertura de briófitas (Figura 3). Alguns setores da trilha atravessam também as florestas secundárias, onde se observa um sub-dosel pouco denso com presença dominante de *Chusquea* spp. Kunth. e espécies de Ericaceae, com muitas árvores caídas.

No caso da Sillutinkara, esta se encontra atravessando o vale do rio Coscapa (2000 - 3400 m.s.n.m.). A vegetação é predominantemente floresta secundária, no entanto, apresenta também ladeiras de floresta primária (Jiménez & Miranda, 2007). O acesso às mencionadas trilhas pré-colombianas é possível desde a localidade denominada Chuspipata, a qual se encontra entre os 3.200 - 3.300 m.s.n.m. Esta localidade apresenta elevada umidade e múltiplos estratos de vegetação.

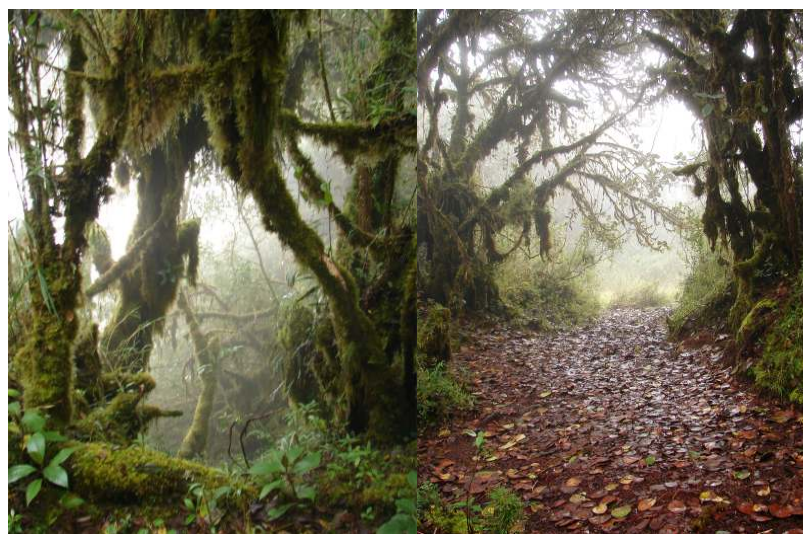


Figura 3: Características do microhabitat em uma das populações de *Masdevallia* ocorrente na trilha pré-colombiana Chojllapata do PN-ANMI Cotapata.

Espécies em estudo

***Masdevallia* Ruiz & Pav.**

Masdevallia inclui aproximadamente entre 500 a 600 espécies (Luer, 2003 *apud* Abdele, 2007), distribuídas desde México ao sul do Brasil, com o centro de diversidade nos Andes sulamericanos da Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia; estimando-se que apenas 50 espécies se encontram na América Central e menos de 15 espécies no Brasil (Abdele, 2007). A maioria das espécies apresenta o hábito epifítico e cresce nas florestas úmidas montanas, entre os 1500 e 3500 *m.s.n.m.* (Vásquez & Ibich, 2000; Abdele, 2007).

Na Bolívia, a maior parte das espécies de *Masdevallia* cresce nas florestas montanas úmidas dos Yungas, florestas de neblina, e florestas do piemonte da Cordilheira Oriental dos Andes, sendo poucas as espécies que se encontram nas florestas caducifólias da formação boliviana- tucumano (Vásquez & Ibich, 2000).

Morfologia

As espécies em estudo (*Masdevallia solomonii*, *M. scandens* e *M. yungasensis*) caracterizam-se por serem plantas pequenas e perenes, com ramicaules curtos produzidos sucessivamente a partir de um rizoma grosso. O rizoma é significativamente alongado em *M. scandens*. Os ramicaules são eretos, mais curtos do que as folhas, cobertos parcial ou totalmente por bainhas, imbricadas.

As folhas são finas e elípticas, com nervuras paralelas, sub-pecioladas, e de ápices agudos, levemente decotados com um mucro no seno; a base foliar é estreitamente cuneada, com um pecíolo canalizado (Abdele, 2007).

Possuem flores simples, sustentadas por um pedúnculo sub-cilíndrico que emerge lateralmente a partir de um anel pouco definido próximo ao ramicaule. As flores zigomorfas encontram-se protegidas por uma bráctea subterminal (Abdele, 2007) e apresentam sépalas conspícuas, conadas; carnosas, glabras em *Masdevallia yungasensis*, e pubescentes em *M. solomonii* e *M. scandens*. O ápice das sépalas apresenta segmentos alongados denominados caudas, as quais são mais compridas em *M. scandens* em comparação com as outras espécies (Figura 4).



Figura 4: Características florais: A) *Masdevallia scandens*, B) *M. solomonii*, C) *M. yungasensis*.

As pétalas são pequenas e inconspícuas, mais curtas do que as sépalas, e apresentam consistência cartilaginosa, com um dente retrorso bem desenvolvido a partir do calo, perto da base na margem do labelo. O labelo é carnoso e menor do que às pétalas laterais, sendo o disco do labelo liso ou com um par de calos paralelos na parte inferior. A coluna é subcilíndrica com uma base prolongada, formando um pé engrossado no ápice do ovário. O rostelo é retrorso, e a antera ventral contém duas polínias amarelas (Vásquez, 2000; Abdele 2007).

Ecologia

Masdevallia yungasensis, *M. solomonii* e *M. scandens* encontram-se distribuídas em um gradiente altitudinal de 2.500 – 3.100 *m.s.n.m.* Em altitudes elevadas, o microclima caracteriza-se por apresentar temperaturas oscilantes entre 5° e 14 °C, podendo estas serem mais extremas em alguns meses. A umidade relativa varia de 60 - 95%, chegando até 95% nos meses chuvosos. Entre 2.800 e 3.100 *m.s.n.m.* é possível encontrar as três espécies crescendo em simpatria, inclusive sobre a mesma árvore hospedeira (forófito). Aparentemente, as espécies não apresentam especificidade pelo forófito. Porém, Moya (com. pess.) observou que os indivíduos encontram-se associados com maior frequência a *Weinmannia* e *Clusia*, distribuindo-se principalmente nas zonas inferiores de Johansson (1974) entre 1 - 1,5 m sobre a superfície do solo, onde a cobertura de briófitos é abundante.

Dentro da zona de estudo, *Masdevallia yungasensis* e *M. solomonii* florescem nos meses de maior precipitação (outubro a fevereiro), apresentando a frutificação desde dezembro até maio. *M. scandens* começa a floração em agosto, frutificando desde fevereiro até maio. Ressalta-se que os padrões de floração e frutificação em *M. yungasensis* e *M. solomonii* são similares. Contudo, *M. scandens* que inicia a floração antes, e coincide com as outras espécies na época de frutificação (Figura 5).

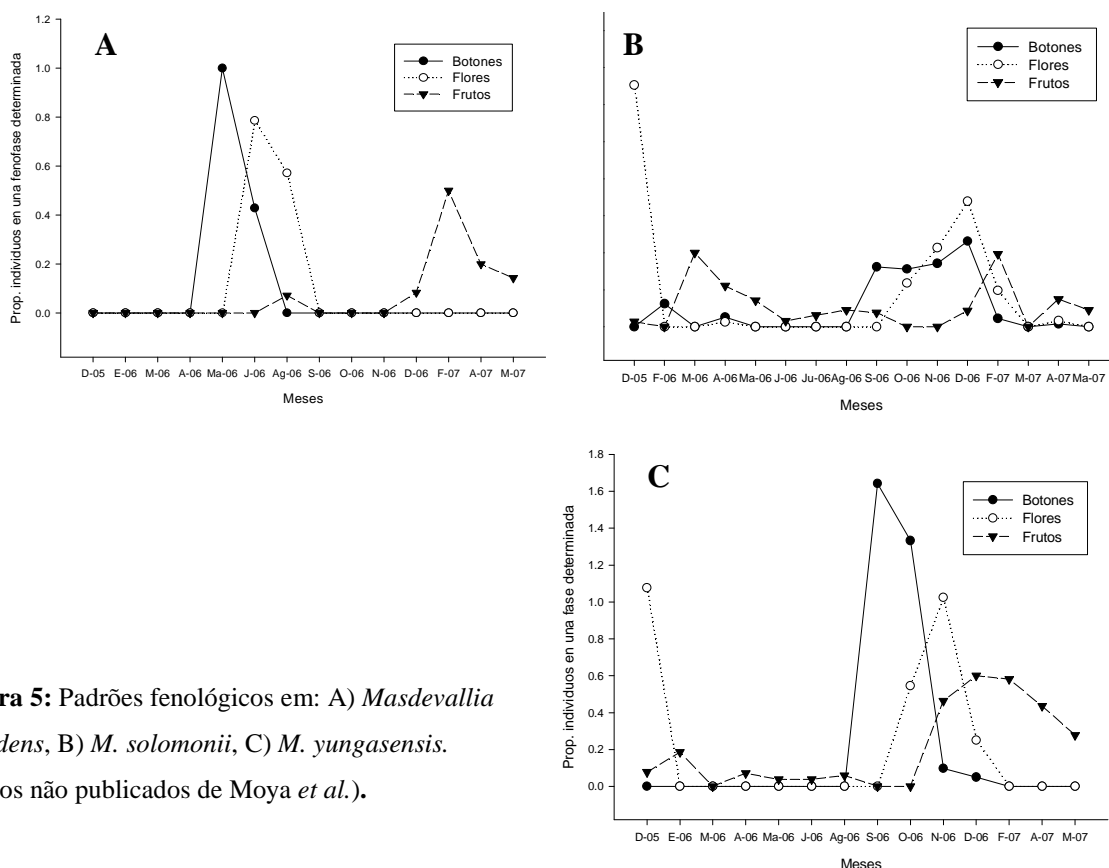


Figura 5: Padrões fenológicos em: A) *Masdevallia scandens*, B) *M. solomonii*, C) *M. yungasensis*. (Dados não publicados de Moya *et al.*).

Distribuição das espécies em estudo

Dentro do PN-ANMI Cotapata, têm sido relatadas populações de *Masdevallia scandens*, *M. solomonii* e *M. yungasensis* ao longo das trilhas pré-colombianas Chojllapata e Sillutinkara em um gradiente de 2.800 a 3.200 *m.s.n.m.* (Moya, com. pess), e na localidade de Chuspipata (Figura 6). Em alguns casos, as espécies compartilham do mesmo tipo de micro-habitat. *M. solomonii* é a espécie melhor distribuída altitudinal e geograficamente, seguida por *M. yungasensis*, a qual, no entanto, possui algumas populações que apresentam um maior número de indivíduos. *M. scandens* apresenta populações menores com distribuição altitudinal mais restrita. Também foram registrados indivíduos isolados de *M. solomonii* e *M. yungasensis* entre algumas das populações e ainda a 2.500 *m.s.n.m.*

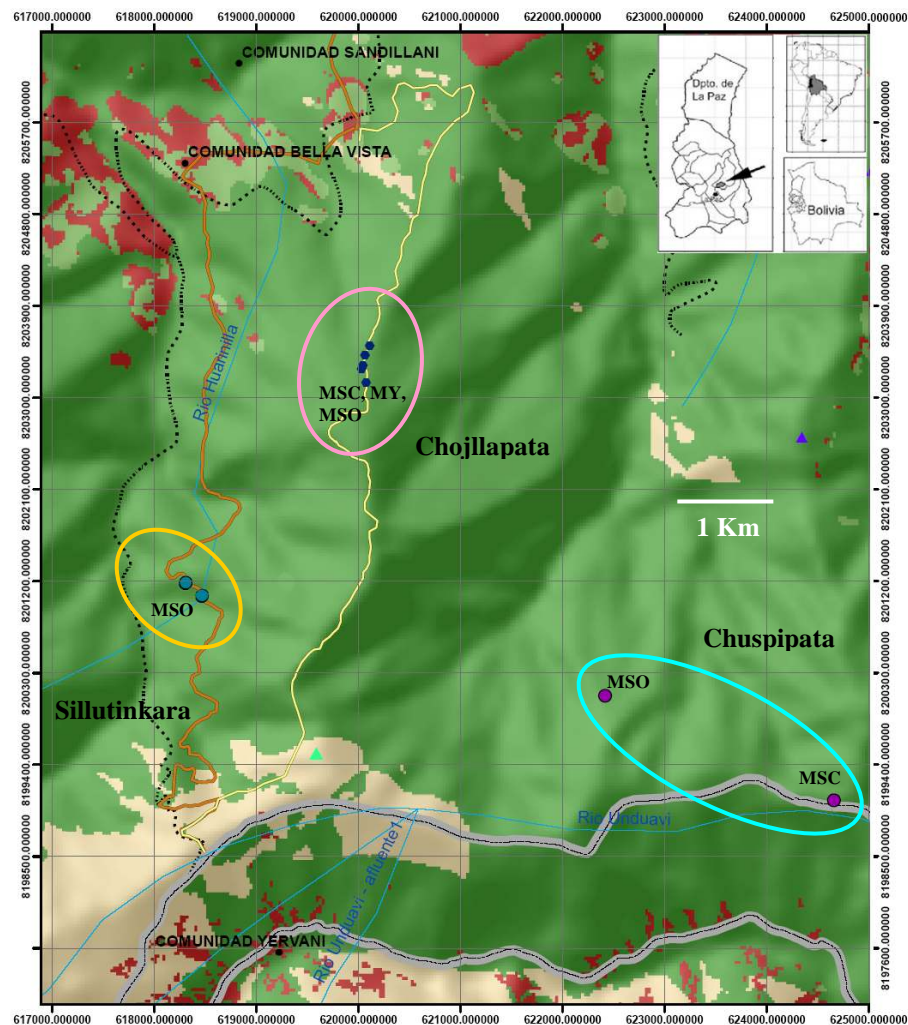


Figura 6: Localização das populações de *Masdevallia scandens* (MSC), *M. solomonii* (MSO) e *M. yungasensis* (MY) ocorrentes nas trilhas pré-colombianas Chojllapata, Sillutinkara, e na localidade de Chuspipata dentro do PN-ANMI Cotapata.

Mapeamento e coleta

Em cada uma das populações, os indivíduos correspondentes às espécies em estudo foram codificados e quantificados para ter uma estimativa do tamanho populacional, em função da qual foi feita a coleta de amostras foliares.

Pela necessidade de obter uma amostra representativa das populações para realizar as análises da diversidade e estrutura genética, tentou-se incluir uma maior quantidade possível de indivíduos. No entanto, considerando que as espécies em estudo são raras, o número de indivíduos coletados por população variou de 10 – 26, uma vez que foram coletados só indivíduos adultos que apresentavam mais de três folhas. Em alguns casos, os indivíduos encontravam-se agrupados (*clusters*), e para evitar confundir *ramets* por *genets* foi coletada apenas uma folha por *cluster*. As amostras foliares foram desidratadas em sílica gel, e depois conservadas a -20°C.

Extração e quantificação do DNA

O DNA foi extraído a partir de folhas secas utilizando o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações. A quantificação do DNA foi realizada mediante a eletroforese em gel de agarose (1%) corado em brometo de etídio, e as concentrações foram estimadas pela intensidade de fluorescência emitida.

Desenvolvimento de microssatélites em *Masdevallia solomonii*, (Método de Provan & Wilson, 2006)

Foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes *primers* de ISSR: GGCC(AG)₈, GGCC(AC)₈, CCGG(AG)₈, CCGG(AC)₈, GCGC(AG)₈ e GCGC(AC)₈. A amplificação foi realizada em um volume final de 20 µl contendo aproximadamente 60 ng DNA genômico, 20 pmol de cada *primer*, 1x PCR buffer [5 mM Tris-HCl (pH 9.1), 1.6 mM (NH₄)₂SO₄, 15 µg/µl BSA], 200 µM de dNTP, 2.5 mM de MgCl₂ e 1.0 U Taq polimerase. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 60 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, com uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Do produto obtido da PCR, 10 µl foram utilizados para a eletroforese em géis de agarose (2%) para visualização dos fragmentos gerados; o remanescente de cada reação (10 µl) foi purificado em colunas de sílica QIAQUICK (QIAGEN), para uma posterior ligação no vetor plasmidial usando o kit *pGEM-T Easy Vector System* (Promega) segundo as instruções

do fabricante. Em seguida, foi feita a clonagem em células competentes de alta eficiência JM109 (Promega). As células transformadas foram plaqueadas em meio seletivo (Agar LB + IPTG + X-Gal) e incubadas a 37 °C por 24 horas.

A cultura dos clones positivos foi realizada utilizando placas *deep well* de 96 poços. Cada colônia isolada foi repicada para um poço contendo 150 µl do meio líquido 2YT-HMF + ampicilina (100 µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas e em seguida levadas ao freezer (-20 °C) por 30 min, para finalmente serem armazenadas a -80 °C.

Amplificação e sequenciamento de regiões microssatélites e desenho de *primers*

A PCR dos clones positivos foi feita utilizando os *primers* T7 e SP6 próprios para o vetor *pGEM-T Easy* (Promega, USA), utilizando para cada reação de 23 µl: 2,5 µl de tampão 10×, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,75 µM de cada *primer*, 2 U Taq, 3,75 µg BSA, Betaína (1M) e aproximadamente 40 ng de DNA. Foram utilizadas as seguintes condições da PCR: 95 °C por 5 min, 35 x (94 °C por 15 s, 55 °C por 35 s e 72 °C por 90 s), e extensão final 72 °C por 7 min.

Como preparo para a reação de sequenciamento, os produtos da PCR foram limpos com PEG 10 % (Polietilenoglicol 8000/NaCl 2,5 M), e posteriormente, quantificados por comparação com o marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em géis de agarose (1%).

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando os *primers* T7 e SP6 com o kit de reação de sequenciamento Big Dye terminator 3.1 (Applied Biosystems). Para um volume total de 10 µl foram usados: 2 µl do Tampão para sequenciamento (5×), 0,5 µl de BigDye e 0,75 µl de cada *primer* (5 µM), 0,5 - 2 µl da PCR purificada contendo aproximadamente de 25 a 30 ng/µl de DNA. O programa de sequenciamento foi constituído por 35 ciclos (96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s, 60°C por 4 min).

Após a purificação, os clones foram sequenciados em um equipamento 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas e editadas utilizando o STADEN PACKAGE (Staden, 1998) e a detecção dos locos microssatélites foi realizada com auxílio dos programas PERFECT MICROSATELLITE FINDER (Leach, 2000) e IMPERFECT MICROSATELLITE EXTRACTOR (Suresh *et al.*, 2007). Os *primers* para amplificar regiões contendo microssatélites foram desenhados utilizando o programa PRIMER3 PLUS (Rozen & Skaletsky, 2000).

PCR dos microssatélites

Os *primers* sintetizados foram testados em indivíduos das populações estudadas, padronizando as condições de amplificação e pré-selecionando os locos mais polimórficos. A temperatura de anelamento (T_a) para cada par de *primer* foi determinada mediante PCR em gradiente. Quando não foi possível determinar T_a , foram utilizados programas *Touchdown*, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Programas de PCR para amplificação de locos microssatélites em *Masdevallia*.

Programa básico	Programa: <i>Touchdown</i> 60-54	Programa: <i>Touchdown</i> 58-48
Step 1 94° x 1 min	Step 1 94° x 3 min	Step 1 95° x 3 min
Step 2 94° x 1 min	Step 2 94° x 30 seg	Step 2 94° x 30 seg
Step 3 T_a x 45 seg	Step 3 60° x 30 seg	Step 3 58°* x 30 seg
Step 4 72° x 1 min	Step 4 72° x 30 seg	Step 4 72° x 30 seg
Step 5 94° x 1 min	Step 5 94° x 15 seg	Step 5 94° x 30 seg
Step 6 53° x 1 min	Step 6 60°* x 15 seg	Step 6 48° x 30 seg
Step 7 72° x 1 min	Step 7 72° x 15 seg	Step 7 72° x 30 seg
Step 8 72° x 30 min	Step 8 94° x 15 seg	Step 8 94° x 1 min
Step 9 4° x ∞	Step 9 54° x 15 seg	Step 9 53° x 1 min
	Step 10 72° x 15 seg	Step 10 72° x 1 min
	Step 11 94° x 1 min	Step 11 72° x 30 min
	Step 12 53° x 1 min	Step 12 4° x ∞
	Step 13 72° x 1 min	
	Step 14 72° x 30 min	
	Step 15 4° x ∞	

Para verificar o potencial de transferabilidade dos *primers* desenhados para *Masdevallia solomonii*, estes foram testados em indivíduos de *M. scandens* e *M. yungasensis*. Os produtos foram visualizados em géis de agarose (1%).

Genotipagem

A genotipagem dos locos microssatélite foi realizada utilizando o método de amplificação desenvolvido por Schuelke (2000), que incorpora três *primers*: o *primer* direto específico para esse loco acrescentado com uma cauda da sequência M13 (5' CACGACGTTGTAAAACGAC 3'), o *primer* reverso específico e o *primer* M13 marcado com um dos quatro fluoróforos do sistema DS-33 da Applied Biosystems (6-FAM, VIC, NED e PET). As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 10 µl com o kit TopTaq Master Mix (QIAGEN Inc., Hilden, Germany), usando 0,75 µM do primer F, 1,5 µM do primer R e 0,30 µM da cauda fluorescente M13, com aproximadamente 4 ng do DNA genômico. O programa utilizado constou de três etapas: Etapa 1 (94 °C por 3 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, T_a por 1 min), etapa 2 (8 ciclos de 94°C por 1 min, 53 °C por 1 min, 72

°C por 1 min), e etapa 3 de extensão final (72 °C por 30 min); em alguns casos foi necessária a utilização de programas *Touchdown* (60-54°C e 58-48°) seguidos pelas etapas 2 e 3.

Os produtos das PCRs foram misturados na seguinte proporção: 0,5 µl da PCR de cada *primer*, formamida e marcador de peso GS-LIZ-500 (Applied Biosystems) antes de serem visualizados no sequenciador. Os fragmentos foram analisados usando o software GENEMAPPER v. 4.0 (Applied Biosystems).

Análise genética

A variabilidade genética inter e intra-populacional em cada uma das espécies foi determinada a partir do cálculo das frequências alélicas e dos índices de diversidade: número de alelos por loco (N_a), número de alelos efetivos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e). Estes últimos foram comparados para avaliar o desvio em relação ao equilíbrio de Hardy–Weinberg (EHW) utilizando para isto o teste de X^2 (Levene, 1949). Estes parâmetros foram calculados com o programa GENALEX versão 6.4.1 (Peakall & Smouse, 2006). Adicionalmente, o programa MICROCHECKER versão 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), foi utilizado para inferir a presença de alelos nulos que pudessem influenciar nos valores dos desvios de EHW. Também foi utilizado o programa BOOTLENECK 1.2.02 (Piry *et al.*, 1999) para detectar possíveis efeitos de gargalo nas populações.

Com o programa GENEALEX determinou-se também o grau de endogamia F_{IS} (Wright, 1978) dentro das populações. Este programa foi também utilizado, para determinar como se encontrava distribuída a variabilidade genética das espécies, utilizando para isso a análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992). Complementariamente utilizou-se o Software GENODIVE versão 2.0b20 (Meirmans & Tienderen, 2004) para o cálculo dos índices de divergência genética G_{ST} (Nei, 1986), G'_{ST} (padronizado, Hedrick, 2005), G''_{ST} (padronizado e corrigido para pequeno número de populações) e D (Jost, 2008). O valor de G''_{ST} foi utilizado para a estimativa indireta do fluxo gênico efetivo ($N_e m$), conforme a equação de Wright (1951).

A partir do cálculo das distâncias genéticas (Nei, 1978) entre as populações das três espécies, foi construída um dendrograma usando algoritmo de *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) implementado no pacote NEIGHBOR do programa PHYLIP (Felsenstein, 1993). Para avaliar o suporte dos ramos, foram utilizadas de 1000 matrizes de bootstrap com reamostragem de locos, com os pacotes SEQBOOT, GENDIST, NEIGHBOR e CONSENSE do PHYLIP. O dendrograma foi visualizado e editado no TREEVIEW (Page, 1996).

Para inferir o número de agrupamentos genéticos correspondentes às populações amostradas foi realizada uma análise Bayesiana no programa STRUCTURE v. 2.3.3 (Hubisz *et al.*, 2009). O número de populações presumidas (K) foi estimado por corridas sucessivas com $K = 1$ a $K = 12$, com 10 corridas independentes para cada valor de K . Cada corrida consistiu de 500.000 iterações de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com um *burn-in* inicial de 100.000 iterações, assumindo modelo de mistura (*admixture*) e alelos correlacionados entre populações. Os coeficientes de mistura e correlação também foram inferidos pelo MCMC. O número de K ideal foi estimado usando o software STRUCTURE-HARVESTER (Earl, 2011), sendo calculada a média de cada valor de probabilidade K , “log da probabilidade” [$\ln P(D)$], através de todas as corridas, segundo o método de Evanno *et al.*, (2005). Para verificar a existência de possíveis indivíduos híbridos ou introgridos foi calculado o *Index Hybrid* (Buerkle, 2005) no software GENODIVE.

Dados filogenéticos

Para verificar as relações filogenéticas entre *Masdevallia solomonii*, *M. scandens* e *M. yungasensis* dentro do gênero, foram obtidas sequências ITS correspondentes a 2 - 3 indivíduos de cada uma das populações. A PCR foi realizada utilizando os *primers* 17SE e 26SE (Sun *et al.*, 1994), em cada reação de 30 μ l utilizou-se: 3 μ l de tampão 10 \times , 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs, 0,15 μ M de cada *primer*, 0,75 U Taq, 1 μ g BSA, Betaína (1M), 2% DMSO e aproximadamente 40 ng de DNA. As condições da PCR foram: 94 °C por 3 min, 35 x (94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min e 72 °C por 3 min), e extensão final 72 °C por 7 min.

Para a reação de sequenciamento se utilizaram os *primers* 92 (Desfeaux *et al.*, 1996) e ITS4 (White *et al.*, 1990) com o mesmo protocolo de sequenciamento anteriormente descrito. As sequências foram analisadas e editadas utilizando o programa STADEN PACKAGE (2003); posteriormente, estas foram adicionadas em uma matriz elaborada com 45 sequências ITS do gênero obtidas no GenBank. A árvore filogenética foi gerada através da análise Bayesiana no programa MR BAYES v. 2.01 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). O software MR MODELTEST v. 3.0 (Pousada & Crandall, 1998) foi utilizado na escolha do modelo: GRT+GAMMA. Foram realizadas duas corridas com 4 cadeias (3 quentes e uma fria) por 10.000.000 gerações, coletando uma árvore a cada 1000. O consenso de maioria das árvores salvas, descartando as primeiras 2200 árvores de cada corrida como *burn in*, foi realizado no programa PAUP v. 4.0. (Swofford, 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELE, D. 2007. A Phylogeny of Genus Masdevallia Ruiz et Pav. Based in Morphological and Molecular Data. Tese de doutorado - zur Erlangung des akademischen Grades (Doctor rerum naturalium) im Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg, Hamburg. 216 p.
- ACKERMAN, J. D. 1998. Evolutionary potential in orchids: patterns and strategies for conservation. Selbyana, 19: 8-14.
- ACKERMAN, J. D. & WARD, S. 1999. Genetic variation in a widespread, epiphytic orchid: where is the evolutionary potential? Systematic Botany, 24: 282-291.
- ALCÁNTARA, S., SEMIR, J. & SOLFERINI, V. 2006. Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic rainforest of South-eastern Brazil. Annals of Botany, 98: 1207-1213.
- ANDERSON, E. 1949. Introgressive hybridization. New York: Wiley. 109 p.
- ARNOLD, M. L. 1992. Natural hybridization as an evolutionary process. Annual Review of Ecology and Systematics, 23: 237-261.
- ARNOLD, M. L. 1997. Natural hybridization and evolution. New York: Oxford University Press. 215 p.
- ARAUJO, N. & P. IBISCH. 2000. Hacia un plan de Conservación para el Bio-Corredor Amboró-Madidi, Bolivia. Editorial FAN, Santa Cruz, Bolivia, (CD-ROM; ISBN 99905-801-7-0).
- ÁVILA-DÍAZ, I. & OYAMA, K. 2007. Conservations genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). American Journal of Botany, 94: 184-193.
- AZEVEDO, C. O., BORBA, E. L. & VAN DEN BERG, C. 2006. Evidence of natural hybridization and introgression in *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir, F. Barros and *B. weddellii* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil, by using allozyme markers. Revista Brasileira de Botânica, 29: 415-421.
- BALLOUX, F. & MOULIN, L. N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 11: 155-165.

- BARBARÁ, T., PALMA-SILVA C., PAGGI, G. M., BERED, F., FAY, M. F. & LEXER, C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Molecular Ecology, 16: 3759-3767.
- BARTON, N. & HEWITT, G. 1985. Analysis of hybrid zones. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 16: 113-48.
- BARRET S.C.H. & J.R. KOHN. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: Implication for conservation. In: D. FALK & K. E. HOLSINGER (Ed). Genetics & conservation of rare plants. Center for Plant conservation, Oxford University Press, pp.: 1-30
- BECK, S. 1998. Floristic inventory of Bolivia: an indispensable contribution to sustainable development. In: Barthlott, W. & Winiger, M. (eds.). Biodiversity: A Challenger for Development Research and Policy. Berlin: Springer-Verlagp. p.: 243-267.
- BERG, E. E. & HAMRICK, J. L. 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. Canadian Journal of Forest Research, 27: 415-424.
- BORBA, E. L. & SEMIR, J. 1999. Temporal variation in pollinarium size in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. Plant Systematics and Evolution, 217: 197-204.
- BORBA, E. L. & SEMIR, J. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* Species: A multiple population approach. Annals of Botany, 88: 75-88.
- BORBA, E. L., SEMIR, J. & SHEPHERD, G. J. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. Annals of Botany, 88: 89-99.
- BUERKLE, C. A. 2005. Maximum-likelihood estimation of a hybrid index based on molecular markers. Molecular Ecology Notes, 5: 684-687.
- CASE, M. A. 1993. High levels of allozyme variation within *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) and low levels of divergence among its varieties. Systematic Botany, 18: 663-677.
- CATO, S. A. & RICHARDSON, T. E. 1996. Inter- and intraspecific polymorphism at chloroplast SSR loci and the inheritance of plastids in *Pinus radiata* D. Don. Theoretical and Applied Genetics, 93: 587-592.

- CAVERS, S. B. D., CARON, H., LEMES, M., MARGIS, R., SALGUEIRO, F. & LOWE, A. 2005. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. Heredity, 95: 281-289.
- CHRISTENSEN, D. E. 1994. Fly pollination in the Orchidaceae. In: Arditti, J. (ed.). Orchid biology: reviews and perspectives, Vol.VI. New York: John Wiley and Sons. Ithaca. p.: 415-454.
- CHUNG, M. Y., NASON, J. D. & CHUNG, M. G., 2004. Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Cephalanthera longibracteata*. American Journal of Botany, 91: 92-97.
- CHUNG, M. Y., NASON, J. D. & CHUNG, M. G. 2005. Patterns of hybridization and population genetic structure in the terrestrial orchids *Liparis kumokiri* and *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in sympatric population. Molecular Ecology, 14: 4389-4402.
- CHUNG, J. M., LEE, B. C., KIM, J. S., PARK, C., CHUNG, M. Y. & CHUNG, M. G. 2006. Fine-scale genetic structure among genetic individuals of the clone-forming monotypic genus *Echinosophora koreensis* (Fabaceae). Annals of Botany, 98: 165-173.
- COLE, T. C. 2003. Genetic variation in rare and common plants. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 34: 213-237.
- CORTÉS-PALOMECA, A. C., McCAULEY, R. A. & OYAMA, K. 2008. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). Molecular Ecology Resource, 8: 135-138.
- COZZOLINO, S. & WIDMER, A. 2005. The evolutionary basis of reproductive isolation in Mediterranean orchids. Taxon, 54: 977-985.
- DESFEAUX, C., S. MAURICE, J. P. HENRY, B. LEJEUNE & P. H. GOUYON. 1996. The evolution of reproductive system in the genus *Silene*. Proceedings: Biological Sciences, 263: 409-414.
- DEGEN, B. & ROUBIK, D. W. 2004. Effects of animal pollination on pollen dispersal, self-pollination and effective population size of tropical trees: a simulation study. Biotropica, 36: 165-179.
- DINERSTEIN, E., D. M., OLSON, D. J., GRAHAM, A. L., WEBSTER, S. A., PRIMM, M. P. BOOKBINDER & LEDEC, G. 1995. A Conservation Assessment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean. Washington, WWF, World Bank, 129p.

- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
- DRESSLER, R. L. 1981. The orchids: natural history and classification. Cambridge: Harvard University Press. 332 p.
- DRESSLER, R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Portland: Oregon, Dioscorides Press. 312 p.
- EARL, D. A. 2011. Structure Harvester v0.6.7. <http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/structureHarvester/>. Acesso em 17 Maio 2011.
- EISEN, J. A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D. B. Schlötterer, C. (eds). Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford: Oxford University Press. p.: 34-48.
- ELLEGREN, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics, 5: 435-445.
- ELLSTRAND, N. C. 1992. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. Oikos, 63: 77-86.
- ELLSTRAND, N. C. & D.R. ELAM. 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. Annual Reviews Ecology and Systematics, 24: 217-42.
- EPPERSON, B. K. 1990. Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. Genetics, 24: 757-771.
- EPPERSON, B. K. 1993. Recent advances in correlation analysis of spatial patterns of genetic variation. Evolutionary Biology, 27: 95-155.
- 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., SMOUSE, P. E. & QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial-DNA restriction data. Genetics, 31: 479-491.
- FELSENSTEIN, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

- FORREST, A. D., HOLLINGSWORTH, M. L., HOLLINGSWORTH, P. M., SYDES, C., BATEMAN, R. M. 2004. Population genetic structure in European populations of *Spiranthes romanzoffiana* set in the context of other genetic studies on orchids. Heredity, 92: 218-227.
- FRANKHAM, R. 1995. Inbreeding and extinction: a threshold effect. Conservation Biology, 9: 305-327.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J. & BRISCOE, D. 2002. Introduction to conservation genetics. 3 ed. United Kingdom: Cambridge University Press. 219 p.
- FUJIMORI, S., WASHIO, T., HIGO, K., OHTOMO, Y., MURAKAMI, K., MATSUBARA, K., KAWAI, J., CARNINCI, P., HAYASHIZAKI, Y., KIKUCHI, S. & TOMITA, M. 2003. A novel feature of microsatellites in plants: a distribution gradient along the direction of transcription. FEBS Letter, 554: 17-22.
- GENTRY, A. H. & DODSON, C. H. 1987. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. Annals of the Missouri Botanical Garden, 74: 205-233.
- GEROLD, G., SCHAWÉ, M., BACH, K. 2008. Hydrometeorologic and pedologic patterns along an elevational transect in the montane forest of the Bolivian Yungas. DIE ERDE, 139: 141-168.
- GILL, D. E. 1989. Fruiting failure, pollination inefficiency, and speciation in orchids. In: Otte, D. and Endler, J. A. (eds.). Speciation and its consequences. Philadelphia, PA: Academy of Natural Sciences Publications. p.: 458-481.
- GOLDSTEIN, D. B., LINARES, A. R., FELDMAN, M. W., CAVALLI, S. & FORZA, L. L. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics, 139: 463-471.
- GONZÁLES-ASTORGA, J. G., CRUZ-ANGON, A., FLORES-PALACIOS A. & VOVIDES, A. P. 2004. Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). Annals of Botany, 94: 545-551.
- HAMRICK, J. L. 1982. Plant population genetics and evolution. American Journal of Botany, 69: 1685-1693.

- HAMRICK, J. L. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: Urbanska, K. (ed.). Differentiation in higher plants. New York: Academic Press. p.: 53-67.
- HAMRICK, J. L., GODT, M. J. W. & SHERMAN-BROYLES, S. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests, 6: 95-124.
- HAMRICK, J. L. & GODT, M. J. W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences, 351: 1291-1298.
- HAMRICK, J. L. & NASON, J. D. 1996. Consequences of dispersal in plants. In: Rhodes, O. E., Chesson, R. K. & Smith, M. H. (eds.). Population Dynamics in Ecological Space and Time. Chicago: University of Chicago Press. p.: 203-236.
- HAMRICK, J. L., GODT, M. J. W. & GONZALES, E. 2006. Conservation of genetic diversity in old-growth forest communities of the southeastern United States. Applied Vegetation Science, 9: 51-57.
- HANAGARTH, W. & ARCE, J.P. 1986. Los parques nacionales y reservas de vida silvestre en el Departamento de La Paz - Su situación en el marco de una planificación regional. Ecología en Bolivia, 9: 1-67.
- HANCOCK, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D. B. and Schlötterer, C. (eds.). Microsatellites: Evolution and Applications. New York: Oxford University Press. p.: 1-9.
- HEDRÉN, M. 1996. Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): evidence from allozyme markers. Plant Systematics and Evolution, 201: 31-55.
- HEDRICK, P. W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. Evolution, 53, 313-318.
- HEDRICK, P. W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. Evolution, 59:1633-1638.
- HEGARTY, M. J. & S. J. HISCOCK. 2005. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. New Phytologist, 165: 411-423.

- HEYWOOD, J. S. 1991. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic, 22: 335-355.
- HEYWOOD, V. H. & IRIONDO, J. M. 2003. Plant conservation: Old problems, new perspectives. Biological Conservation, 113: 321-335.
- HILLS, H. G., NORRIS, H. W. & DODSON, C. H. 1972. Floral fragrances and isolating mechanisms in the genus *Catasetum* (Orchidaceae). Biotropica, 4: 61-76.
- HUBISZ, M. J., FALUSH, D., STEPHENS, M. & PRITCHARD J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Molecular Ecology Resources, 9: 1322–1332.
- HUSBAND, B. C. & D. W. SCHEMSKE. 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. Evolution, 50: 54–70.
- IBISCH, P. L. 1998. Bolivia is a megadiversity country and a developing country. *In*: Barthlott, W. & Winiger, M. (eds.). Biodiversity - a challenge for development research and policy. Berlin: Springer-Verlag. p.: 213-241.
- IUCN. 1997. Red list of threatened plants. *In*: Walter, K. S. & Gillett, H. J. (eds.). Switzerland: IUCN, Gland. 862p.
- JIMÉNEZ, I. & MIRANDA, F. 2007. Epiphyte orchid diversity in a Yungas montane forest in the Cotapata National Park and Integrated Management Natural Area, La Paz – Bolivia. Lankesteriana, 7: 49-52.
- JOHANSSON, D. 1974. Ecology of vascular epiphytes in West African rain forest. Acta Phytogeographica Suecica, 59: 1-129.
- JOST, L. 2008 GST and its relatives do not measure differentiation. Molecular Ecology Resources, 17: 4015-4026.
- KASHI, Y. & SOLLER, M. 1999. Functional roles of microsatellites and minisatellites. *In*: Goldstein, D. B. & Schlotterer, C. (eds.). Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford: Oxford University Press. p.:10-23.
- KIMURA, M. & CROW, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics, 49: 725-738.

- KLIER, K. M., LEOSCHKE, J. & WENDEL, J. F. 1991. Hybridization and introgression in white and yellow lady's slipper orchids. (*Cypripedium candidum* and *C. pubescens*). Journal of Heredity, 82: 305-318.
- KRÖMER, T. 2003. Diversität und Ökologie der vaskulären Epiphyten in primären und sekundären Bergwäldern Boliviens. Göttingen: Cuvillier Verlag.
- KRÖMER, T., M., KESSLER, S.R., GRADSTEIN & A., ACEBEY. 2005. Local-scale diversity patterns of vascular epiphytes along an elevational gradient in the Andes. Journal of Biogeography, 32(10): 1799-1809.
- KRÖMER, T. GRADSTEIN, R. & ACEBEY, A. 2007. Diversidad y ecología de epífitas vasculares en bosques montañosos primarios y secundarios de Bolivia. Ecología en Bolivia, 42: 23-33.
- LANDE, R. & SCHEMSKE, D. W. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants, I. Genetic models. Evolution, 39: 24-40.
- LEACH, R. 2000. Perfect microsatellite repeat finder. (Based on Tandyman). Disponível em: <http://sgdp.iop.kcl.ac.uk/nikammar>. Acesso em: 20 Maio 2010.
- LEVENE, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. Annals of Mathematical Statistics, 20: 91-94.
- LI, Y. C., KOROL, A. B., FAHIMA, T., BEILES, A. & NEVO, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology, 11: 2453-2465.
- LOWE, A., HARRIS, S. & ASHTON, P. 2005. Ecological genetics: design, analysis and application. Oxford: Blackwell Publishing. 326p.
- LUER, C. A. 2000. Systematics of *Masdevallia* I. Monography Systematic Botany, 77: 1-264.
- LUER, C. A. 2003. *Icones Pleurothallidinarum XXV: Systematics of Masdevallia Part Five*. Monography Systematic Botany, Missouri Botanical Garden, 91 : 1-282.
- MALLET, J. 2007. Hybrid speciation. Nature, 446: 279-283.
- MEIRMANS, P. G. 2006. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. Evolution, 60: 2399-2402.

- MEIRMANS, P. G & VAN TIENDEREN, P. H. 2004. Genotype and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. Molecular Ecology Notes, 4:792-794.
- MENESES, R. & BECK, S. 2005. Especies Amenazadas de la Flora de Bolivia. Bolivia, La Paz: Herbario Nacional de Bolivia, 34 p.
- MORGANTE, M. & OLIVIERI, A. M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant Journal, 3: 175-182.
- MORGANTE, M., HANAFEY, M. & POWELL, W. 2002. Microsatellites are preferentially present with non-repetitive DNA in plant genomes. Natural Genetics, 30: 194-200.
- SURESH, B., MUDUNURI, S. & NAGARAJARAM, H. A. 2007. IMEx:Imperfect Microsatellite Extractor. Bioinformatics, 23: 1181-1187.
- MURREN, C. J. 2003. Spatial and demographic population genetic structure in *Catsetum viridiflavum* across a human-disturbed habitat. Journal of Evolutionary Biology, 16: 333-342.
- NAGYLAKI, T. 1998. Fixation indices in subdivided populations. Genetics, 148: 1325-1332.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 70: 3321-3323.
- 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. New York: Columbia University Press. 512p.
- NIELSEN, L. R. & SIEGISMUND, H. 1999. Interspecific differentiation and hybridization in *Vanilla* species (Orchidaceae). Heredity, 83: 560-567.
- OHTA, T. & KIMURA, M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. Genetics Research, 22: 201-204.
- OLIVEIRA, E., GOMES, J., ZUCCHI, M., VENCOVSKY, R. & CARNEIRO, M. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology, 29: 294-307.

- PALMA-SILVA, C., CAVALLARI, M. M., BARBARÁ, T. 2006. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. Molecular Ecology Notes.
- PAGE, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences, 12: 357-358.
- PEAKALL, R. & BEATTIE, A. J. 1991. Genetic consequences of worker ant pollination in a self-compatible, clonal orchid. Evolution, 45: 1837-1848.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P. E. 2006. GenAIEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6: 288-295.
- PELLEGRINO, G., D'EMERICO, S., MUSACCHIO, A., SCRUGLI, A. & COZZOLINO, S. 2005. Confirmation of hybridization among sympatric insular populations of *Orchis mascula* and *O. provincialis*. Plant Systematics and Evolution, 251: 131-142.
- PETIT, C., F. BRETAGNOLLE & F. FELBER. 1999. Evolutionary consequences of diploid polyploid hybrid zones in wild species. Trends in Ecology and Evolution, 14 (8): 1-6.
- PINHEIRO, F., SANTOS, M. O., BARROS, F., MEYER, D., SALATINO, A., SOUZA, A. P. & COZZOLINO, S. 2008a. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Brazilian orchid *Epidendrum fulgens*. Conservation Genetics, 9: 1661-1663.
- PINHEIRO, F., SANTOS, M. O., PALMA-SILVA, C., BARROS, F., MEYER, D., SALATINO, A., SOUZA, A. P. & COZZOLINO, S. 2008b. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Epidendrum puniceoluteum*, an endemic orchid from the Atlantic Rainforest. Molecular Ecology Resources, 8: 1114-1116.
- PINHEIRO, F., PALMA-SILVA, C., BARROS, F. & COZZOLINO, C. 2009. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*. Genetics and Molecular Biology, 32: 337-339.
- PINHEIRO F, BARROS F, PALMA-SILVA C, MEYER D, FAY MF, SUZUKI RM, LEXER C & COZZOLINO S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). Molecular Ecology, 19, 3981–3994.
- PIRY, S., LUIKART, G. & CORNUET, J. M. 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. Heredity, 90: 502-503.

- POSADA, D. & K. A. CRANDALL. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, 14(9): 817-818.
- POWELL, W., MACHRA, Y. G. C. & PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science, 1: 215-222.
- PROVAN, J., POWELL, W. & HOLLINGSWORTH, P. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. Trends in Ecology & Evolution, 16: 142-147.
- PROVAN, J. & WILSON, P. 2006. Development of microsatellites for the peat moss *Sphagnum capillifolium* using ISSR cloning. Molecular Ecology Notes, 7: 1471-8286.
- RAPOSO, A., K. MARTINS, A. YAMAGUISHI CIAMPI, L. H. DE OLIVEIRA WADT & E. ANN VEASEY. 2007. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. Pesquisa agropecuária brasileira, 42(9): 1291-1298.
- ROZEN, S. & SKALETSKY, H. 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. & Misener, S. (eds.). Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. New Jersey: Totowa, Humana Press. p.: 365-386.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4:406-425.
- SCHUELKE, M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. Nature Biotechnology, 18: 233-234.
- SEVILLA-CALLEJO, M. & MATA-OLMO, R. 2007. Introducción a las dinámicas territoriales en el área oriental del Parque Nacional y ANMI Cotapata (La Paz, Bolivia). Ecología en Bolivia, 2: 1-14.
- SEVILLA-CALLEJO, M. 2010. Organización territorial y campesinado en el Parque Nacional y Área Natural de Manejo Integrado Cotapata (Bolivia). Tesis doctoral. Departamento de Geografía Universidad Autónoma de Madrid.
- SHARMA, I. K. & JONES, D. L. 1999. Characterization of natural hybrids between *Pterostylis alveata* Garnet and *Pterostylis ophioglossa* R. Br. (Orchidaceae) by starch gel electrophoresis. Biochemical Systematics and Ecology, 27: 499-505.

- SLATE, J., P. DAVID, K.G. DODDS, B.A. VEENVLIET, B.C. GLASS, T.E. BROAD & J.C. MCEWAN. 2004. Understanding the relationship between the inbreeding coefficient and multilocus heterozygosity: theoretical expectations and empirical data. Heredity, 93: 255-265.
- SLATKIN, M. 1985. Gene flow in natural population. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 16: 393-430.
- SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics, 139: 457-462.
- SOLIVA M. & WIDMER, A. 2003. Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. Evolution, 57: 2252-2261.
- SORANZO, N., PROVAN, J. & POWELL, W. 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. Genome, 42: 158-161.
- STADEN, R., BEAL, K. & BONFIELD, J. 1998. The Staden Package: Computer Methods in Molecular Biology. Bioinformatics Methods and Protocols, 132: 115-130.
- STEBBINS, G. 1959. The role of hybridization in evolution. Commemoration of the Centennial of the Publication of "The Origin of Species" by Charles Darwin. Proceedings of the American Philosophical Society, 103: 231-251.
- SUN, Y., D. Z. SKINNER, G. H. LIANG, & S. H. HULBERT. 1994. Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. Theoretical and Applied Genetics, 89: 26-32.
- SWARTS, N. D., SINCLAIR, E. A. & DIXON, K. 2007. Characterization of microsatellite loci in the endangered grand spider orchid *Caladenia huegelii* (Orchidaceae). Molecular Ecology Resources, 7: 1141-1143.
- SWOFFORD, D. L. PAUP 4.0: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), 4.0. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- TAUTZ, D., RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, 12: 4127-4138.
- TEMPLETON, A. R. 1981. Mechanisms of speciation – a population genetic approach. Annual Review of Ecology and Systematics, 12: 23-48.

- TÓTH, G., GÁSPARI, Z. & JURKA, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. Genome Research, 10: 967-981.
- TRAPNELL, D., HAMRICK, J. L. & NASON, J. D. 2004. Three-dimensional fine-scale genetic structure of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. Molecular Ecology, 13: 1111-1118.
- TRAPNELL, D. W. & HAMRICK J. L. 2005. Mating patterns and gene flow in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. Molecular Ecology, 14: 75–84.
- TREMBLAY, R. L. 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. Canadian Journal of Botany, 70: 642-650.
- TREMBLAY, R. L. & ACKERMAN, J. D. 2001. Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. Biological Journal of the Linnean Society, 72: 47-62.
- TREMBLAY, R. L., ACKERMAN, J. D., ZIMMERMAN, J. K., & CALVO, R. N. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. Biological Journal of the Linnean Society, 84: 1-54.
- TURNER, M. E., J. C. STEPHENS & W.W. ANDERSON. 1982. Homozygosity and patch structure in plant populations as a result of nearest-neighbor pollination. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Population Biology, 79: 203-207.
- URGERER, M. C., S. J. E. BAIRD, J. PAN & L. H. RIESEBERG. 1998. Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95: 11757-11762.
- 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 Resources, 4: 535-538.
- VAN DER PIJL, L. & DODSON, C. H. 1966. Orchid flowers. Their pollination and evolution. Coral Gables: University of Miami Press. p.: 101-122.
- VARGAS, C. F.; PARRA-TABLA, V.; FEINSINGER, P. & LEIRANA-ALCOCER, J. 2006. Genetic diversity and structure in fragmented populations of the tropical orchid *Myrmecophila christinae* var *christinae*. Biotropica, 38: 754-763.

- VÁSQUEZ, R. & IBISCH, P. 2000. Orquídeas de Bolivia: Subtribu Pleurothallidinae. v. 1. Bolivia: Santa Cruz, FAN. 649 p.
- VÁSQUEZ, R. & IBISCH, P. 2004. Orquídeas de Bolivia, diversidad y estado de conservación. Subtribu Laeliinae, Polystachiinae y Sobraliinae, con actualización y complementación de Pleurothallidinae. 2 ed. v. 2. Bolivia, Santa Cruz, FAN. 649 p.
- VASSEUR, L. 2001. Allozymic diversity in *Allium tricoccum* (Ait.) Solander var. *burdickii* Hanes in isolated populations of Nova Scotia (Canada). Plant Systematics and Evolution, 228: 71-79.
- VEKEMANS, X. & HARDY, O. J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. Molecular Ecology, 13: 921-935.
- WEIR, B. S. 1996. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates. 445 p.
- WEIR, B. S., & COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38: 1358-1370.
- WONG, K. C. & SUN, M. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). American Journal of Botany, 86: 1406-1413.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (Eds.) PCR Protocols: a guide to methods and applications. pp. 315-322. Academic Press, San Diego.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics, 15: 323-354.
- WRIGHT, S. 1978. Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. v. 4. Chicago: University of Chicago Press. 580 p.
- ZANE, L., BARGELLONI, L. & PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellites isolation: a review. Molecular Ecology, 11: 1-16.
- ZHANG, L., YUAN, D., YU, S., LI, Z., CAO, Y., MIAO, Z., QIAN, H. & TANG, K. 2004. Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. Bioinformatics, 20: 1081-1086.

Capítulo 1

Microsatellite marker development for the threatened orchid *Masdevallia solomonii* (Orchidaceae)

Artigo aceito para publicação na secção Primer Notes & Protocols do
American Journal of Botany em Setembro de 2011.

**MICROSATELLITE MARKER DEVELOPMENT FOR THE THREATENED
ORCHID *MASDEVALLIA SOLOMONII* (ORCHIDACEAE) ¹**

M. Cristina López-Roberts ^{2,3}, Paulo R. M. Almeida², Eddy J. F. Oliveira² Cássio van den
Berg²

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av.
Transnordestina s.n., 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brazil.

³ Author for correspondence: macrissroberts@yahoo.es

¹ Manuscript received _____; revision accepted _____.

This work was funded by the grant PNX0014/2009 (FAPESB/CNPq, Brazil) and scholarship from CNPq (PQ-1D) to CvdB, and scholarship CNPq (PEC-PG 190107/09-0) to MCLR.

ABSTRACT

- *Premise of the study:* Microsatellite markers for *Masdevallia solomonii* were developed to serve as a tool in future population genetic studies in this threatened species from the Bolivian Yungas.
- *Methods and Results:* Thirteen microsatellite primers were characterized by cloning an inter simple sequence repeats (ISSRs) library. From these, ten loci presented considerable variation in allele number (4–16), expected heterozygosity (0.553–0.865) and polymorphic information content per locus (0.500–0.848).
- *Conclusions:* The markers obtained for *M. solomonii* are the first in the genus and subtribe. The observed polymorphism will allow to assess genetic diversity and structure of this species and will serve to propose effective conservation actions.

Key words: Endemic species; genetic diversity; SSR; Yungas.

Despite the fact that Orchidaceae is one of the largest Angiosperm families, very few studies have described microsatellite loci from orchid species (e.g. Campbell et al., 2002, Cortés-Palomec et al., 2008; Pinheiro et al., 2008). *Masdevallia* is a genus of over 400 primarily Andean species (Pridgeon et al., 2005), and belongs to subtribe Pleurothallidinae, which is the largest Neotropical subtribe with ca. 4,100 species in 37 genera. Until now, no microsatellites were characterized for any species within this genus or in the subtribe.

Masdevallia solomonii Luer & Vasquez is endemic to the humid montane forests in the Bolivian Yungas. Plants are small, perennial epiphytes which grow from 2,000–3,100 meters above sea level. This species is included in the red list of threatened plants from Bolivia in the vulnerable (VU) IUCN category. However, until 1998 it was considered endangered, because they are local endemics with small populations in restricted habitats, the ongoing fragmentation and loss of primary forest is an important threat, and proposing a management plan is urgent. Considering that the success in conserving populations of rare species depends on the maintenance of genetic diversity in their habitats, and that information about population genetic parameters is not available for most orchid species, our aim was to develop a set of microsatellite markers as tools to assess the genetic diversity and structure of *M. solomonii* populations, in order to propose effective conservation actions.

METHODS AND RESULTS

Microsatellite markers were developed using the methods described by Provan and Wilson (2007). They are based on the amplification of internal sequences between microsatellites (inter-simple sequence repeats or ISSRs) using Polymerase Chain Reaction (PCR) and then looking for microsatellite loci contained within these sequences, taking into account that microsatellites are generally clustered within the plant genome.

Genomic DNA was isolated from one individual and extracted with the CTAB 2× protocol (Doyle and Doyle, 1987). We then performed PCR reactions with following ISSR primers:

GGCC(AG)₈, GGCC(AC)₈, CCGG(AG)₈, CCGG(AC)₈, GCGC(AG)₈ e GCGC(AC)₈. The reactions were carried out in 20 µL, with ca. 30 ng of template DNA, 20 pmol each primer, 1× PCR buffer [5 mM Tris-HCl (pH 9.1), 1.6 mM (NH₄)₂SO₄, 15 µg/µl BSA], 200 µM each dNTPs, 2.5 mM MgCl₂ and 1.0 unit Taq DNA polymerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brazil). Thermal profile consisted of an initial denaturing step of 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72°C for 1 min; and final extension of 72°C for 5 min. To check amplification success, 10 µL of each PCR product were quantified in ethidium bromide stained 2% agarose gels, and the remaining products were pooled and then purified in a QIAQuick column (Qiagen Inc., Hilden, Germany), and then cloned using pGEM-T Easy Vector System kit and JM109 competent cells (Promega, São Paulo, Brazil). A library was constructed with the positive clones. PCR amplification of clones followed an initial denaturation step of 94°C for 5 min followed by 35 cycles of: denaturation at 94°C for 15 seconds, annealing at 55°C for 35 seconds and extension at 72°C for 90 seconds. Final extension was at 72°C for 7 min. Clones were bidirectionally sequenced with the T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') and SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAGAA 3') primers using the Big Dye Terminator 3.1. kit (Applied Biosystems, São Paulo, Brazil) in a ABI3130XL Genetic analyzer (Applied Biosystems). The cycle sequencing of clones followed a program of 35 cycles of denaturation at 96°C for 10 seconds, annealing at 50°C for 5 seconds and elongation at 60°C for 4 min.

The detection of microsatellite loci was performed with aid of the software Perfect Microsatellite Finder (Leach, 2000) and Imperfect Microsatellite Extractor (Mudunuri and Nagarajaram, 2007). Microsatellite primers were then designed using Primer 3 Plus (Rozen and Skalestky, 2000). Loci were then genotyped by using the three primers in the same reaction: a forward primer with addition of a M13-tail (5' AGGAAACAGCTATGACCAT 3') at the 5' end, the reverse primer and the M13-tail sequence labeled with one of four

fluorescent dyes (6-FAM, VIC, NED and PET[®]). Genotyping reactions were performed in 6 μL with the Top Taq Master Mix kit (Qiagen), and 0.4 μM of the forward primers, 0.8 μM of the reverse primer and 0.16 μM of a M13-labeled tail, and approximately 4 ng of genomic DNA. Optimal annealing temperature for each primer was established in gradient PCRs from 60–45°C, and in some cases touchdown (60–54°C and 58–48°) programs were needed. For polymorphism assessment, were genotyped 24 individuals of one of the *M. solomonii* populations of the National Park and Integrated Management Natural Area Cotapata (PN-ANMI Cotapata), Bolivia. Because this species is very rare and threatened, only two vouchers were made for this population. In the Appendix 1 we show the field and laboratory codes of these samples. Microsatellite profiles were analyzed with Genemapper 4.0 (Applied Biosystems). The estimates of allelic diversity and deviations from Hardy-Weinberg Equilibrium were carried out using Genalex 6.4.1 (Peakall and Smouse, 2006).

From 192 positive clones included in the library, 178 were amplified and sequenced, and 160 contained microsatellite loci. The most common motifs were dinucleotides (47%) and trinucleotides (29%), and tetranucleotides (18%), pentanucleotides (6%). The number of repetitions varied from 5–14 in dinucleotides, 3–41 in trinucleotides and 3–4 in tetranucleotides. We designed 26 primer pairs, from which 13 presented amplification patterns compatible with the expected fragment sizes (Table 1). Ten loci were polymorphic (Table 2), displaying an average allele number of 7.9 (3 to 10). The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.500 to 0.957 and the expected heterozygosity (H_E) ranged from 0.553 to 0.865. The polymorphic information content (PIC) per locus varied from 0.500 to 0.848. Significant values ($P < 0.01$) of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium were found in 4 loci, where levels of observed heterozygosity are lower than expected. This heterozygote deficiency could be related to inbreeding within the population due to the small number of individuals.

CONCLUSIONS

A large number of clones with microsatellite sequences and the overall amplification success and polymorphism with most primers designed indicated high efficiency of the ISSR library method, which is much less laborious and produces more diverse motifs than the traditional enriched-library protocol. The microsatellites markers described in this paper are the first in the genus and subtribe and showed sufficient polymorphism to be useful for the study of diversity and genetic structure in *M. solomonii*.

LITERATURE CITED

- CAMPBELL, V.V., G. ROWE, T.J.C. BEEBEE AND M.J. HUTCHINGS. 2002. Isolation and characterization of microsatellite primers for the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Brown (Orchidaceae). *Conservation Genetics* 3: 209–210.
- CORTÉS-PALOMEC, A.C., R.A. MCCAULEY AND K. OYAMA. 2008. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Molecular Ecology Resources* 8:135–138.
- DOYLE, J. J. AND J. L. DOYLE. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America* 19: 11–15.
- LEACH, R. 2000. Perfect microsatellite repeat finder. (Based on Tandyman). Computer program by the author [online]. Website <http://sgdp.iop.kcl.ac.uk/nikammar> [accessed 01 September 2010].
- MUDUNURI, S. AND H. NAGARAJARAM. 2007. IMEx: Imperfect Microsatellite Extractor. *Bioinformatics* 23: 1181–1187.
- PEAKALL, R. AND P. E. SMOUSE. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel: Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- PINHEIRO, F., M.O. SANTOS, C. PALMA-SILVA, F. BARROS, D. MEYER, A. SALATINO, A.P. SOUZA AND S. COZZOLINO. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in

Epidendrum puniceoluteum, an endemic orchid from the Atlantic Rainforest. *Molecular Ecology Resources* 8:1114–1116.

PRIDGEON, A.P., H. STENZEL, J. HERMANS, N. VEITCH, R. GRAYER AND R. SOLANO-GÓMEZ. 2005. Subtribe Pleurothallidinae. *In*. A.M. Pridgeon, P. J. Cribb, M. W. Chase and F. N. Rasmussen [eds.]. *Genera Orchidacearum*, Vol. 4, Epidendroideae (Part one), 319–328. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

PROVAN, J. AND P. J. WILSON. 2007. Development of microsatellites for the peat moss *Sphagnum capillifolium* using ISSR cloning. *Molecular Ecology Notes* 7: 254–256.

ROZEN, S. AND H. SKALETSKY. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods of Molecular Biology* 132: 365–386.

Table 1: Characterization of thirteen microsatellite markers developed for *Masdevallia solomonii*. For each primer pair we show the forward and reverse sequences (5' to 3'), expected size based on the cloned fragment*, repeat motif, optimal PCR amplification conditions, and GenBank access number.

Marker	Size	Primer Sequence (5' - 3')	M13 5' Pigtail	Repeat motif	Ta °C	GenBank
MSO5Y	250	F: GCCATGTTTAACCCGTTATG R: GGAGGGATGATTTTGCAGAT	NED	(CTT) ₁₅	TD 60-54	JN375719
MSO6_2	267	F: GAAGGAAGAAGAAAGGTGGAGA R: ACACAAAGAGGGATGGAGGA	VIC	(AG) ₉	56	JN381506
MSO9Y	108	F: AGAACACCCCACAAACCCTA R: AGGGGTAGGAGGTGTATGGA	6-FAM	(TACA) ₃	TD 60-54	JN375717
MSO12Y	231	F: CCCAACATTTGCAAGTCATC R: GAGATTTGTTGCCCATTCAC	VIC	(TTC) ₄ GAT (TGT) ₄	52	JN375718
MSO18	111	F: GAGAGCTGTCTTTTCTTGA R: GCACTAAAAACTCCTGTT	PET	(TTGA) ₄	TD 60-54	JN375723
MSO65	159	F: CTGGCAACCCAAAACAAGA R: GCACTGGGCACTTGTGTAGA	VIC	(GA) ₅ N(TGGA) ₆	54	JN375716
MSO66_8	214	F: GGAGGGCAGAAGAAAGAGAG R: GGTACAGAAAGAAGGGAAAGGA	NED	(GAAA) ₄	TD 60-54	JN375721
MSO68	153	F: GGATTCCCTGACAAGTTGGA R: GGTCTCTGTTCCCCAAATGA	PET	(CT) ₄ CCTT(CT) ₄ ACCTT(CT) ₄	54	JN375713
MSO70	218	F: TGTGTATTTGGGAAGCTC	6-FAM	(TG) ₁₄	56	JN375712

		R: CACTTAATTGTTACGGCATC				
MSO103_1	103	F: GAAGTGTGAGAGACAGGGAGA	PET	(CT) ₁₀	TD 60-54	JN375714
		R: GGAAGAAGAAAGGTGGAGAAA				
MSO103_2	300	F: AGTGTGAGAGACAGGGAGAGAT	6-FAM	(CT) ₈	52	JN375715
		R: GAGTGGTGAAGGGAACAAGA				
MSO105_1	106	F: GAAGGAAGAAGAAAGGTGGAG	VIC	(AG) ₁₀	TD 60-54	JN375711
		R: GAAGTGTGAGAGACAGGGAGA				
MSO105_2	122	F: CCTCCATCCCTCTTTGTGTT	NED	(AG) ₁₀	56	JN381507
		R: AGATGGTGGACAAGAGAGA				

* Expected size excluding 5'M13 universal sequence. TD = Touchdown program. Ta = Annealing temperature.

Table 2. Results of initial microsatellite marker screening in one population of *M. solomonii* (N=24) in the PN-ANMI Cotapata, Bolivia. For each marker, we present number of alleles (*A*), observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E), polymorphism information content (PIC) and *P* values for the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test.

Marker	<i>A</i>	H_O	H_E	PIC	<i>P</i>(HWE)
MSO5Y	10	0.957	0.865	0.848	0.430
MSO6_2	8	0.565	0.798	0.770	0.006*
MSO9Y	1	-	-	-	-
MSO12Y	3	0.500	0.609	0.538	0.317
MSO18	1	-	-	-	-
MSO65	8	0.542	0.553	0.531	0.949
MSO66_8	1	-	-	-	-
MSO68	10	0.792	0.731	0.709	0.865
MSO70	8	0.917	0.745	0.712	0.012
MSO103_1	7	0.435	0.775	0.741	0.000*
MSO103_2	10	0.222	0.847	0.833	0.000*
MSO105_1	7	0.304	0.749	0.714	0.000*
MSO105_2	5	0.583	0.537	0.500	0.550

*Significant values ($P < 0.01$).

Appendix 1: Voucher information of reference and genotyped individuals of *Masdevallia solomonii*.

The following are reference collections from the population described in the present study. They are deposited in the National Herbarium of Bolivia (LPB): *Masdevallia solomonii* Luer & Vásquez. BOLIVIA. La Paz: Nor Yungas, Jiménez I. 3742 (LPB, registration number 11276) and Jiménez I. 3823 (LPB, registration number 118346).

Field and laboratory codes of individuals genotyped: 1_MSO_2, 1_MSO_4, 1_MSO_9, 1_MSO_10, 1_MSO_11, 1_MSO_16, 1_MSO_17, 1_MSO_18, 1_MSO_23, 1_MSO_26, 1_MSO_28, 1_MSO_40, 1_MSO_46, 1_MSO_31, 1_MSO_33, 1_MSO_41, 1_MSO_42, 1_MSO_43, 1_MSO_44, 1_MSO_48, 1_MSO_51, 1_MSO_55, 1_MSO_56, 1_MSO_59. Chojllapata PN-ANMI-Cotapata, La Paz, Bolivia. Geographic coordinates of sample populations are available from the authors upon request.

Capítulo 2

Diversidade e estrutura genética em *Masdevallia solomonii*, *Masdevallia yungasensis* e *Masdevallia scandens*, orquídeas endêmicas dos Yungas da Bolívia, implicações para a conservação.

Formatado para ser submetido para publicação na revista *Conservation Genetics*, após tradução para o inglês.

Diversidade e estrutura genética em *Masdevallia solomonii*, *Masdevallia yungasensis* e *Masdevallia scandens*, orquídeas endêmicas dos Yungas da Bolívia: implicações para a conservação.

M. Cristina López-Roberts¹, Jorge Gonzáles-Astorga², Eddy J. F. Oliveira³ e Cássio van den Berg³

¹ Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s.n., 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brazil.

² Instituto de Ecología A. C. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa 91070, Veracruz, México.

³ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s.n., 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brazil.

Este trabalho foi financiado pela subvenção PNX0014/2009 (FAPESB/CNPq, Brazil), a bolsa de produtividade CNPq (PQ-1D) para CvdB, e bolsa de estudos CNPq (PEC-PG 190107/09-0) para MCLR.

RESUMO

Masdevallia scandens, *M. solomonii* e *M. yungasensis* são orquídeas raras e ameaçadas, endêmicas das florestas montanas úmidas dos Yungas da Bolívia. Para acessar a diversidade e estrutura genética destas espécies, foram transferidos dez pares de *primers* desenhados para *M. solomonii*. Elevada diversidade genética foi observada nas populações das três espécies, com um valor médio de alelos por loco de 13,7 em *M. solomonii*, 12,9 em *M. yungasensis*, e 9,2 em *M. scandens*. A heterozigosidade média esperada e observada foi de 0,678 e 0,519 em *M. solomonii*, 0,580 e 0,701 em *M. yungasensis*, e 0,528 e 0,586 em *M. scandens*, respectivamente; observando-se desvios significativos do Equilíbrio Hardy Weinberg em vários locos. O coeficiente de endogamia foi alto em *M. solomonii* ($G_{IS} = 0,270 \pm 0,101$) e *M. yungasensis* ($G_{IS} = 0,203 \pm 0,069$), comparados a *M. scandens* ($G_{IS} = 0,121 \pm 0,087$). Devido à estruturação genética observada, cada uma das populações avaliadas constitui em importante reservatório da diversidade genética nestas espécies.

Palavras chave: Espécies endêmicas, microssatélites, Yungas.

INTRODUÇÃO

Os estudos em genética da conservação são necessários para o estabelecimento de planos de gestão para preservar a biodiversidade (Ávila-Díaz & Oyama 2007), sendo a manutenção da variabilidade genética, dentro e entre as populações, uma questão crítica em programas de conservação ao longo prazo (Bowen 1999). O conhecimento sobre a diversidade genética é fundamental na conservação, principalmente de espécies ameaçadas (Wong & Sun 1999).

Apesar de Orchidaceae se constituir em uma das maiores famílias das Angiospermas compreendendo aproximadamente 10% das espécies deste grupo (Roberts & Dixon 2008), a informação sobre os níveis e padrões de diversidade genética em espécies de orquídeas ainda é escassa. Os estudos em diversidade genética de orquídeas têm sido desenvolvidos principalmente em espécies terrestres, como mostra a revisão de Forrest *et al.* (2004). Embora as orquídeas epífitas representem aproximadamente 70% das espécies dentro de Orchidaceae (Dresser 1993), há poucos trabalhos realizados com espécies de hábito epifítico (*Laelia rubescens* Lindl., Trapnell *et al.* 2004, *Gomezia hookeri* Rolfe M.W.Chase & N.H.Williams, Alcântara *et al.* 2006).

As florestas montanas dos Andes sulamericanos têm sido reconhecidas como *hotspots* de diversidade em orquídeas epífitas (Cribb *et al.* 2003; Krömer *et al.* 2007). Esta grande riqueza é o resultado de uma intensa especiação devido à interação de múltiplos fatores (Ackerman 1998), principalmente: 1) a fragmentação do hábitat, que promoveria a especiação alopátrica (Templeton 1981); 2) especialização ao microhábitat dentro do forófito que promove particionamento do nicho, e 3) a especificidade pelo polinizador (Gentry & Dodson 1987).

Na Bolívia, as florestas montanas incluídas dentro do Parque Nacional e Área Natural de Manejo Integrado Cotapata (PN-ANMI Cotapata) nos Yungas de La Paz (Bolívia) constituem um dos ecossistemas com maior riqueza de espécies de orquídeas do mundo (Krömer *et al.* 2007). Contraditoriamente, a região é também uma das mais afetadas pela crescente pressão humana (Hanagarth & Arce 1986, Ribera 1995), e tem sido considerada em estado de conservação crítico (Araujo & Ibsch 2000). As florestas nos Yungas estão sendo rapidamente devastadas, devido, principalmente, à utilização das florestas primárias para o estabelecimento de práticas agrícolas e de pastoreio, as quais frequentemente envolvem a queimada não controlada.

A diminuição da riqueza de orquídeas epífitas, devido à perda de florestas primárias, poderia afetar aproximadamente 90% das espécies (Krömer *et al.* 2007). Além disso, algumas orquídeas com potencial ornamental são extraídas indiscriminadamente, ocasionando uma diminuição das populações, o que pode levá-las a um estado crítico de conservação. É o caso de *Masdevallia scandens* Rolfe, *M. solomonii* Luer & Vásquez e *M. yungasensis* Hashimoto subsp. *yungasensis*, que se encontram na Lista Vermelha de espécies ameaçadas da flora boliviana (Meneses & Beck 2005). Estas espécies foram categorizadas como vulneráveis (VU), segundo critérios da IUCN (1997), por serem endêmicas em nível local, com populações muito pequenas e frágeis, de habitats restritos e ameaçados para a sobrevivência em curto ou médio prazo (Vásquez & Ibisch 2000).

Masdevallia scandens, *M. solomonii* e *M. yungasensis* caracterizam-se por serem epífitas pequenas e perenes, com ramicaules curtos produzidos sucessivamente a partir de um rizoma grosso (Vásquez & Ibisch 2000). Estas espécies encontram-se distribuídas no gradiente altitudinal de 2.500 – 3.100 *m.s.n.m.* Entre 2.800 – 3.100 *m.s.n.m.* é possível encontrar populações simpátricas, onde indivíduos das três espécies crescem inclusive sobre o mesmo forófito, distribuindo-se, principalmente, nas zonas inferiores de Johansson (1974) de 1 – 1,5 m sobre o solo. *M. solomonii* e *M. yungasensis* florescem de outubro a fevereiro, com frutificação durante os meses de chuva tardia e início da época de seca (dezembro a maio). Em *M. scandens* a floração compreende o período de agosto a novembro, e a frutificação de fevereiro a maio (Moya, com. pess.).

Nas populações simpátricas dentro do PN-ANMI Cotapata tem se observado variabilidade na morfologia floral de *Masdevallia solomonii* e *M. yungasensis* e ainda a existência de indivíduos que compartilham características morfológicas intermediárias entre ambas as espécies sugerindo a possibilidade de hibridação ou introgressão natural.

Considerando que o êxito na conservação de populações de espécies raras, ameaçadas ou em perigo depende da manutenção de sua diversidade genética (Frankham *et al.* 2002) e que esta informação não se encontra disponível para estas espécies nativas da Bolívia, o presente estudo teve por finalidade avaliar a diversidade e estrutura genética em populações de *Masdevallia scandens*, *M. solomonii* e *M. yungasensis* presentes no PN-ANMI Cotapata, de modo a gerar subsídios para o estabelecimento de medidas de conservação efetivas.

METODOLOGIA

Espécies e populações

Populações de *Masdevallia solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens* foram localizadas nas trilhas pré-colombianas Chojllapata e Sillutinkara, e na localidade de Chuspipata dentro do PN-ANMI Cotapata do Departamento de La Paz, Bolívia (Figura 1). O número de populações amostradas foi de seis em *M. solomonii*, três em *M. yungasensis*, e duas em *M. scandens* (Tabela 1).

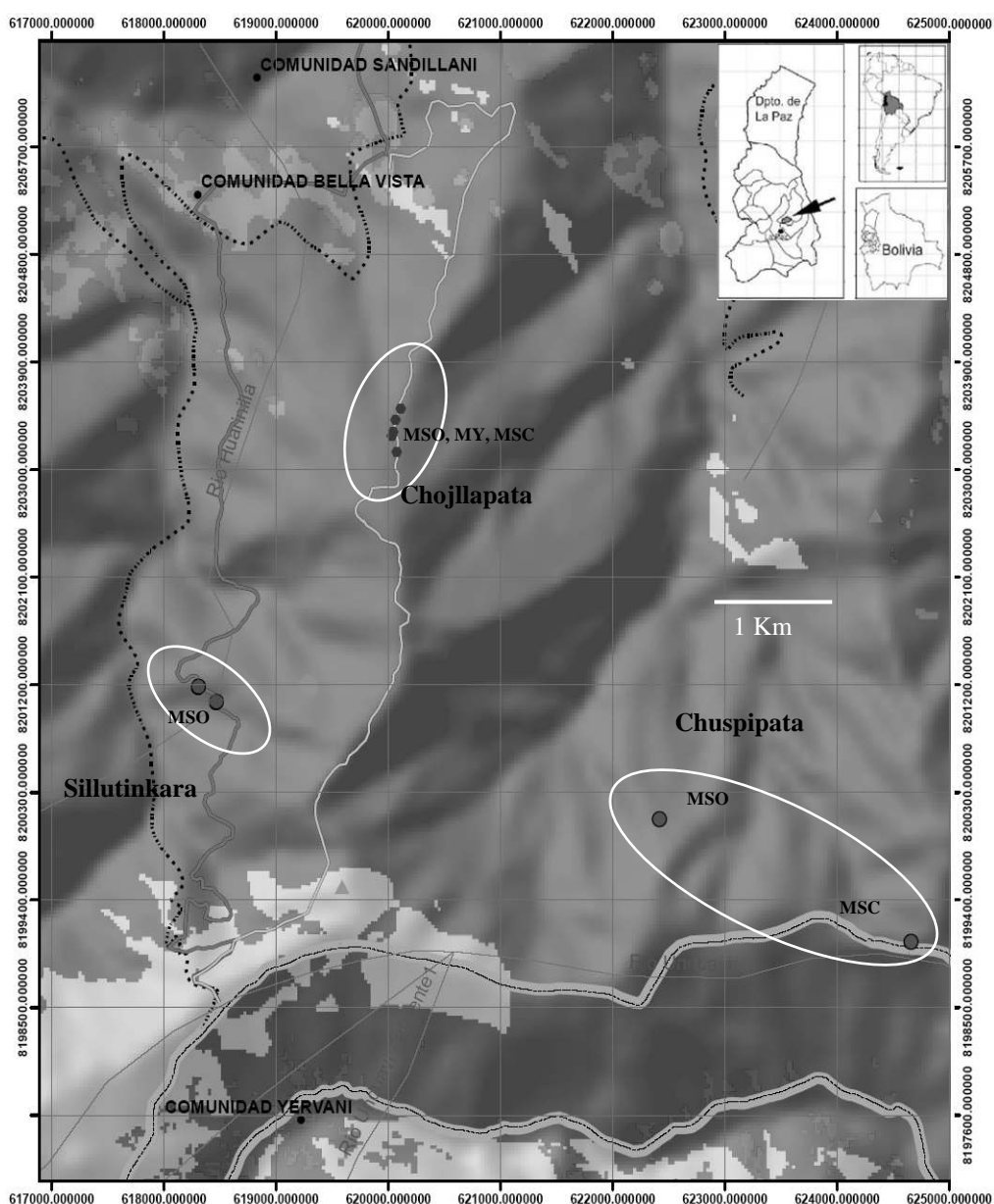


Figura 1: Localização das populações de *Masdevallia scandens* (MSC), *M. solomonii* (MSO) e *M. yungasensis* (MY) ocorrentes nas trilhas pré-colombianas Chojllapata, Sillutinkara, e na localidade de Chuspipata dentro do PN-ANMI Cotapata.

Por se tratarem de populações raras e ameaçadas, não foram amostrados todos os indivíduos encontrados. Os tamanhos amostrais são apresentados na Tabela 1. Para cada indivíduo, foi coletada uma folha jovem a qual foi desidratada em sílica gel, sendo depois todas as folhas conservadas a -20°C.

Tabela 1: Populações de *Masdevallia solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens* ocorrentes no PN-ANMI Cotapata (Bolívia).

ESPÉCIE	TAMAÑO POPULACIONAL								
	Chojllapata					Sillutinkara		Chuspipata	
	Cho_1	Cho_2	Cho_3	Cho_4	Cho_5	S1_1	Si_2	Chu_1	Chu_2
<i>M. solomonii</i>	29	17	11			11	13		16
<i>M. yungasensis</i>	78			11	13				
<i>M. scandens</i>	37							19	

Apresentam-se o número de indivíduos amostrados e genotipados.

Extração de DNA, amplificação e genotipagem

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo modificado descrito por Doyle & Doyle (1987). Dez pares de *primers* microssatélites desenvolvidos para *Masdevallia solomonii* (Capítulo 1) foram previamente testados em *M. yungasensis* e *M. scandens*, para verificar o potencial de transferabilidade. Posteriormente, as reações de amplificação de cada loco microssatélite foram realizadas utilizando o método de Schuelke (2000), que incorpora três primers: o *primer forward* (F) específico para esse loco acrescentado com uma cauda da sequência M13 (5' AGGAAACAGCTATGACCAT 3'), o *primer reverse* (R) específico, e o primer M13 marcado com um dos quatro fluoróforos do sistema DS-33 da Applied Biosystems (6-FAM, VIC, NED e PET). Cada reação de amplificação foi realizada em volume final de 10 µl com o kit TopTaq *Master Mix* (QIAGEN Inc., Hilden, Germany); usando 0,75 µM do primer F, 1,50 µM do primer R e 0,30 µM da cauda fluorescente M13, com, aproximadamente, 4 ng do DNA genômico. O programa utilizado constou de três etapas: Etapa 1 (94 °C por 3 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, T_a – onde T_a é a temperatura de anelamento particular para cada *primer* – por 1 min), etapa 2 (8 ciclos de 94°C por 1 min, 53 °C por 1 min, 72 °C por 1 min), e etapa 3 de extensão final (72 °C por 30 min); em alguns casos foi necessária a utilização de programas *Touchdown* (60-54°C e 58-48°) seguidos pelas etapas 2 e 3. Os indivíduos correspondentes a cada uma

das populações amostradas foram genotipados e os genótipos dos locos de microssatélites analisados com o software GENEMAPPER v. 4.0 (Applied Biosystems).

Análise genética

A variabilidade genética inter e intra-populacional em cada uma das espécies foi determinada a partir do cálculo das frequências alélicas e de índices de diversidade: número de alelos por loco polimórfico (N_a), número de alelos efetivos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_E). Estes últimos foram comparados para avaliar o desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) utilizando para isto o teste de X^2 (Levene 1949). Todos estes parâmetros foram calculados com o programa GENALEX v. 6.4.1 (Peakall & Smouse 2006).

Adicionalmente, o programa MICROCHECKER v. 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004), foi utilizado para inferir a presença de alelos nulos que pudessem influenciar nos valores dos desvios de EHW. Também foi utilizado o programa BOOTLENECK 1.2.02 (Piry *et al.* 1999) para detectar possíveis efeitos de gargalo nas populações. A análise foi realizada considerando o modelo TPM de evolução dos microssatélites com 95 % de contribuição do modelo SMM e 5 % do modelo IAM, considerando uma variância na taxa de mutação igual a 12, segundo o sugerido por Pinheiro *et al.* (2011).

Com o programa GENEALEX determinou-se também o coeficiente de endogamia F_{IS} (Wright 1978) dentro das populações. Este programa foi também utilizado para determinar como se encontra distribuída a variabilidade genética das espécies, utilizando para isso a análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992). Complementariamente se utilizou o Software GENODIVE versão 2.0b20 (Meirmans & Tienderen 2004) para o cálculo do índice de endogamia (G_{IS}) e dos índices de divergência genética: G_{ST} (Nei 1987), G'_{ST} (padronizado, Hedrick 2005), G''_{ST} (padronizado e corrigido para pequeno número de populações, Meirmans & Hedrick 2011) e D (Jost 2008). Os valores do G''_{ST} foram utilizadas para o cálculo da quantidade de fluxo gênico efetivo, a través da equação de Wright (1931).

Foi determinada a matriz de distâncias genéticas (Nei 1978) entre as populações das três espécies para construir um dendrograma usando algoritmo de *neighbor-joining* (Saitou & Nei 1987) implementado no pacote NEIGHBOR do programa PHYLIP (Felsenstein 1993). Para avaliar o suporte dos ramos, foram utilizadas de 1000 matrizes de *bootstrap* com reamostragem de locos, com os pacotes SEQBOOT, GENDIST, NEIGHBOR e

CONSENSE do PHYLIP. O dendrograma foi visualizado e editado no TREEVIEW (Page 1996).

Para inferir o número de agrupamentos genéticos correspondentes às populações amostradas foi realizada uma análise Bayesiana no programa STRUCTURE 2.3.3 (Hubisz *et al.* 2009). O número de populações presumidas (K) foi estimado por corridas sucessivas com $K = 1$ a $K = 12$, com 10 corridas independentes para cada valor de K . Cada corrida consistiu de 500.000 iterações de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com um *burn-in* inicial de 100.000 iterações, assumindo modelo de mistura (*admixture*) e alelos correlacionados entre populações. Os coeficientes de mistura e correlação também foram inferidos pelo MCMC. O número de K ideal foi estimado usando o software STRUCTURE-HARVESTER (Earl 2011), sendo calculada a média de cada valor de probabilidade K , “log da probabilidade” [$\ln P(D)$], através de todas as corridas, segundo o método de Evanno *et al.* (2005). Para verificar a existência de possíveis indivíduos híbridos ou introgrididos foi calculado o *Index Hybrid* (Buerkle 2005) no software GENODIVE.

O número de populações que se necessitariam para representar uma determinada proporção (P) da diversidade genética em cada espécie foi calculado a partir da equação modificada de Ceska *et al.* (1997): $P = 1 - (F_{ST})^n$, onde n é o número de populações. Para nossa análise o índice de fixação F_{ST} foi substituído pelo índice de diferenciação D (Jost 2008).

RESULTADOS

Diversidade Genética

As populações das três espécies avaliadas apresentaram altos valores de diversidade genética (Tabela 2) na maioria dos locos microssatélites amplificados. O grau de polimorfismo foi variável entre as espécies com uma média de $N_a = 13,7$ em *M. solomonii*, 12,9 em *M. yungasensis*, e 9,2 em *M. scandens*. O N_e foi maior em *M. yungasensis* (4,230) e menor em *M. scandens* (3,055). A diversidade total foi alta e semelhante entre *M. solomonii* e *M. yungasensis*, nestas, os locos mais polimórficos foram MSO103_2 e MSO65. *M. scandens* apresentou uma diversidade menor, correspondente aos locos MSO5Y e MSO65.

Tabela 2: Caracterização da variabilidade genética de dez locos microssatélites em populações de *Masdevallia solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens* ocorrentes no PN-ANMI Cotapata, Bolívia.

Locos microssatélites	<i>M. solomonii</i> (N=94)			<i>M. yungasensis</i> (N=61)			<i>M. scandens</i> (N=49)		
	N_a	N_e	H_T	N_a	N_e	H_T	N_a	N_e	H_T
MSO70	12	3,232	0,763	9	2,591	0,638	8	2,381	0,594
MSO103_2	18	3,005	0,773	20	4,557	0,885	6	1,985	0,804
MSO105_1	16	3,042	0,765	16	5,400	0,893	9	1,544	0,370
MSO65	18	2,826	0,793	18	7,039	0,907	17	6,200	0,880
MSO12Y	4	2,040	0,533	4	1,382	0,307	2	1,243	0,215
MSO6_2	16	3,103	0,778	16	5,390	0,870	9	2,785	0,678
MSO105_2	11	3,285	0,785	7	2,853	0,684	10	3,152	0,726
MSO5Y	14	6,247	0,893	13	5,201	0,873	12	3,447	0,755
MSO103_1	16	3,126	0,779	17	5,564	0,891	7	3,200	0,713
MSO68	12	3,186	0,736	9	2,320	0,689	12	4,616	0,815
Média	13,7	3,309	0,760	12,9	4,230	0,764	9,2	3,055	0,655

N = tamanho amostral, N_a = número de alelos por loco polimórfico, N_e = Número de alelos efetivos, H_T = heterozigosidade total.

Um resumo dos parâmetros de diversidade genética avaliados por espécie e população é apresentado na Tabela 3. Os valores de heterozigosidade esperada e observada nas populações de *Masdevallia solomonii* oscilaram entre 0,598 a 0,749 e de 0,489 a 0,577, respectivamente. A heterozigosidade foi maior em *M. yungasensis*: de 0,671 – 0,754 (H_E) e de 0,500 – 0,673 (H_O). As populações de *M. scandens* apresentaram valores médios de H_E e H_O de 0,528 e 0,586, respectivamente.

Tabela 3: Caracterização da variabilidade genética das populações de *Masdevallia solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens* ocorrentes no PN-ANMI Cotapata, Bolívia.

Populações	N	N_a	N_e	A_E	A_R	RA	H_O	H_E	F_{IS}	G_{IS}
<i>M. solomonii</i>										
MSO_Cho1	26	77	41	12	6	4,202	0,524	0,732	0,277	0,303
MSO_Cho2	17	77	46	15	3	4,421	0,514	0,749	0,283	0,344
MSO_Cho3	11	36	27	1	0	3,043	0,489	0,612	0,227	0,256
MSO_Si1	11	55	29	5	4	3,609	0,515	0,598	0,146	0,196
MSO_Si2	13	65	43	12	7	4,257	0,577	0,732	0,187	0,239
MSO_Ch2	16	60	31	9	4	3,642	0,493	0,643	0,231	0,261
Média									0,229	0,270
<i>M. yungasensis</i>										
MY_Cho1	35	110	60	47	27	6,443	0,500	0,754	0,316	0,350
MY_Cho4	15	64	38	5	4	4,744	0,673	0,671	-0,001	0,031
MY_Cho5	11	59	39	11	5	5,195	0,568	0,677	0,139	0,209
Média									0,150	0,203
<i>M. scandens</i>										
MSC_Cho1	30	74	27	40	20	3,573	0,529	0,617	0,144	0,160
MSC_Ch1	19	52	29	18	5	5,039	0,526	0,554	0,025	0,077
Média									0,085	0,121

N = tamanho amostral, N_a = número de alelos por loco polimórfico, A_E = alelos exclusivos, A_R = alelos raros, RA = riqueza alélica, N_e = Número de alelos efetivos, H_O = heterozigiosidade observada, H_E = heterozigiosidade esperada, F_{IS} e G_{IS} = coeficiente de endogamia dentro das sub-populações.

Observou-se elevada quantidade de alelos exclusivos para as três espécies nas populações Cho1 (12 para *Masdevallia solomonii*, 47 em *M. yungasensis*, e 40 em *M. scandens*), a maioria deles raros (frequências < 0,05), reduzindo assim o número de alelos efetivos nessas populações (Tabela 2). O número de alelos exclusivos foi também alto na população MSO_Ch2 ($A_E = 15$), no entanto, estes encontrarem-se em frequências maiores que 0,05, e em consequência disso o número de alelos efetivos nesta população foi maior do que as outras. Os valores de diversidade encontrados nas populações simpátricas Cho1 foram especialmente relevantes em *M. yungasensis* que apresentou o maior N_e comparado com as outras populações.

Elevados valores de riqueza alélica foram encontrados nas populações de *Masdevallia yungasensis*, sendo MY_Cho1 a população com maior riqueza para esta espécie (6,443); de maneira semelhante MSO_Cho2 (4,421) em *M. solomonii* e MSC_Ch1 (5,039) em *M. scandens*. A endogamia foi elevada na maioria das populações, com exceção de MY_Cho4 ($F_{IS} = -0,001$ e $G_{IS} = 0,031$), e MSC_Ch1 ($F_{IS} = 0,025$ e $G_{IS} = 0,077$). O coeficiente de endogamia no nível de espécie foi maior em *M. solomonii* ($F_{IS} = 0,229$ e $G_{IS} = 0,270$) do que em *M. yungasensis* ($F_{IS} = 0,150$ e $G_{IS} = 0,203$) e *M. scandens* ($F_{IS} = 0,085$ e $G_{IS} = 0,121$).

Distâncias genéticas

A análise de agrupamento usando o algoritmo *neighbor-joining* mostrou a todas as populações de *M. solomonii* formando um grupo separado das outras espécies (*bootstrap* (BS) = 81,8); dentro do mesmo, o padrão de agrupamento não apresentou relação alguma com a localidade, dessa forma MSO_Cho1, MSO_Si1, MSO_Cho3 e MSO_Chu2 formaram um grupo (BS = 70,1%) diferenciado de MSO_Cho2 e MSO_Si2 que não apresentaram boa resolução. Embora as populações de *M. scandens* apareceram bem sustentadas como espécie (BS = 94,9%), estas apresentaram alta similaridade genética com as populações MY_Cho4 e MY_Cho5 de *M. yungasensis* (BS = 81,7%), diferenciando-se em conjunto (BS = 64,3) de MY_Cho1.

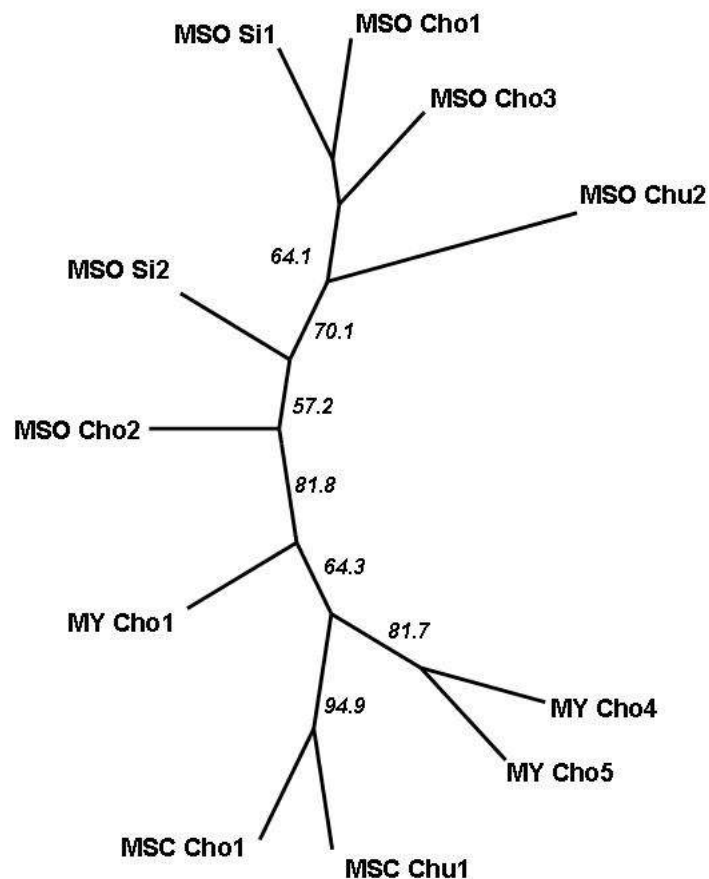


Figura 2: Árvore de consenso de maioria, com as relações genéticas entre as populações de *M. solomonii* (MSO), *M. yungasensis* (MY) e *M. scandens* (MSC), baseado na estimativa das distâncias genéticas de Nei (1978) e construído usando o algoritmo de *neighbor joining*, com 1000 replicações de reamostragem dos locos para cálculo dos valores de *bootstrap*. Ver tabela 3 para nomes das populações.

Estrutura genética

A análise Bayesiana realizada no STRUCTURE mostrou valores de $\ln P(D)$ e ΔK que indicaram três agrupamentos genéticos (Figura 3). Os indivíduos identificados em campo como *Masdevallia solomonii* correspondeu ao primeiro grupo genético, os indivíduos de *M. yungasensis* ao segundo grupo e *M. scandens* ao terceiro (Figura 4). No entanto, dentro de cada grupo encontraram-se indivíduos com perfis e frequências alélicas similares aos das outras duas espécies, como um indicativo de ascendência mista.

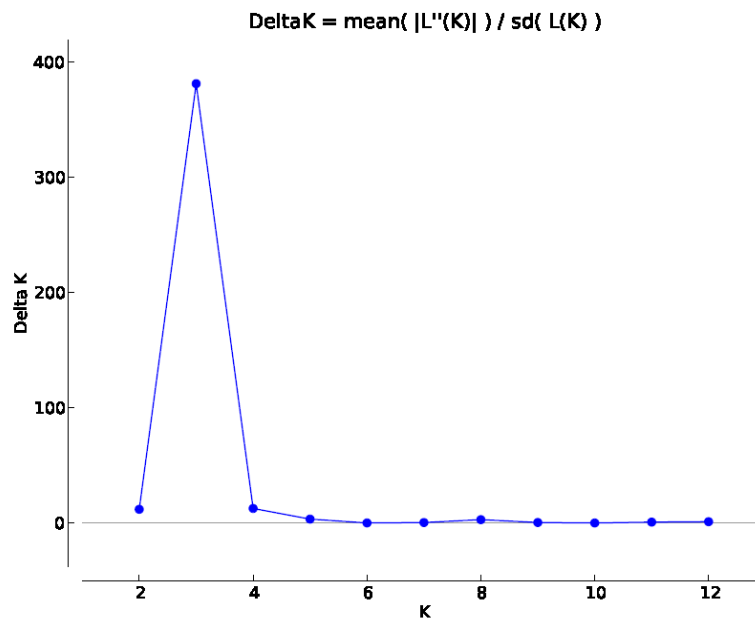


Figura 3: ΔK calculado como $\Delta K = m | L''(K) | / s [L (K)]$. O valor desta distribuição modal é o verdadeiro K ou o mais alto nível de estrutura.

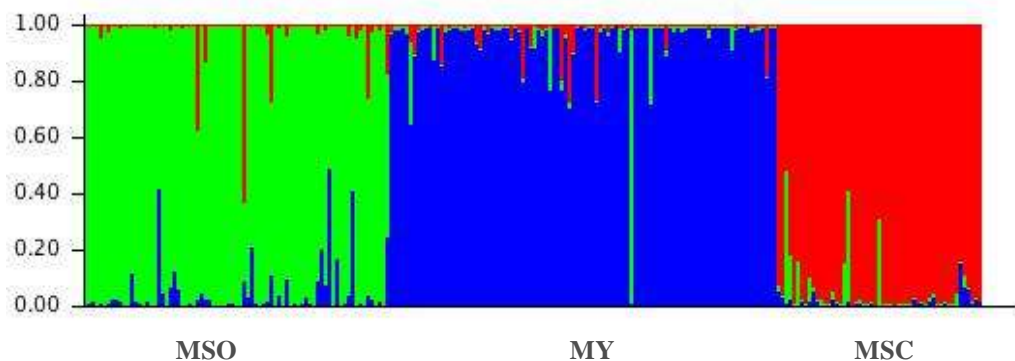


Figura 4: Representação gráfica dos diferentes agrupamentos genéticos para $K = 3$ gerados através da análise Bayesiana no STRUCTURE, correspondentes a *M. solomonii* (MSO), *M. yungasensis* (MY) e *M. scandens* (MSC) ocorrentes no PN-ANMI Cotapata, baseado na informação de 10 locos microssatélites, modelo de mistura e locos correlacionados.

Indivíduos com ascendência mista ($0,2 < q < 0,8$) foram observados nas populações das três espécies, sendo eles mais numerosos em *M. solomonii* e *M. yungasensis* do que em *M. scandens*. Estes indivíduos encontraram-se principalmente nas populações simpátricas, porém também em algumas populações não simpátricas de *M. solomonii*. A proporção de hibridação/introgressão segundo o *Hybrid Index* (Buerkle, 2005) é apresentada na figura 5, onde valores próximos a 1,0 indicam a afinidade com a população de referência e os valores próximos a zero afinidade com a população alternativa.

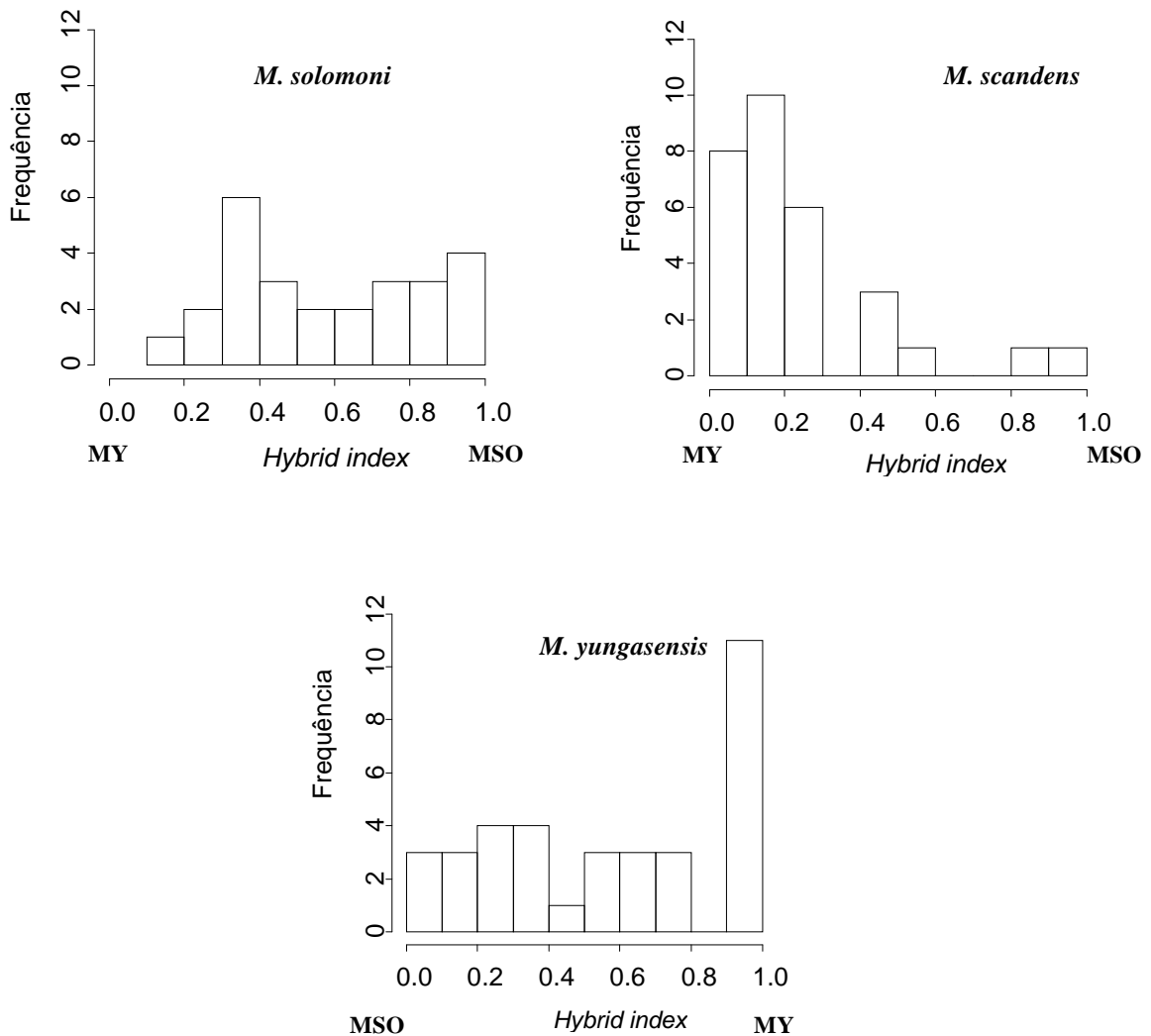


Figura 5: Histogramas que representam as frequências de indivíduos híbridos/introgressados, segundo os valores do *Hybrid Index* (Buerkle, 2005) em populações simpátricas de *Masdevallia solomonii* (MSO), *M. scandens* (MSC) e *M. yungasensis* (MY). A) Graus de hibridação/introgressão em indivíduos de MSO que crescem em simpatria com MY; população de referência = população pura MSO, população alternativa = população pura MY. B) Graus de hibridação/introgressão em indivíduos de MSC que crescem em simpatria com MSO e MY; população de referência = população pura MSO, população alternativa = população pura MY. C) Graus de hibridação/introgressão em indivíduos de MY que crescem em simpatria com MSO; população de referência = população pura MY, população alternativa = população pura MSO.

Masdevallia solomonii

Os locos microssatélites avaliados foram altamente polimórficos em todas as populações de *M. solomonii* (Tabelas 2 e 3), ressaltando a variabilidade encontrada em MSO_Cho1 e MSO_Cho2, ambas apresentaram um N_a médio = 7,7 e N_e médio = 4,129 e 4,567, respectivamente. Estes valores chamaram a atenção, principalmente ao comparar os tamanhos amostrais correspondentes. A menor diversidade alélica foi encontrada em MSO_Cho3 ($N_a = 3,6$ e $N_e = 2,725$).

No Chojllapata, MSO5Y foi o loco mais polimórfico para todas as populações (N_a médio = 8,5) principalmente em MSO_Cho1 (10 alelos); contrariamente, o loco MSO12Y, foi o menos polimórfico com o N_a médio = 2,8. A população com menor diversidade alélica em todos os locos foi MSO_Cho3. Alelos exclusivos foram encontrados nas três populações de Chojllapata: 12 no MSO_Cho1 (seis raros), 15 em MSO_Cho2 (quatro raros) e 1 em MSO_Cho3 (Tabela 3).

Nas populações do Sillutinkara os locos mais polimórficos foram MSO70 e MSO105_1. A maior variabilidade foi observada em MSO_Si2 com valores de N_a médio = 6,5 e N_e médio = 4,340. Ambas as populações apresentaram alelos exclusivos, cinco deles em MSO_Si1 (todos eles raros) e 12 em MSO_Si2 (sete raros).

Na única população de *M. solomonii* em Chuspipata (MSO_Ch2) o número de alelos por loco polimórfico oscilou entre três e oito, com uma média de $N_a = 6,0$ e $N_e = 3,950$. Os locos mais polimórficos foram MSO5Y (oito alelos), MSO70, MSO65 e MSO105_2 com sete alelos cada um deles. Nesta população, encontraram-se nove alelos exclusivos, quatro deles raros.

Os valores da heterozigosidade observada oscilaram entre 0,489 e 0,577, estes foram menores em relação aos valores esperados em todas as populações, apresentando por isso, desvios significativos do EHW em pelo menos dois de dez locos microssatélites avaliados (Tabela 4). A população MSO_Si2 apresentou seis locos com desvios significativos de altos a moderados; em contrapartida, na população MSO_Ch2 o desvio foi significativo apenas em dois locos (MSO6_2 e MSO105_2). Todas as populações apresentaram diferentes graus de endogamia com valores de F_{IS} entre 0,146 e 0,283 (Tabela 3).

Tabela 4: Teste Exato de Fisher, para desvios EHW em populações de *Masdevallia solomonii*.

Locos	MSO_Cho1	MSO_Cho2	MSO_Cho3	MSO_Si1	MSO_Si2	MSO_Ch2
MSO70	0,098	0,254	0,226	0,952	0,134	0,987
MSO103_2	0,000***	0,000***	0,001**	0,000***	0,000***	0,406
MSO105_1	0,000***	0,000***	0,000***	0,662	0,003**	0,123
MSO65	0,235	0,011*	0,267	0,952	0,037*	0,213
MSO12Y	0,189	0,274	0,294	0,461	0,250	0,599
MSO 6_2	0,000***	0,000***	0,069	0,013*	0,032*	0,010**
MSO 105_2	0,035*	0,177	0,351	0,020*	0,111	0,000***
MSO 5Y	0,512	0,224	0,033*	0,417	0,009**	0,582
MSO 103_1	0,000***	0,000***	0,000***	0,307	0,023*	0,140
MSO 68	0,925	0,915	0,072	0,143	0,935	0,069

Valores de significância: * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

A análise de variância molecular AMOVA (Tabela 5) mostrou que as diferenças genéticas entre as populações são responsáveis por uma porcentagem pequena da variabilidade da espécie (12%), no entanto, a maior parte da variabilidade (88%) é devida às diferenças genéticas entre os indivíduos dentro das populações. Já os índices de divergência obtidos mostraram uma considerável estruturação da diversidade genética entre as populações ($G''_{ST} = 0,26$; $D = 0,200$), conforme Tabela 6. Em relação ao fluxo gênico inferido, este apresentou um valor $N_e m = 0,712$.

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) em seis populações de *Masdevallia solomonii*.

Fonte de variação	GL	SQ	% Variação
Entre regiões	2	50,078	0%
Entre populações	3	86,844	12%
Dentro das populações	88	811,962	88%
Total	93	948,884	100%

Tabela 6: Índices de divergência genética entre populações de *Masdevallia solomonii*.

Locos	G_{ST}	$G'_{ST} (Hed)$	G''_{ST}	D
MSO70	0,063	0,252	0,261	0,202
MSO103_2	0,076	0,302	0,313	0,245
MSO105_1	0,070	0,277	0,287	0,223
MSO65	0,154	0,530	0,544	0,445
MSO12Y	0,014	0,033	0,035	0,019
MSO6_2	0,078	0,317	0,328	0,259
MSO105_2	0,027	0,131	0,136	0,107
MSO5Y	0,026	0,234	0,238	0,214
MSO103_1	0,076	0,311	0,321	0,254
MSO68	0,035	0,137	0,143	0,106
Média	0,063	0,250	0,260	0,200

G_{ST} = Índice de fixação; $G'_{ST} (Hed)$ = Índice de fixação padronizado de Hedrick; G''_{ST} = Índice de fixação padronizado e corrigido para pequeno número de populações; D = Índice de diferenciação de Jost (2008).

Masdevallia yungasensis

A maioria dos locos foi altamente polimórfica em todas as populações (N_a médio = 7,8 e N_e médio = 4,590); a heterozigosidade média esperada (H_E) foi também elevada (Tabela 3). A maior diversidade alélica foi observada em MY_Cho1 ($N_a = 11,0$ e $N_e = 6,013$); enquanto nas outras populações os valores de N_a e N_e foram menores, porém muito semelhantes. MSO103_2 e MSO65 foram os locos mais polimórficos em todas as populações apresentando 20 e 18 alelos, respectivamente. O loco MSO12Y foi o menos polimórfico, com um máximo de quatro alelos.

Em MY_Cho1, o maior número de alelos foi observado nos locos MSO103_1 e MSO65, sendo também este último o loco o mais polimórfico em MY_Cho4 (11 alelos) e MY_Cho5 (nove alelos). As três populações apresentaram alelos exclusivos: 47 em MY_Cho1 (27 raros), 5 em MY_Cho4 (4 raros) e onze em MY_Cho5 (5 raros).

Os valores de heterozigosidade esperada (H_E) oscilaram entre 0,671 e 0,754 (Tabela 3), com o valor mais baixo na população MY_Cho4. Comparando-se estes com os valores de heterozigosidade observada (H_O) mediante o teste exato de Fisher, encontram-se desvios significativos ao HWE em pelo menos dois dos 10 locos de todas as populações (Tabela 7). Os valores de F_{IS} e G_{IS} (Tabela 3) mostraram que, com exceção de MY_Cho4, as populações de *M. yungasensis* apresentam diferentes graus de endogamia, e os índices de endogamia para a espécie foram de $F_{IS} = 0,150$ e $G_{IS} = 0,203$.

Tabela 7: Teste exato de Fisher para desvios HWE em populações de *Masdevallia yungasensis*.

Locos	MY_Cho1	MY_Cho4	MY_Cho5
MSO70	0,000***	0,767	0,989
MSO103_2	0,000***	0,002**	0,002**
MSO105_1	0,000***	0,683	0,261
MSO65	0,414	0,377	0,518
MSO12Y	0,652	0,894	0,965
MSO6_2	0,000***	0,014*	0,408
MSO105_2	0,312	0,409	0,001***
MSO5Y	0,374	0,818	0,668
MSO103_1	0,000***	0,683	0,261
MSO68	0,947	0,011*	0,837

Valores de significância: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

A análise de variância molecular revelou que só 10 % da variabilidade observada em *M. yungasensis* pode ser atribuída às diferenças entre as populações (Tabela 8), portanto, a maior proporção da variabilidade genética deve-se às diferenças entre os indivíduos dentro destas. O fluxo gênico inferido foi de $N_e m = 0,746$.

Tabela 8: Análise de variância molecular (AMOVA) entre três populações de *Masdevallia yungasensis*

Fonte de variação	GL	SQ	% variação
Entre populações	2	57,088	10%
Dentro das populações	58	540,434	90%
Total	60	597,522	100%

O grau de estruturação da variabilidade genética nas populações de *Masdevallia yungasensis* ($G''_{ST} = 0,251$; $D = 0,196$) foi e semelhante ao encontrado em *M. solomonii*, conforme Tabela 9.

Tabela 9: Índices de divergência genética das populações de *Masdevallia yungasensis*.

Locos	G_{ST}	$G'_{ST} (Hed)$	G''_{ST}	D
MSO70	0,007	0,024	0,027	0,017
MSO103_2	0,067	0,545	0,560	0,512
MSO105_1	0,051	0,474	0,487	0,446
MSO65	0,022	0,277	0,284	0,261
MSO12Y	0,069	0,110	0,139	0,044
MSO6_2	0,023	0,216	0,224	0,197
MSO105_2	0,012	0,048	0,054	0,037
MSO5Y	0,048	0,399	0,413	0,369
MSO103_1	0,042	0,412	0,424	0,386
MSO68	0,144	0,454	0,491	0,362
Média	0,047	0,234	0,251	0,196

G_{ST} = Índice de fixação; $G'_{ST} (Hed)$ = Índice de fixação padronizado de Hedrick; G''_{ST} = Índice de fixação padronizado e corrigido para pequeno número de populações; D = Índice de diferenciação Jost (2008).

Masdevallia scandens

As duas populações de *M. scandens* avaliadas mostraram alta variabilidade na maioria dos locos. No entanto no loco MSO105_1, um dos nove alelos, esteve presente em frequência superior a 95%, sendo, portanto, considerado monomórfico. O loco MSO103_2, amplificou apenas em 14 de 30 indivíduos de MSC_Cho1 e dois dos 19 indivíduos da população MSC_Chu1. Um padrão similar foi observado no loco MSO105_2, que amplificou em 29 de 30 indivíduos da população MSC_Cho1, e apenas em oito de 19 indivíduos de MSC_Chu1. Por outro lado, o loco MSO103_1 não amplificou em nenhum

dos indivíduos de MSC_Chu1. Por as razões mencionadas, estes locos foram desconsiderados na estimativa dos parâmetros de divergência genética desta espécie.

Entre os locos polimórficos, MSO65 apresentou a maior número de alelos em ambas as populações (14 e 11 alelos, respectivamente). Na população MSC_Cho1, o N_a médio foi de 7,4 e o N_e médio 2,745. O N_a foi menor (5,200) na população MSC_Chu1. No entanto, esta apresentou um N_e médio maior (2,909). Estes valores indicam que embora os locos sejam polimórficos, alguns deles apresentam um número elevado de alelos com baixa frequência, principalmente na população MSC_Cho1 (Tabela 3). Nove dos 10 locos apresentaram alelos exclusivos nas duas populações, estando 40 deles no MSC_Cho1 (20 raros), e 18 em MSC_Chu1 (5 raros).

Através das probabilidades do teste exato de Fisher (Tabela 10) verificou-se que na população MSC_Cho1 só dois locos (MSO12Y e MSO68) encontraram-se nas proporções esperadas para HWE. O contrário foi observado em MSC_Chu1, na qual a maioria dos locos polimórficos não apresentou desvios significativos do HWE.

Tabela 10: Teste Exato de Fisher para desvios HWE em populações de *Masdevallia scandens*.

Locos	MSC_Cho1	MSC_Chu1
MSO70	0,014*	0,769
MSO103_2	0,000***	Não amplificou
MSO105_1	Monomórfico	Monomórfico
MSO65	0,005**	0,539
MSO12Y	0,130	0,906
MSO6_2	0,000***	0,006**
MSO105_2	0,000***	Não amplificou
MSO5Y	0,001***	0,930
MSO103_1	0,000***	Não amplificou
MSO68	0,885	0,949

Valores de significância: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

As duas populações de *Masdevallia scandens* mostraram valores consideráveis de endogamia, sendo esta maior em MSC_Cho1 ($F_{IS} = 0,144$; $G_{IS} = 0,160$) e muito menor em MSC_Chu1 ($F_{IS} = 0,025$; $G_{IS} = 0,077$). O valor médio de endogamia para a espécie foi menor ($F_{IS} = 0,085$ e $G_{IS} = 0,121$) do que em *M. solomonii* e *M. scandens*. A AMOVA realizada com informação de sete locos polimórficos (Tabela 11) mostrou que as diferenças entre as duas populações explicam apenas 8 % da variabilidade total observada, e que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações (92%).

Tabela 11: Análise de variância molecular (AMOVA) em populações de *Masdevallia scandens*.

Fonte de variação	GL	SQ	% Variação
Entre populações	1	14,484	8%
Dentro das populações	47	225,740	92%
Total	48	240,224	100%

O fluxo gênico inferido foi alto ($N_e m = 1,851$) indicando que as populações destas duas localidades, apesar de estar geograficamente isoladas, apresentam alelos e frequências similares, resultantes de trocas gênicas entre elas. Os valores de divergência genética entre as populações de *M. scandens* ($G_{ST} = 0,024$; $G''_{ST} = 0,119$; $D = 0,075$) foram menores do que em *M. solomonii* e *M. yungasensis*, indicando uma baixa estruturação (Tabela 12).

Tabela 12: Índices de divergência genética entre populações de *Masdevallia scandens*.

Locos	G_{ST}	$G'_{ST}(Hed)$	G''_{ST}	D
MSO70	0,001	0,005	0,006	0,004
MSO105_1	0,018	0,039	0,056	0,021
MSO65	0,024	0,319	0,336	0,302
MSO12Y	0,077	0,114	0,177	0,041
MSO6_2	0,022	0,108	0,128	0,088
MSO5Y	0,039	0,247	0,275	0,216
MSO68	0,018	0,161	0,176	0,146
Média	0,024	0,097	0,119	0,075

G_{ST} = Índice de fixação; $G'_{ST}(Hed)$ = Índice de fixação padronizado de Hedrick; G''_{ST} = Índice de fixação padronizado e corrigido para pequeno número de populações; D = Índice de diferenciação Jost (2008).

Relacionando os valores de divergência genética encontrados nas três espécies e aplicando a equação de Ceska *et al.* (1997), determinou-se que em *Masdevallia solomonii* ($D = 0,200$) a conservação de quatro populações permite representar 99,84 % da diversidade atribuída à maioria dos alelos comuns. Da mesma maneira, em *M. yungasensis* ($D = 0,196$) a conservação das três populações preservaria 99, 2 % da diversidade. Já em *M. scandens* ($D = 0,075$) a proteção de uma das populações permitiria manter 99,2% da diversidade observada.

DISCUSSÃO

Diversidade genética em Masdevallia

Os altos níveis de diversidade encontrados em *Masdevallia solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens* são semelhantes àqueles encontrados em locos microssatélites das espécies terrestres *Chiloglottis valida* D.L.Jones (Flanagan 2006) e *Epidendrum fulgens* Brongn. (Pinheiro *et al.* 2011). Entretanto, são maiores do que os valores reportados em *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr. (Cortés-Palomec *et al.* 2008) e *Caladenia* (Swarts *et al.* 2007) ambas endêmicas e ameaçadas; e menores do que os valores encontrados em *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. (Campbell *et al.* 2002) uma espécie terrestre rara. Elevada variabilidade genética também têm sido reportada em locos de alozimas em outras orquídeas neotropicais rupícolas e epífitas, entre elas *Acianthera* spp., (como *Pleurothallis* spp. Borba *et al.* 2001a) e *Gomezia hookeri* (Alcântara *et al.* 2006).

Os valores de diversidade encontrados em *Masdevallia solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens* contrastam com o que se esperaria em orquídeas polinizadas por dípteros, os quais apresentam um comportamento que favorece a geitonogamia (Borba & Semir 2001). Os elevados valores de F_{IS} e G_{IS} encontrados demonstram isto. No entanto, os valores dos índices de endogamia poderiam também estar refletindo, em algum grau, a endogamia biparental ocasionada pela proximidade de indivíduos geneticamente aparentados, ou seja, grupos com elevados níveis de similaridade genética entre pares de *genets* separados por curtas distâncias (Wright 1943).

De acordo com Borba *et al.* (2001b, 2009), a manutenção dos elevados níveis de variabilidade genética encontrada em orquídeas miófilas seria alcançada em resposta ao comportamento do polinizador; e, na manutenção desta alta diversidade, devem estar presentes mecanismos de autoincompatibilidade nas espécies. No caso *M. solomonii* e *M. yungasensis*, têm-se observado que ambas as espécies podem formar frutos a partir da autopolinização Moya (com. pess.). Porém, as sementes produzidas frequentemente apresentam porcentagens consideráveis de ausência do embrião e reduzida viabilidade (54%), em comparação com sementes provenientes de polinização cruzada (Mamani, com. pess.), o que é forte evidência de auto-incompatibilidade parcial, ou depressão endogâmica. Existe também a possibilidade de estas espécies apresentarem sistemas reprodutivos mistos como o sugerido para *M. infracta* (Borba 2009), sendo este um

mecanismo para garantir o sucesso reprodutivo e a variabilidade genética nessas populações.

Estruturação genética

A estimativa da divergência genética em espécies em Orchidaceae tem utilizado principalmente marcadores codominantes de alozimas, relatando com estas, valores baixos a moderados, com uma média de $G_{ST} = 0,061$ em 71 espécies avaliadas (Forrest *et al.* 2004). No entanto, existem exceções importantes (Wallace, 2002) em *Platanthera leucophaea* ($G_{ST} = 0,750$). Um elevado valor de G_{ST} (0,924) foi também registrado utilizando marcadores dominantes RAPD em *Zeuxine strateumatica* (Sun & Wong 2001). Estudos mais recentes ressaltam a alta variabilidade genética dentro das populações e baixo ou moderado nível de diferenciação entre populações co-específicas, especialmente em *Bulbophyllum* (Azevedo *et al.* 2007; Ribeiro *et al.* 2008) avaliadas com locos de alozimas e em *Gymnadenia conopsea* ($G_{ST} = 0,060$) utilizando locos microssatélites.

A correlação negativa entre a variabilidade genética dentro das populações (H_s) e a diferenciação entre estas (G_{ST}) tem sido identificada em numerosas espécies de plantas, tanto utilizando marcadores dominantes RAPD (Nybom & Bartish 2000) quanto com marcadores codominantes alozimas (Hamrick & Godt 1989). Segundo Jost (2008), os índices derivados do F_{ST} , principalmente o G_{ST} , tendem a subestimar o grau de estruturação genética, uma vez que estes são afetados por altos valores de variação intra-populacional. Reconhecendo as limitações do G_{ST} , recentes estudos em genética de populações que utilizam locos microssatélites altamente variáveis, vêm utilizando outros índices de divergência genética para a análise, principalmente G'_{ST} , G''_{ST} e D .

No presente estudo, foi observada uma moderada estruturação genética em *Masdevallia solomonii* ($G'_{ST} = 0,250$, $D = 0,200$) e *M. yungasensis* ($G'_{ST} = 0,234$; $D = 0,196$), e baixa estruturação em *M. scandens* ($G'_{ST} = 0,097$; $D = 0,075$) mostrando assim que as populações apresentam uma subdivisão genética. Os valores de G'_{ST} encontrados em *M. solomonii* e *M. yungasensis* se aproximaram aqueles relatados por Pinheiro *et al.* (2011) em *Epidendrum fulgens* ($G'_{ST} = 0,235$) e *E. puniceoluteum* ($G'_{ST} = 0,290$) obtidos também a partir da informação de locos microssatélites. No entanto a área de distribuição de *Epidendrum* e as distâncias entre as populações indicadas no mencionado estudo são maiores que a área de distribuição das populações de *Masdevallia* aqui avaliadas. Assim

sendo, os valores de divergência encontrados por Pinheiro *et al.* (2011) poderiam ser explicados pelo isolamento por distância.

Entretanto, os valores de divergência genética G''_{ST} encontrados em *M. solomonii* ($G''_{ST} = 0,260$) e *M. yungasensis* ($G''_{ST} = 0,251$) foram maiores que os estimados a partir de marcadores ISSR em *Catleya elongata* ($G''_{ST} = 0,210$, recalculado de Cruz *et al.* 2011).

Significativos níveis de estruturação têm sido reportados em outros gêneros dentro de Pleurothallidinae, como em *Pleurothallis* (G_{ST} médio = 0,101) e *Lepanthes* (G_{ST} médio = 0,175) a partir de locos alozimas (Forrest *et al.* 2004).

Os valores dos índices de divergência calculados para *Masdevallia* apresentam consideráveis diferenças, uma vez que tanto G'_{ST} quanto G''_{ST} encontram-se baseados na heterozigosidade esperada, e D leva em conta o número de alelos efetivos (Meirmans & Hedrick 2011). Considerando isto e devido ao elevado número de alelos raros presentes na maioria das populações avaliadas, os valores de D poderiam refletir melhor a estruturação genética em *M. solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens*.

Considerando os valores do G''_{ST} de *M. solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens* (0.260, 0.251 e 0.119, respectivamente) para o cálculo da quantidade de fluxo gênico efetivo, observou-se que, tanto em *M. solomonii* ($N_{em} = 0,712$) quanto em *M. yungasensis* ($N_{em} = 0,746$) estes valores encontram-se entre os valores relatados por Morjan & Rieseberg (2004) para plantas autógamas ($N_{em} = 0,43 \pm 0,06$) e alógamas ($N_{em} = 1,38 \pm 0,31$); em *M. scandens* este valor foi maior ($N_{em} = 1,851$), porém ainda muito menor do que o N_{em} para plantas com sistemas reprodutivos mistos ($N_{em} = 2,99 \pm 0,57$). Segundo os critérios de Govindaraju (1989) estes valores denotam um elevado fluxo gênico entre as populações; no entanto, Kisel (2010) menciona que em *Masdevallia nidifica* (uma espécie amplamente distribuída) um $F_{ST} > 0,200$ indicaria ainda um fluxo gênico reduzido, porém suficiente para permitir a evolução independente das populações.

A divergência genética encontrada entre as populações de *M. scandens* corrobora com o padrão geral relatado em orquídeas epífitas, as quais parecem manter uma alta diversidade genética e baixa estrutura populacional (Ackerman & Ward 1999, Borba *et al.* 2001a, Tremblay & Ackerman 2001, Trapnell *et al.* 2004); fato que tem-se sugerido como uma vantagem adaptativa para viver em habitats descontínuos e mais instáveis (Trapnell *et al.* 2004, Ávila-Díaz & Oyama 2007).

Hibridação e introgressão

A clara delimitação de grupos genéticos correspondentes a *Masdevallia solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens* revela que os locos microssatélites utilizados encontram-se bem conservados nestas espécies. No entanto, a elevada frequência de indivíduos com ascendência mista nas populações simpátricas, e os valores correspondentes do *Hybrid index*, são indicativos de que processos de hibridação/introgressão entre *M. solomonii*, *M. yungasensis* têm acontecido. Esta afirmação é respaldada pela proximidade filogenética das espécies (ver Apêndice I), pela presença de alguns indivíduos de morfologia intermediária, pela sincronia das etapas fenológicas, e principalmente, pelo fato de estas compartilharem o mesmo polinizador (Moya, com. pess.). Isto pode ajudar a superar as barreiras pré-polinização (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1981, Gill 1989), uma vez que as barreiras genéticas que evitam a hibridação (pós-polinização) entre espécies próximas com frequência são frágeis ou ausentes em Orchidaceae (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler, 1981).

A hibridação como uma via que incrementa a variabilidade em espécies parentais através da introgressão (Klier *et al.* 1991) pode explicar os elevados níveis de diversidade alélica observados nas populações de *M. solomonii* e *M. yungasensis* que encontram-se em simpatria (MSO_Cho1 e MY_Cho1) em comparação com as populações “puras”. Neste sentido, revisando a grande quantidade de alelos exclusivos que foram encontradas nas populações simpátricas de *M. yungasensis* e *M. scandens*, verificou-se que nove dos 47 alelos de *M. yungasensis*, encontraram-se também presentes em *M. scandens* e em frequências semelhantes (> 0,05).

Deste fato pode-se inferir o fluxo gênico interespecífico bi-direcional de *M. yungasensis* para *M. solomonii*, e de *M. yungasensis* para *M. scandens*; sendo que, aparentemente *M. yungasensis* estaria atuando como uma ponte entre *M. solomonii* e *M. scandens*, uma vez que o período de floração dessa espécie se sobrepõe, em algum momento, ao das outras duas espécies. Embora, o grau de assimilação da introgressão pareça ser moderado entre *M. solomonii* e *M. yungasensis*, a presença de indivíduos com similaridade alélica > 75 % com a outra espécie, reflete a intensidade na qual este processo estaria acontecendo, sendo necessário considerar os possíveis riscos para a conservação da integridade genética das espécies (Wolf *et al.* 2001, Frankhman *et al.* 2002, Worley *et al.* 2009).

Por outro lado, a presença de indivíduos com ascendência híbrida que retiveram o fenótipo de alguma das espécies parentais, sugere que a hibridação entre *M. solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens*, permitiu a introgressão de alelos neutrais, sem afetar parte do genoma que define a identidade de cada espécie (Linder *et al.* 1998). Por se tratarem de espécies congêneres, que têm coexistido naturalmente durante muitas gerações, a hibridação poderia não representar uma ameaça e, pelo contrário, as zonas de simpatria poderiam se constituir em áreas importantes para os processos evolutivos de especiação híbrida (Cozzolino *et al.* 2006, Palma-Silva *et al.* 2011, Pinheiro *et al.* 2011).

Implicações para a conservação das espécies

A elevada diversidade observada tanto nas populações que ocorrem ao longo das trilhas pré-colombianas Chojllapata e Sillutinkara quanto aquela encontrada na localidade de Chuspipata, se contrasta com os diferentes graus de endogamia encontrados na maioria delas. Desta maneira, poder-se-iam enquadrar em três cenários diferentes para a conservação.

Por um lado, a Chojllapata, que percorre a parte alta das montanhas (1.300-3.400 m.s.n.m) é de difícil acesso, o que faz esta apresentar zonas pouco antropizadas e com vegetação bem preservada (Jiménez & Miranda 2007), fato que contribui para a manutenção dos habitats das espécies. É aí que se tem encontrado as maiores populações de *Masdevallia solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens* em simpatria, e sendo detectados processos hibridação/introgressão, o que faz desta, uma área de interesse científico, que deveria receber especial consideração para a conservação dos processos evolutivos das espécies.

Em contraste, a trilha do Sillutinkara, que atravessa principalmente zonas de floresta secundária (Jiménez & Miranda 2007), é transitada por pessoas das comunidades próximas e turistas. Isto tem produzido um grande impacto nas populações de *M. solomonii*, localizadas em ambos os lados da trilha (particularmente MSO_Si1), as quais sofreram severas reduções no número populacional, devido principalmente, aos trabalhos de manutenção desta via que incluíram o corte de ramos dos forófitos das espécies e, possivelmente também, à ação de colecionadores (obs. pess.). Esta seria a causa da perda dos indivíduos de *M. yungasensis* e *M. scandens* que, antigamente, encontravam-se também na população MSO_Si1.

Finalmente, as populações de *M. solomonii* e *M. scandens* do Chuspipata encontram-se entre as populações “puras” melhor conservadas destas espécies, apresentando elevada diversidade genética (com muitos alelos exclusivos). No entanto, por sua proximidade à estrada principal, estas populações poderiam ser as mais suscetíveis à extração e comercialização ilícita, fato que já tem sido relatado na região.

Neste contexto, e considerando a informação genética preliminar das espécies e populações avaliadas, poder-se-iam delinear algumas medidas para a conservação e manejo das populações *M. solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens* do PN-ANMI Cotapata. Caso se decida intervir na proteção de populações prioritárias e no manejo de cruzamentos, apresentamos algumas considerações:

Para o caso específico de *M. solomonii* poder-se-ia priorizar a proteção de MSO_Chu2, MSO_Si2 e MSO_Cho3, facilitando o fluxo gênico entre elas, isto permitiria reduzir os níveis de endogamia local. As populações simpátricas (atuais ou com evidências de antiga simpatria) devem receber um tratamento especial, de modo a permitir a continuidade dos processos evolutivos dentro delas. As duas populações "puras" de *M. yungasensis* (MY_Cho4 e MY_Cho5) poderiam ser consideradas especialmente nos planos de manejo e conservação, uma vez que o fluxo gênico unidirecional de MY Cho_4 a MY Cho_5, poderia diminuir e controlar a endogamia nesta última. No caso de *M. scandens*, também poderia ser recomendável realizar apenas trocas gênicas unidirecionais de MSC Chu_1 a MSC Cho_1.

Considerando as particularidades de cada uma das populações de *Masdevallia* avaliadas poderíamos categorizar elas (conforme Figura 6), como: a) Populações doadoras que apresentam os menores graus de endogamia e elevada diversidade alélica, entre as quais poderia ser recomendável realizar trocas genéticas intra-específicas; b) Populações possivelmente introgridas, que poderiam receber material genético proveniente das populações puras, porém não deveriam ser doadoras; c) populações pequenas que poderiam ser receptoras de material genético das populações doadoras, diminuindo assim a endogamia local; nestas deveria-se melhorar o recrutamento de plântulas; d) Populações hibridogênicas, nas quais só o fluxo gênico unidirecional proveniente de populações puras poderia-se permitir.

É importante ressaltar que as sugestões de manejo apresentadas aqui correspondem à informação preliminar das populações avaliadas, e que para uma possível aplicação futura precisam ser complementadas com informação da estrutura genética em fina escala dentro de cada população, além de um maior conhecimento da ecologia e demografia das espécies.

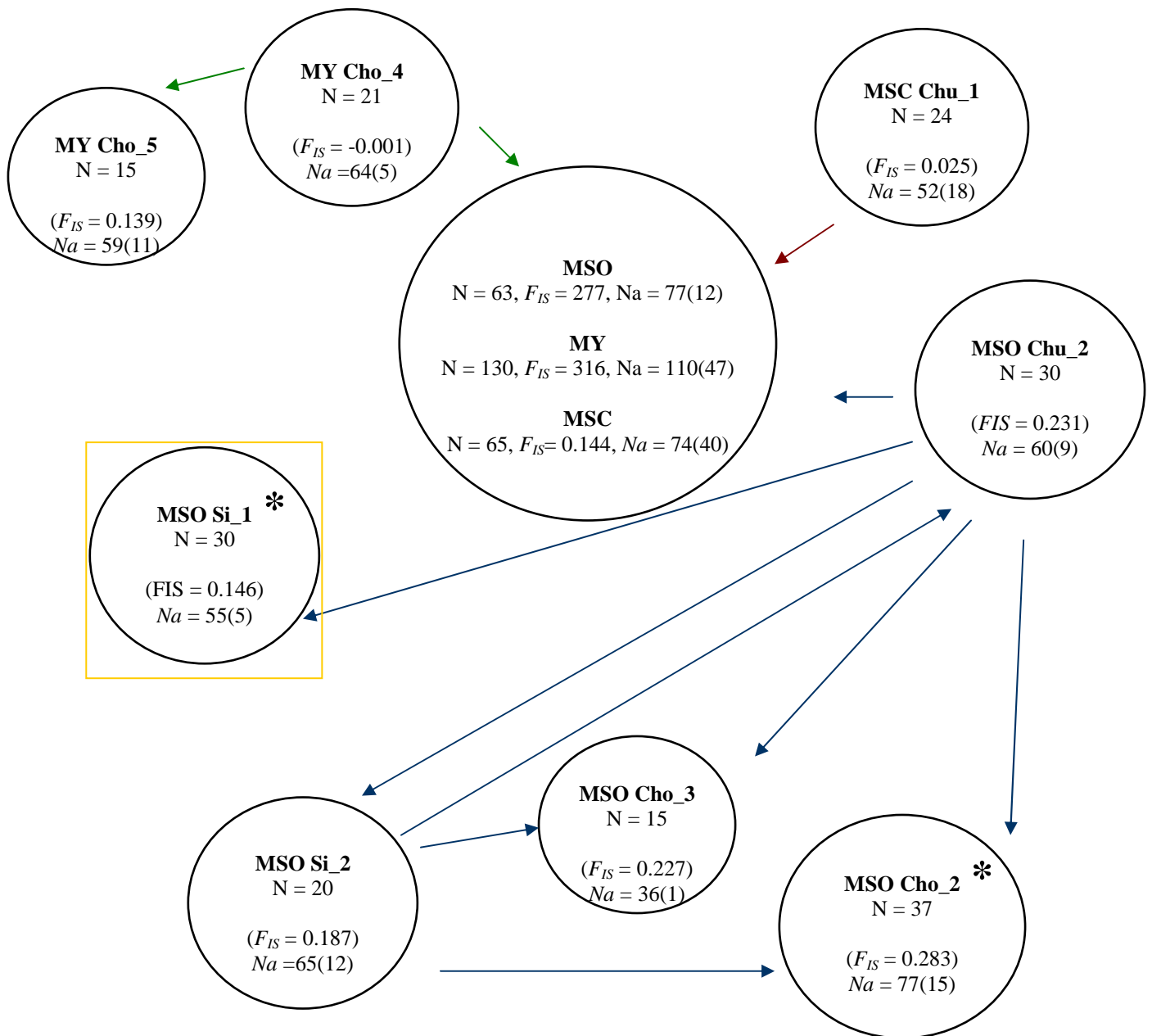


Figura 6: Fluxo gênico proposto para um possível cenário de manejo e conservação das populações de *Masdevallia scandens*, *M. solomonii* e *M. yungasensis*, baseado em dados demográficos e a informação genética das populações avaliadas no PN-ANMI Cotapata. * = populações com registros antigos de indivíduos de alguma das outras espécies em simpatria, N = tamanho populacional, F_{IS} = coeficiente de endogamia (F_{IS}), N_a = número de alelos, e entre parênteses o número de alelos exclusivos, quadro amarelo = população na qual se requer re-alocar indivíduos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman JD (1998) Evolutionary potential in orchids: patterns and strategies for conservation. *Selb* 19: 8-14.
- Ackerman JD, Ward S (1999) Genetic variation in a widespread, epiphytic orchid: where is the evolutionary potential? *Syst Bot* 24:282-291.
- Alcântara S, Semir J, Solferini V (2006) Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic rainforest of South-eastern Brazil. *Ann Bot* 98: 1207-1213.
- Araujo N, Ibisch P (2000) Hacia un plan de Conservación para el Bio-Corredor Amboró-Madidi, Bolivia. *FAN*, Santa Cruz, Bolivia. (CD-ROM; ISBN 99905-801-7-0).
- Ávila-Díaz I, Oyama K (2007) Conservations genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Amer J Bot* 94: 184-193.
- Azevedo CO, Borba EL, van den Berg C (2006) Evidence of natural hybridization and introgression in *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir, F. Barros and *B. weddellii* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil, by using allozyme markers. *Rev Bras Bot* 29: 415-421.
- Borba EL, Semir J (2001) Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* species: A multiple population approach. *Ann Bot* 88: 75-88.
- Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J (2001a) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Amer J Bot* 88: 419-428.
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ (2001b) Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Ann Bot* 88: 89-99.
- Borba EL, Barbosa AR, Cabral de Melo M, Loureiro SG, Oliveira, HO (2009) Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): Evolutionary and systematic implications. Em *Memórias da Conferencia Internacional de Orquídeas dos Andes*. Quito Equador. pp. 51-56.

- Bowen BW (1999) Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Mol Ecol* 8:S5 – S10.
- Buerkle CA (2005). Maximum-likelihood estimation of a hybrid index based on molecular markers. *Mol Ecol Notes* 5: 684-687.
- Campbell VV, Rowe G, Beebee TJ, Hutchings MJ (2002) Isolation and characterization of microsatellite primers for the Fragrant Orchid *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Brown (Orchidaceae). *Conserv Gen* 3: 209-210.
- Ceska JF, Affolter JM, Hamrick JL (1997) Developing a sampling strategy for *Baptisia arachnifera* based on allozyme diversity. *Conserv Biol* 11:1133-1139.
- Cortés-Palomec AC, Mccauley RA, Oyama K (2008) Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Mol Ecol Resource* 8:135-138.
- Cozzolino S, Nardella AM, Impagliazzo S, Widmer, Lexer C (2006) Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: Should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biol Conserv* 129:14-23.
- Cribb PJ, Kell SP, Dixon KW, Barrett RL (2003) Orchid conservation: a global perspective. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (Eds) Orchid conservation. Natural History Publications, Kotakinabalu, Sabah, pp. 1-24.
- Cruz TD (2007) Variabilidade genética e morfológica em populações de *Cattleya Elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae) na Chapada Diamantina, Bahia. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Botânica Universidade Estadual de Feira de Santana. 2007. 67p.
- Dressler RL (1981) The orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge 332p.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Earl DA (2011) Structure Harvester v0.6.7. <http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/structureHarvester/>. Accessed 17 May 2011.
- Evano G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611-2620.

- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genet* 31: 479-491.
- Flanagan NS, Ebert D, Porter C, Rossetto M, Peakall R (2006). Microsatellite markers for evolutionary studies in the sexually deceptive orchid genus *Chiloglottis*. *Mol Ecol Notes* 6: 123-126.
- Forrest AD, Hollingsworth ML, Hollingsworth PM, Sydes C, Bateman RM (2004) Population genetic structure in European populations of *Spiranthes romanzoffiana* set in the context of other genetic studies on orchids. *Hered* 92: 218-227.
- Frankham R, Ballou J, Briscoe D (2002) Introduction to conservation genetics. 3rd edn. Cambridge University Press, United Kingdom. 219p.
- Gentry AH, Dodson CH (1987) Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Ann Miss Bot Gar* 74: 205-233.
- Gill DE (1989) Fruiting failure, pollination inefficiency, and speciation in orchids. In Otte D & Endler JA (Eds). *Speciation and its consequences*. Academy of Natural Sciences Publications, Philadelphia, PA, pp. 458-481.
- Govindajuru RD (1989) Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. *J Evol Biol* 2: 173-181.
- Hamrick JL, Godt MJ (1989) Allozyme diversity in plant species. In Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds) *Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources*. Sinauer, Sunderland, Mass. pp. 43-63.
- Hanagarth W, Arce JP (1986) Los parques nacionales y reservas de vida silvestre en el Departamento de La Paz - Su situación en el marco de una planificación regional. *Ecol Bol* 9: 1-67.
- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evol* 59: 1633-1638.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Res* 9: 1322-1332.
- IUCN (1997) Red list of threatened plants. In: Walter KS & Gillett HJ (Eds.) Switzerland: IUCN, Gland, 862p.

- Jiménez I, Miranda F (2007) Epiphyte orchid diversity in a Yungas montane forest in the Cotapata National Park and Integrated Management Natural Area, La Paz – Bolivia. *Lankest* 7: 49-52.
- Johansson D (1974) Ecology of vascular epiphytes in West African rain forest. *Acta Phytogeogr. Suec* 59: 1-129.
- Jost L (2008) GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol Ecol* 17: 4015-4026.
- Kisel Y (2010) The spatial scale of speciation and patterns of diversity. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. University of London, 2010. 209p.
- Klier KM, Leoschke J, Wendel JF (1991) Hybridization and introgression in white and yellow ladyslipper orchids. (*Cypripedium candidum* and *C. pubescens*). *J Hered* 82: 305-318
- Krömer T, Gradstein R, Acebey A (2007) Diversidad y ecología de epífitas vasculares en bosques montanos primarios y secundarios de Bolivia. *Ecol Boliv* 42: 23-33.
- Levene H (1949) On a matching problem arising in genetics. *Ann Math Stat* 20: 91-94.
- Linder CR, Taha I, Seiler GJ, Snow AA, Rieseberg LH (1998) Long-term introgression of crop genes into wild sunflower populations. *Theor Appl Genet* 96: 339-347.
- Meneses R. & Beck S (2005). *Especies Amenazadas de la Flora de Bolivia*. Bolivia, La Paz: Herbario Nacional de Bolivia. 34 p.
- Meirmans PG, Hedrick PW (2011) Assessing population structure: FST and related measures. *Mol Ecol Resour* 11: 5-18.
- Meirmans PG, Van Tienderen PH (2004) Genotype and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol Ecol Notes* 4:792-794.
- Morjan CL, Rieseberg LH (2004) How species evolve collectively: implications of gene flow and selection for the spread of advantageous alleles. *Mol Ecol* 13: 1341-1356.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genet* 89: 583-590.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press. 512 p.

- Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants, *Perspect Pl Ecol, Evol and Syst* 3: 93-114.
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-358.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F (2011) Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Mol Ecol* 20: 3185-3201.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GenAEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- Pinheiro F, de Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, 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*. doi: 10.1111/j.1365-2699.2011.02539.x
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* 90: 502-503.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genet* 155: 945-959.
- Ribeiro PL, Borba EL, Camargo SE, Lambert, SM, Schnadelbach, AS, & Berg C (2008) Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Pl Syst and Evol* 270: 109-137.
- Roberts DL, Dixon KW (2008) Orchids, *Current Biology* 18 (8): 325 -329.
- Saitou N, Nei M (1987) The *neighbor-joining* method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evol* 4: 406-425.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18: 233-234.
- Sun M, Wong KC (2001) Genetic structure of three orchid species with contrasting mating systems using RAPD and allozyme markers. *Am J Bot* 88: 2180-2188.

- Swarts ND, Sinclair EA, Dixon K (2007) Characterization of microsatellite loci in the endangered grand spider orchid *Caladenia huegelii* (Orchidaceae). *Mol Ecol Resources* 7:1141-1143.
- Templeton AR (1981) Mechanisms of speciation – a population genetic approach. *Ann Rev Ecol and Syst*, 12: 23-48.
- Tremblay RL, Ackerman JD (2001) Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biol J Lin Soc* 2001: 72:47-62.
- Trapnell D, Hamrick JL, Nason JD (2004) Three-dimensional fine-scale genetic structure of the neotropical epiphytic orchid *Laelia rubescens*. *Mol Ecol* 13: 1111-1118.
- van der Pijl L, Dodson CH (1966) Orchid flowers. Their pollination and evolution. Coral Gables: University of Miami Press. pp. 101-122.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, & Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Res* 4: 535-538.
- Vásquez R, Ibisch P (2000) Orquídeas de Bolivia: Subtribu Pleurothallidinae. v. 1. Bolivia: Santa Cruz, FAN. 649p.
- Wallace LE (2002) Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozymes and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Species Biol* 17: 37-49.
- Wolf DE, Takebayashi N, Rieseberg LH (2001) Predicting the risk of extinction through hybridization. *Consev Biol* 15:1039-1053.
- Wong KC, Sun M (1999) Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *Amer J Bot* 86: 1406 - 1413.
- Worley C, Sawich L, Ghazvini H, Ford BA (2009) Hybridization and introgression between a rare and a common lady's slipper orchid, *Cypripedium candidum* and *C. parviflorum* (Orchidaceae). *Botany* 86:1054-1065
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Wright S (1978). Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. v. 4. Chicago: University of Chicago Press. 580 p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O elevado sucesso na transferabilidade dos marcadores microssatélite desenhados para *Masdevallia solomonii*, permitiu avaliar a diversidade e estrutura genética de *M. yungasensis* e *M. scandens*, demonstrando assim a possibilidade para que estes forem usados em outras espécies do mesmo gênero, prioritariamente em espécies endêmicas e ameaçadas que se encontram em estado crítico de conservação.

Considerando que os marcadores microssatélite desenvolvidos para *Masdevallia* constituem-se nos primeiros dentro da subtribo, a avaliação do potencial de transferabilidade em outros gêneros dentro de Pleurothallidinae, possibilitaria a realização de estudos de genética para a conservação, reduzindo o investimento no desenvolvimento de novos *primers*.

A informação de 10 locos de microssatélites mostrou que as populações de *Masdevallia solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens*, presentes no PN-ANMI Cotapata, apresentaram uma elevada variabilidade genética distribuída heterogeneamente entre as populações; a maioria das quais contem alelos exclusivos; constituindo-se assim em importantes reservatórios de diversidade para estas espécies.

A elevada estruturação genética observada em *M. solomonii* e *M. yungasensis* comparada com *M. scandens* denota a necessidade para a conservação de todas as populações, priorizando, no entanto, a proteção daquelas que se mantêm em estado puro, e que apresentam os maiores índices de diversidade, como uma fonte de variação que poderia ser introduzida em outras populações para diminuir a endogamia local.

Os planos de conservação e manejo de *Masdevallia solomonii*, *M. yungasensis* e *M. scandens*, devem considerar a presença de indivíduos com ascendência híbrida dentro das populações simpátricas das três espécies, preservando a integridade genética dos indivíduos que se encontram nas populações puras.

APÊNDICE 1

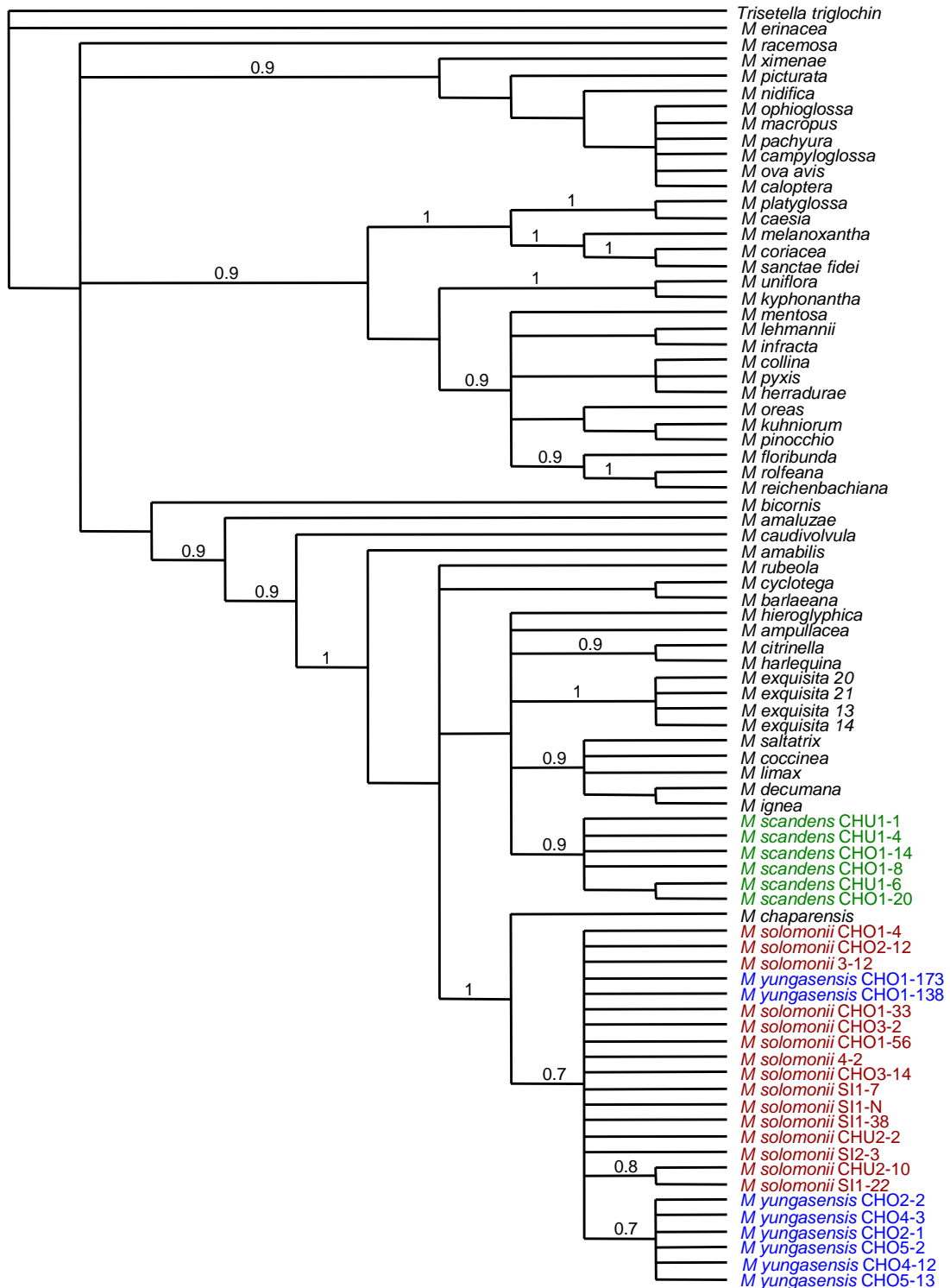


Figura 1: Árvore de consenso baseada na análise Bayesiana das sequências de ITS de *Masdevallia solomonii*, *M. scandens* e *M. yungasensis*. Números acima dos ramos representam a probabilidade posterior (PP).

APÊNDICE 2

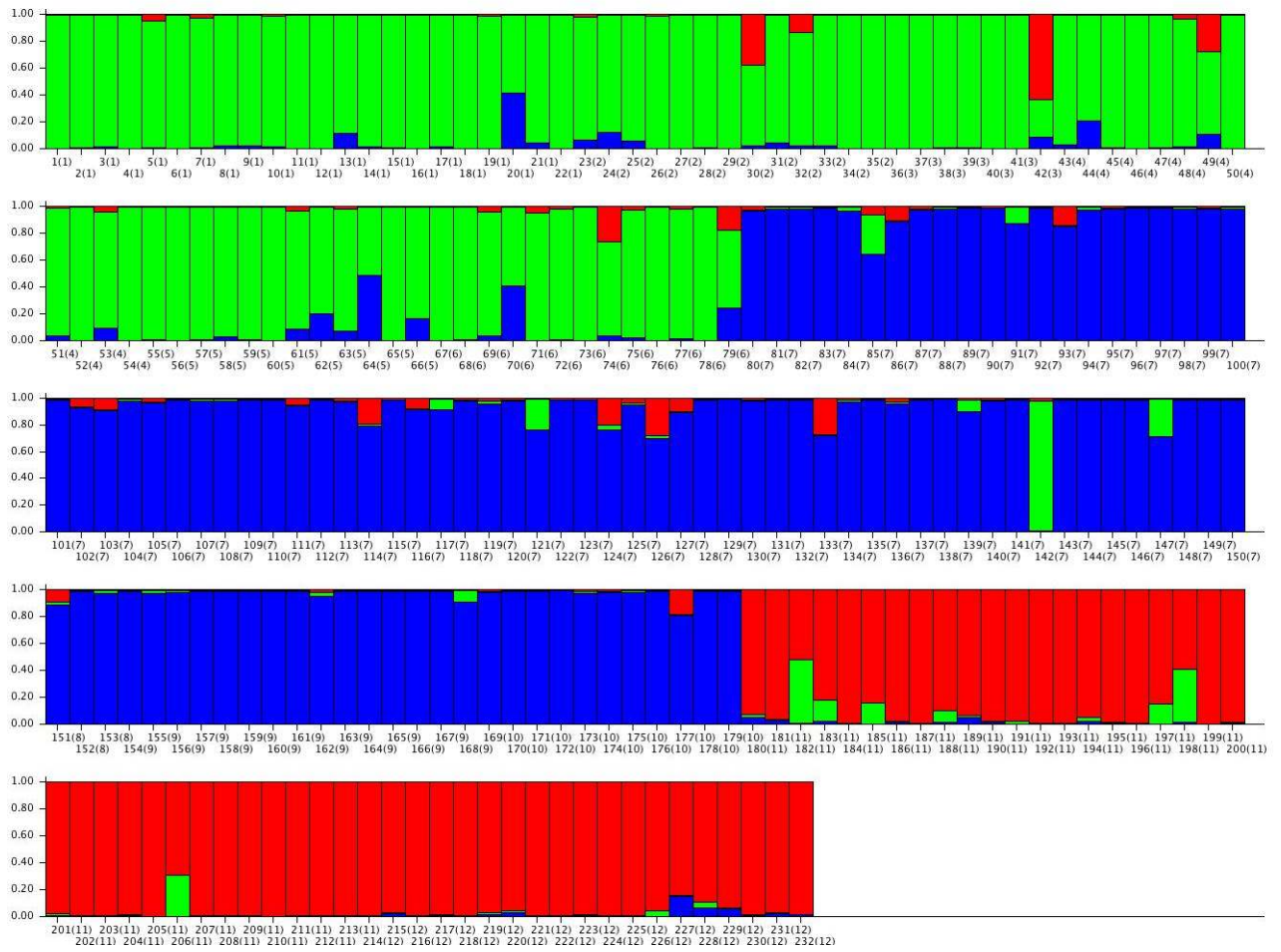


Figura 2: Representação gráfica dos indivíduos correspondente a diferentes agrupamentos genéticos para $K = 3$ gerados através da análise Bayesiana no STRUCTURE, baseado em 10 locos microssatélites. 1 - 78 *Masdevallia solomonii*, 79 -179 *M. yungasensis*, e 180 - 232 *M. scandens*, ocorrentes no PN-ANMI Cotapata.