



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



**Marcadores microssatélites e estrutura genética de  
*Coccoloba cereifera*, espécie microendêmica e ameaçada  
da Serra do Cipó, MG, Brasil.**



**RENNAN GARCIAS MOREIRA**

BELO HORIZONTE  
Fevereiro - 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**RENNAN GARCIAS MOREIRA**

**Marcadores microssatélites e estrutura genética de  
*Coccoloba cereifera*, espécie microendêmica e ameaçada  
da Serra do Cipó, MG, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em genética.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Wilson  
Fernandes

Co-Orientador: Prof. Dr. Alberto Ken  
Oyama Nakagawa

BELO HORIZONTE  
Fevereiro - 2009

043  
M835m

Moreira, Rennan Garcias.

Marcadores microssatélites e estrutura genética de *Coccoloba cereifera*, espécie microendêmica e ameaçada da Serra do Cipó, MG, Brasil.  
[manuscrito] / Rennan Garcias Moreira.

53 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Geraldo Wilson Fernandes. Co-orientador: Alberto Ken Oyama Nakagawa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Microssatélites (Genética) - Teses. 2. *Coccoloba cereifera* - Teses. 3. Extinção (Biologia) - Teses. 4. Poligonáceas - Cipó, Serra do - Teses. 5. Genética vegetal - Teses. I. Fernandes, Geraldo Wilson. II. Nakagawa, Alberto Ken Oyama. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581.15

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por permitir que ao meu lado existam pessoas maravilhosas, que me fazem entender porque temos que aproveitar ao máximo cada segundo da vida!

Agradeço aos meus pais pelos ensinamentos e pelo acolhimento. Eles são os verdadeiros responsáveis por tudo o que tenho na vida e por tudo o que sou. Obrigado por estarem ao meu lado em todos os momentos e principalmente pelos exemplos de vida.

Às minhas irmãs, Thaís e Aline, agradeço pelo companheirismo, carinho, amor, cumplicidade. Agradeço por serem as melhores irmãs do mundo!!

Ao grande presente que Deus me deu, minha linda, Luciana. Agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos, por ser muito mais do que uma espetacular ajudante nas coletas e no laboratório. Agradeço por dividir os momentos de nervosismo, as dúvidas, por me motivar e me proporcionar dias felizes, maravilhosos, mais do que especiais. Gostaria também agradecer aos pais da Lu (em especial à memória de sua mãe), aos seus irmãos e familiares.

Agradeço aos meus familiares pelo apoio, pelas palavras de incentivo e de carinho. Agradeço aos meus avós que já não estão entre nós, pelos exemplos deixados e pelas eternas lembranças. Agradeço às minhas tias avós principalmente pela espiritualidade e fé. Tios, tias, primos e primas, sou grato pelos momentos de descontração e de apoio.

Agradeço imensamente aos grandes amigos Ross e Áurea. Jamais me esquecerei dos ensinamentos, dos intensos dias de trabalho, dos dias de descontração e também das várias viagens e passeios maravilhosos!

Sou muito grato aos meus amigos e amigas. Em especial aos meus amigos de longa data, aos amigos do curso de Ciências Biológicas. Agradeço imensamente ao pessoal do LEEB e do Lab GENEPOP pelos auxílios e sugestões durante todos estes anos.

Agradeço ao meu mestre e amigo Geraldinho. Sou grato por sempre acreditar em mim, apostar no meu potencial, abrir tantas portas.

Agradeço ao professor Ken Oyama por me receber tão bem em seu laboratório e pelo suporte e apoio imprescindíveis!

Agradeço à professora e amiga Maria Bernadete pelos momentos de aprendizado, pelas oportunidades de projetos no laboratório, pelas várias conversas que tanto me esclareceram dúvidas.

Agradeço à professora e amiga Rosane Collevatti pelo maravilhoso acolhimento durante o estágio em Brasília, pelas valiosas “aulas particulares” e várias sugestões.

Enfim, sou grato a todos que estiveram ao meu lado durante estes anos, àqueles que de uma forma ou de outra fizeram parte destes momentos tão importantes, momentos marcantes e eternos!! Obrigado!!

## ÍNDICE

Lista de figuras .....	I
Lista de tabelas .....	I
Lista de abreviaturas .....	I
Resumo .....	2
Abstract .....	3
Introdução .....	4
<i>Objetivos</i> .....	10
Capítulos	
<i>Cap. 1 - Artigo: "Isolation and characterization of microsatellite loci in Coccoloba cereifera (Polygonaceae), an endangered species endemic to the Serra do Cipó, Brazil."</i> .....	11
- <i>Abstract</i> .....	12
- <i>References</i> .....	16
- <i>Table 1</i> .....	18
<i>Cap. 2 - Artigo: "Spatial genetic structure of Coccoloba cereifera (Polygonaceae), a critically endangered microendemic species of Brazilian rupestrian fields."</i> .....	19
- <i>Abstract</i> .....	20
- <i>Introduction</i> .....	21
- <i>Materials and Methods</i> .....	23
- <i>Results</i> .....	25
- <i>Discussion</i> .....	26
- <i>References</i> .....	30
- <i>Figures and Tables</i> .....	36
Considerações Finais .....	43
Referências Bibliográficas .....	45
Anexo I .....	53

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

- *Figura 1.* Mapa da distribuição de *C. cereifera* com a localidade dos grupos amostrados
- *Figura 2.* Avaliação dos resultados das análises Bayesianas para a determinação do número de populações de *C. cereifera*
- *Figura 3.* Representação da fração de cada indivíduo correspondente aos agrupamentos inferidos
- *Figura 4.* Relação entre as comparações de  $R_{ST}$  par a par e a distância geográfica entre os grupos amostrados

### Anexo I

- *Figura 1.* Indivíduo de *Coccoloba cereifera*
- *Figura 2.* Inflorescência de *C. cereifera*
- *Figura 3.* Indivíduos de *C. cereifera*

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

- *Tabela 1.* Caracterização dos 13 *primers* construídos para regiões de microssatélites de *C. cereifera*.

### Capítulo 2

- *Tabela 1.* Estrutura genética populacional e características dos 13 locos microssatélites de 139 indivíduos de *C. cereifera*.
- *Tabela 2.* Características de nove agrupamentos de indivíduos de *C. cereifera* baseado em 13 locos microssatélites.
- *Tabela 3.*  $R_{ST}$  par a par (diagonal superior) e distância geográfica (metros, diagonal inferior) entre os agrupamentos de *C. cereifera*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

**DNA** - Ácido desoxirribonucléico

**PCR** - Reação em cadeia da Polimerase

**km<sup>2</sup>** - Quilômetro quadrado

## RESUMO

O surgimento de novas tecnologias permitiu a realização de estudos sólidos no campo da genética da conservação e fortaleceu os diagnósticos do *status* genético de espécies ameaçadas. Devido a características peculiares no âmbito ecológico, evolutivo e por ocorrer em uma área extremamente restrita, *Coccoloba cereifera* é uma espécie que pode ser tomada como modelo para estudos futuros que centram na integração de dados genéticos e ecológicos. Neste estudo, isolamos e caracterizamos marcadores microsatélites para *Coccoloba cereifera* e posteriormente os utilizamos para avaliar o *status* genético da espécie. Procurou-se gerar dados genéticos que auxiliassem na elaboração de estratégias de manejo e conservação da espécie.

Com o uso da técnica de captura de fragmentos por sondas de hibridização foi construída uma biblioteca enriquecida com regiões microsatélites. Após o processo de caracterização dos marcadores obtidos, foram selecionados 13 locos microsatélites de diferentes motivos de repetição para os estudos posteriores. Esses marcadores foram utilizados para genotipar 139 indivíduos distribuídos em nove agrupamentos por toda a área de ocorrência de *C. cereifera*. O número de alelos por loco variou de dois a dez e as heterozigosidades esperada e observada nos grupos foram de 0,324 a 0,566 e 0,337 a 0,529, respectivamente. Os locos microsatélites detectaram níveis moderados e significativos de diferenciação entre os grupos ( $F_{ST}=0,123$ ,  $R_{ST}=0,105$ ). Testes de Mantel realizados entre os agrupamentos revelaram padrões fracos, mas significativos de isolamento por distância ( $r^2=0,31$ ;  $P<0,002$ ). Análises bayesianas indicaram a existência de duas subdivisões principais conectadas por grupos mais ou menos mistos. A heterogeneidade do habitat ao longo da bacia do Ribeirão Indequicé provavelmente está limitando o fluxo gênico entre os grupos da população geograficamente restrita.

Apesar de não existir uma evidência clara de um risco genético imediato à sobrevivência da espécie, a aparente segregação natural na distribuição da espécie pode ser agravada por futuras ações humanas e pelo influxo de espécies exóticas na região. Esses fatores podem levar a reduções demográficas e no tamanho populacional que causariam uma diminuição da diversidade genética da espécie e um aumento na subdivisão populacional. Portanto, sugere-se que seja mantida a integridade do habitat dentro da pequena distribuição geográfica de *C. cereifera* e que sejam monitorados os efeitos do estabelecimento de espécies invasoras na região.

Palavras chave: Campos Rupestres, Microsatélites, Raridade, Endemismo, Trioicia



## ABSTRACT

The emergence of new technologies enabled the achievement of solid studies in the field of conservation genetics and strengthened the diagnosis of genetic status of endangered species. Because of peculiar ecological and evolutionary characteristics and its narrowly distribution, *Coccoloba cereifera* is an appropriate model species for studies aiming to integrate genetic and ecological data. In this study microsatellite markers for *Coccoloba cereifera* were isolated, characterized and used in a more specific work to assess the species genetic status. Our primary aim in completing this study was the collection of genetic information important toward the generation of a management plan for species conservation. A library enriched with microsatellite regions was built using the hybridization capture technique. The markers obtained were characterized and, subsequently, 13 microsatellite loci of different motif reasons were selected for further studies. These markers were used to genotype 139 individuals from nine groups throughout the area of *C. cereifera* occurrence. The number of alleles per locus ranged from two to ten and the expected and observed heterozygosities within groups varied from 0.324 to 0.566 and 0.337 to 0.529, respectively. The microsatellite loci detected low, but significant, levels of difference among groups ( $F_{ST} = 0.123$ ,  $R_{ST} = 0.105$ ). Mantel tests conducted among groups revealed weak, but significant patterns of isolation by distance ( $r^2 = 0.31$ ,  $P < 0.002$ ). Bayesian clustering indicated two subdivisions connected via admixture. Habitat heterogeneity across the drainage basin of the Rio Indequicé is likely limiting gene flow within patches of the geographically restricted population.

While there is currently no evidence for a direct genetic risk to species survival, the apparent natural segregation occurring within the species could be exacerbated by future land use changes and the influx of alien species which could lead to demographic reductions in population size leading to a reduction in genetic diversity and an increase in population subdivision. We suggest that maintaining the integrity of the habitat within the small range of the species and continued monitoring of the effects of alien species would be the wisest use of management resources.

Key Words: Rupestrian fields, Microsatellite, Rare, Endemism, Trioecy

## INTRODUÇÃO

As questões ecológicas e ambientais já não são interesses exclusivos de pesquisadores e estudiosos da área das ciências da vida. Atualmente, a degradação ambiental é um assunto intensamente debatido em vários setores da sociedade por profissionais de diferentes campos. As conseqüências das atividades antrópicas no meio ambiente são causas de vários desequilíbrios naturais que afetam o ser humano de forma direta e indireta. Porém, quando se leva em conta a grande biodiversidade do planeta, ainda é pouco o que vem sendo discutido sobre os impactos das atividades humanas na sobrevivência de outras espécies de seres vivos.

A Biologia da Conservação possui um papel decisivo na preservação e manutenção das espécies que ainda restam nos ecossistemas. Uma das áreas mais importantes desse campo é a Genética da Conservação, que tem como objetivos principais detectar os fatores genéticos que afetam a extinção de populações e espécies; proporcionar informações para o manejo genético de pequenas populações possibilitando a diminuição dos riscos de extinção; resolver problemas de ordem taxonômica; utilizar análises genéticas moleculares em estudos forenses; definir unidades de manejo e compreender melhor a biologia das espécies (Frankham et al. 2002; 2005). Várias ferramentas de análise genética surgiram nos últimos anos, o que possibilitou a aplicação da genética na biologia da conservação e facilitou o alcance dos objetivos descritos para a conservação das espécies.

A relação dos fatores genéticos com a extinção das espécies foi por muito tempo questionada. Porém, vários estudos já comprovaram a influência desses fatores nas possibilidades de sobrevivência e manutenção das espécies (Spielman et al. 2004; Frankham 2005; Goombridge 2007). As espécies ameaçadas que possuem populações em declínio normalmente apresentam populações naturalmente reduzidas. O tamanho reduzido aumenta a susceptibilidade destas espécies à perda de diversidade, principalmente pelos efeitos negativos da deriva genética e da endogamia. Populações com poucos indivíduos ficam sujeitas aos processos estocásticos que podem vir a fixar alelos apenas devido ao acaso, sem refletir as pressões seletivas da seleção natural. Por sua vez, a endogamia pode diminuir a eficiência dos indivíduos em responder adequadamente às alterações ambientais, já que suas conseqüências negativas, conhecidas como depressão endogâmica, levam à diminuição do valor adaptativo (Gilpin & Soulé 1986; Frankham 1995). Estudos tanto em animais quanto em plantas já demonstraram os efeitos negativos da endogamia na produção de esperma, fecundidade, sobrevivência da prole e dos adultos, idade da maturidade sexual e capacidade de cruzamento (Reed et al. 2002; Asa et al. 2007; Nielsen et al. 2007).

Uma das ferramentas moleculares mais utilizadas em estudos de genética de populações são os microssatélites, que também são conhecidos como “*simple sequence repeats*” (SSRs) ou “*simple tandem repeats*” (STRs). São regiões do DNA repetidas “*in tandem*” que contém seqüências curtas de nucleotídeos compostas de no máximo seis pares de bases. Cada grupo de bases que constitui uma unidade de repetição caracteriza o microssatélite como sendo mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ou hexanucleotídeo. Estudos indicam que mono-, di- e trinucleotídeos são mais freqüentes nas seqüências dos seres vivos, variando de acordo com o grupo do organismo. Sabe-se que nos vegetais o dinucleotídeo AT/TA e o trinucleotídeo TAT são mais comuns (Morgante & Olivieri 1993). Os microssatélites são classificados de acordo com o tipo da seqüência de repetição como sendo perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos (Weber 1990). São encontrados em abundância tanto nas regiões codificadoras quanto não-codificadoras do genoma dos procariotos e eucariotos (Tautz et al. 1986; Tóth et al. 2000). Não obstante, acredita-se que em alguns casos os microssatélites possuem funções importantes nos processos de regulação gênica e de recombinação (Jeffreys et al 1998; Kashi and Soller 1999).

Os marcadores microssatélites possuem propriedades variadas que os tornam de importância ímpar em estudos evolutivos, de mapeamento genômico e de genética de populações. Em geral, os locos microssatélites são altamente polimórficos nas populações naturais, com uma média de heterozigosidade esperada acima dos 70%, atingindo virtualmente 100% (Morgante & Olivieri 1993; Depeiges 1995). Essas regiões possuem uma taxa de mutação muito maior do que a das outras partes do genoma, sendo da ordem de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  nucleotídeos por loco por geração; o que significa uma magnitude de duas a três ordens maior do que as conhecidas para as aloenzimas (Jarne & Lagoda 1996). Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar essa alta taxa de mutação, como por exemplo os eventos de deslizamento da polimerase durante a replicação ou reparo do DNA (Tachida 1992; Strand et al. 1993). Outra propriedade muito útil dos marcadores microssatélites é a sua característica co-dominante, que possibilita a diferenciação entre indivíduos homocigotos e heterocigotos. Aliado a todos esses fatores destaca-se também a relativa homogeneidade de distribuição dos microssatélites ao longo do genoma. De forma geral, acredita-se que uma região de microssatélite é encontrada a cada 10 kb de um genoma de eucarioto (Tautz 1986), sendo que mais especificamente para as espécies vegetais essas seqüências repetidas são encontradas a cada 50 kb (Morgante & Olivieri 1993). Finalmente, outra vantagem que acompanha os microssatélites é a facilidade de detecção dessas regiões através da reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo necessária pouca quantidade inicial de DNA para a realização das reações (Powell et al. 1996).

Como todo marcador genético utilizado, os microssatélites possuem certas desvantagens, muitas delas relacionadas a erros de genotipagem. Uma das falhas mais

citadas é conhecida como “*stutter*”. Este erro ocorre quando há a formação de uma alça devido à interação entre os pares de base de uma mesma fita de um microssatélite. Essa alça impede a correta amplificação do fragmento, pois a DNA polimerase, nesse caso, sintetiza uma fita com menor tamanho do que a original (Litt et al. 1993; Hauge & Litt 1993). Sendo assim, o processo de genotipagem fica comprometido. Os alelos nulos também trazem prejuízos aos processos de genotipagem. Eles se caracterizam pela ocorrência de inserções, deleções ou alterações de pares de bases que impossibilitam o iniciador de se anelar à região flanqueadora do microssatélite. Este processo impede a amplificação do fragmento e, conseqüentemente, a correta genotipagem do indivíduo (Callen et al. 1993; Pemberton et al. 1995). Outros tipos de erros de genotipagem podem ocorrer devido a certas características já bastante conhecidas das reações de PCR. O erro conhecido como “*dropout*” ocorre principalmente quando há pequena quantidade de DNA genômico na reação. Como a DNA polimerase amplifica de forma preferencial fragmentos menores, há um aumento da proporção desses fragmentos prejudicando a detecção de alelos de maior tamanho durante a genotipagem (Wattier et al. 1998). Outra falha que prejudica a genotipagem ocorre devido à tendência da DNA polimerase de acrescentar uma base de adenina na terminação 3' do produto de amplificação (Hu 1993; Smith et al. 1995; Clarck 1998). Embora possam existir vários erros nos processos de genotipagem, muitos *softwares* e metodologias já são capazes de inferir a existência desses erros auxiliando na detecção e correção dos genótipos (Chakraborty et al. 1992; Sobel et al. 2002; Oosterhout et al. 2004).

Os marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados em estudos com espécies vegetais. Luikart & England (1999) destacam a boa precisão dos marcadores microssatélites nas análises de parentesco, dispersão, migração, endogamia e tamanho efetivo da população. Devido a sua natureza co-dominante, os microssatélites podem ser utilizados para determinar a contribuição de cada tipo parental em híbridos sexuais ou somáticos. Essa propriedade dos microssatélites viabiliza estudos de paternidade fornecendo informações sobre os padrões de dispersão de espécies (veja Streiff et al. 1999). Em decorrência do alto grau de heterozigosidade esses marcadores podem também representar ferramentas fundamentais na realização de estudos que avaliam o impacto da depressão endogâmica em plantas (Galeuchet et al. 2005). Além de todas essas aplicabilidades, os microssatélites têm destaque nas análises de tamanho efetivo populacional, pois sua alta taxa de mutação pode ser estimada com base nas mutações observadas (Thuillet 2005). Essas propriedades tornam os microssatélites uma ferramenta poderosa e eficaz na geração de dados que auxiliam no desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação para espécies ameaçadas. Além disso, muitas questões ecológicas e evolutivas podem ser melhor abordadas e mais facilmente respondidas com o uso dessa ferramenta genética.

Muitos marcadores microssatélites já foram isolados e caracterizados para espécies de plantas que ocorrem no território brasileiro, dentre essas espécies destacam-se *Caryocar brasiliensis* (Collevatti, 2001), *Copaifera langsdorffii* (Ciampi, et al, 2000), *Hymenaea courbaril* e *H. stigonocarpa* (Ciampi et al 2008), *Dalbergia nigra* (Ribeiro et al 2008a), sendo que muitas delas possuem importância conservacionista. A necessidade de estudos genéticos com espécies brasileiras ameaçadas se justifica pela crescente degradação ambiental e pela importância que dados genéticos possuem no auxílio à elaboração de melhores estratégias de manejo e conservação. A diversidade biológica brasileira é única dentre as nações do planeta, e por isso a preservação dos biomas brasileiros é de grande relevância.

Segundo critérios de diversidade, endemismo e destruição, os biomas brasileiros Mata Atlântica e Cerrado foram considerados como “hotspots” para conservação da biodiversidade (Myers et al. 2000). O Bioma Mata Atlântica não possui mais do que 8% de remanescentes (Morellato & Haddad 2000), sendo a maior parte deles mantidos em áreas de reservas. Com relação ao Cerrado, no ano de 2004 a taxa de destruição desse bioma era estimada em 22.000 a 30.000 km<sup>2</sup> por ano e a área de cobertura original restante era de apenas 45 % (Machado et al. 2004). Infelizmente, a perda de espécies nesses ambientes é inestimável, já que pouco se conhecia sobre a biodiversidade original desses biomas.

É nesse sentido que o Cerrado se destaca como uma das áreas mais importantes para a conservação da biodiversidade mundial. Estima-se que existam aproximadamente 10000 espécies de plantas nesse bioma das quais 4400 seriam endêmicas, muitas em perigo de extinção (Ratter et al. 1997; Myers et al. 2000). Dentre as várias fisionomias do Cerrado, o campo rupestre possui uma importância particular devido ao alto grau de endemismo e biodiversidade (Giulietti et al. 1997). Suas comunidades de plantas esclerófilas ficam expostas a condições severas, como exposição prolongada ao sol, fortes ventos, incêndios constantes, amplas variações térmicas durante o dia (e.q., Ribeiro & Fernandes 2000; Jacobi et al. 2007) e um forte déficit de água durante os cinco meses do inverno (Madeira & Fernandes 1999). Os campos rupestres da Cadeia do Espinhaço ocorrem em áreas acima de 900 metros de altitude onde prevalecem afloramentos rochosos que possuem solos arenosos rasos, ácidos e extremamente pobres em nutrientes (Giulietti et al. 1997; Ribeiro & Fernandes 2000; Medina & Fernandes 2007).

Estima-se que a flora da Cadeia do Espinhaço possua um número superior a 4000 espécies. Em uma área de apenas 200 km<sup>2</sup> na Serra do Cipó (região sul da Cadeia do Espinhaço) 1590 espécies de plantas foram encontradas (Giulietti et al. 1987). Acredita-se que eventos históricos, como o isolamento geográfico e mudanças climáticas durante o Quaternário (quando as populações expandiram e contraíram), forneceram condições propícias para a ocorrência de especiações, o que pode ter causado o alto grau de

endemismo e diversidade observado nesse ambiente. Porém, devido ao aumento das pressões antrópicas, muitas espécies nativas dos campos rupestres estão ameaçadas de extinção (Giulietti et al. 1997; Jacobi et al. 2007).

Apesar de estudos genéticos com espécies de campos rupestres serem extremamente escassos, há importantes trabalhos já publicados na literatura. A comparação da diversidade genética entre duas espécies de *Chamaecrista*, sendo uma de ampla distribuição e outra de ocorrência restrita, indicou menor variabilidade na espécie de distribuição limitada (Silva et al. 2007). Outro estudo comparou a diversidade genética de duas espécies de *Vellozia*, também de diferentes distribuições (Jacobi et al. 2007). De forma similar, os resultados encontrados indicaram que a espécie de menor distribuição possui menor variabilidade genética. Apesar de ser uma espécie endêmica e restrita, a avaliação da diversidade genética da espécie *Baccharis conccina* indicou alta variabilidade genética (Gomes 2001). A variabilidade genética de cinco espécies do gênero *Pleurothallis* também foi relativamente alta (Borba et al. 2001), assim como foi alta a diversidade genética encontrada na espécie *Bulbophyllum exaltatum* (Ribeiro et al. 2008b). Por outro lado foram encontrados valores baixos de diversidade genética intra-populacional em 11 populações da espécie *Proteopsis argêntea* (Jesus et al. 2001) e também em espécies do gênero *Minasia* (Jesus et al, 2009). Além desses, outros estudos avaliaram a diversidade genética de espécies dos campos rupestres (Cavallari et al. 2006; Pereira et al. 2007).

*Coccoloba* P. Browne é o gênero mais representativo dentre os gêneros da família Polygonaceae com mais de 44 espécies distribuídas pelo território brasileiro (Howard 1961). Das 35 espécies encontradas ao sul da Amazônia, cerca de 90% são endêmicas (Brandbyge 1990). São plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas ou lianas, com caules articulados, folhas simples, alternas e inteiras, com estípulas concrecidas (ócreas) (Melo 2004). Rizzini (1986) destaca o grande interesse florístico do gênero, já que esse ocorre em formações vegetais diferenciadas, por todas as províncias fitogeográficas brasileiras. Alguns trabalhos (Ribeiro et al. 1999; Melo 2004) ressaltam a dificuldade de classificação das espécies do gênero *Coccoloba* devido à grande diversidade morfológica dos indivíduos.

*Coccoloba cereifera* Schw., é uma espécie sub-arbustiva, que pode atingir 2,5 metros de altura; é endêmica dos campos rupestres da Serra do Cipó, Minas Gerais, sendo encontrada exclusivamente em uma área de apenas 26 Km<sup>2</sup> (Ribeiro & Fernandes 1999). Os ramos dessa planta são delgados e se desenvolvem a partir de um xilopódio (tubérculo lenhoso gemífero), estrutura comum presente em mais de 100 gêneros do Bioma Cerrado (Rizzini 1979). A freqüente ocorrência de queimadas na região provoca a morte da parte aérea da planta, porém raramente ocorre a carbonização devido à alta concentração de ceras na epiderme. Como conseqüência, há a formação de clones bastante ramificados, causados pelo intenso rebrotamento a partir do xilopódio (Ribeiro & Fernandes 1999; 2000).

*Coccoloba cereifera* está claramente associada a solos arenosos. A espécie ocorre em manchas densas de indivíduos, o que provavelmente está relacionado ao crescimento clonal e a distribuição dispersa dos solos arenosos ao longo do campo rupestre. A sua distribuição pode estar relacionada com sua baixa tolerância fisiológica, dispersão e competitividade limitada. O sistema reprodutivo de *C. cereifera* é único na família Polygonaceae. Indivíduos com flores estaminadas, pistiladas ou perfeitas podem ser encontrados na população em diferentes proporções (Silva et al. 2008). A floração e frutificação de *C. cereifera* ocorrem de abril a julho, e seu fruto é provavelmente disperso por formigas ou aves (Ribeiro & Fernandes 1999).

*Coccoloba cereifera* é uma espécie que corre sério riscos de extinção. Aliado ao fato da distribuição dessa espécie ser restrita a uma área reduzida, fora dos domínios do Parque Nacional da Serra do Cipó, a pavimentação da rodovia MG-010 que corta a região está favorecendo o aumento do turismo desordenado, a frequência de queimadas, o estabelecimento de espécies invasoras, de fazendas de criações de gado e de outros tipos de empreendimentos. Essas ameaças agravam não só a sobrevivência de *C. cereifera*, mas também colocam em perigo muitas espécies da fauna e flora local (Viana et al. 2005). Por outro lado, a distribuição limitada de *C. cereifera* e seu sistema reprodutivo peculiar possibilitam o uso dessa espécie como um modelo singular para diversos estudos biológicos.

O desenvolvimento de marcadores microssatélites é de extrema importância para estudos da estrutura genética dessa espécie, pois disponibiliza uma ferramenta de reconhecida eficácia para análises ecológicas e evolutivas que podem contribuir para futuros programas de conservação e manejo.

## OBJETIVOS

Desenvolver marcadores microssatélites para *Coccoloba cereifera* e aplicá-los em um estudo de estrutura genética da espécie a fim de gerar dados úteis não apenas ao manejo e conservação da espécie, mas que contribuirão com estudos ecológicos e evolutivos futuros.

O presente estudo teve como objetivos principais:

(i) isolar e caracterizar locos microssatélites de *C. cereifera* que apresentem polimorfismo;

(ii) utilizar os microssatélites obtidos na avaliação do *status* genético da espécie para auxiliar na elaboração de planos de manejo e conservação da espécie.

Para o isolamento dos locos microssatélites foi construída uma biblioteca enriquecida baseada na técnica de captura de fragmentos por sondas de hibridização (Glenn & Schable 2005). A caracterização dos locos microssatélites foi realizada através da análise dos genótipos de 40 indivíduos. O *status* genético da espécie foi caracterizado por meio da genotipagem de 139 indivíduos. O desenho amostral estabelecido se baseou na amostragem de indivíduos distribuídos por toda a área de ocorrência da espécie.



## CAPÍTULO 1

Artigo publicado no ano de 2008 no periódico *Molecular Ecology Resources*, **8**, 854–856.

doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02089.x

**Isolation and characterization of microsatellite loci in *Coccoloba cereifera*  
(Polygonaceae), an endangered species endemic to the Serra do Cipó, Brazil.**

Rennan G. Moreira<sup>1</sup>, Ross A. McCauley<sup>2</sup>, Aurea C. Cortés-Palomec<sup>2</sup>, M. Bernadete Lovato<sup>3</sup>,  
G. Wilson Fernandes<sup>1</sup> and Ken Oyama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecologia Evolutiva & Biodiversidade

<sup>3</sup>Laboratorio de Genética de Populações

Departamento de Biologia Geral/ICB

Universidade Federal de Minas Gerais

CP 486, Belo Horizonte, Minas Gerais, 30161-970 Brazil

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones en Ecosistemas

Universidad Nacional Autónoma de México

Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701

Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta

Morelia, 58190 Michoacán, México

Key Words: Microsatellite, Polygonaceae, *Coccoloba cereifera*, Rupestrian fields, Espinhaço mountains

Corresponding author: Rennan G. Moreira

Email: rennangm@gmail.com

Running title: Microsatellites in *Coccoloba cereifera*

## Abstract

Microsatellite primers were isolated from the microendemic and threatened species *Coccoloba cereifera*, a shrub known only from a small region in the Serra do Cipó, Brazil. Thirteen primer pairs amplifying perfect and imperfect microsatellite regions were tested in 40 individuals from the one known occurrence of the species. Number of alleles ranged from two to six and levels of observed heterozygosities ranged from 0.21 to 0.95. These markers will be useful for the analysis of questions concerning population genetic structure and will assist in providing information for future conservation management programs.

*Coccoloba cereifera* Schwn. (Polygonaceae) is a microendemic shrubby species found exclusively in the rupestrian fields of the Serra do Cipó in the state of Minas Gerais, Brazil (Melo 2000). This species has a highly aggregated distribution, being found only within a small area of 26 km<sup>2</sup>, between 1200 and 1300 meters above sea level. It is associated with sandy patches formed between rocky outcrops which are poor in nutrients (Ribeiro & Fernandes 1999; 2000). While there is one area of integral wildlife protection in the region (Parque Nacional da Serra do Cipó), all *C. cereifera* occurs outside of this protected zone. Recent asphaltting of the road that crosses the region has led to a major increase in automobile traffic and tourist visitation directly impacting this highly restricted species (Viana *et al.* 2005). Additionally, the road corridor has created an area of disturbance that has greatly increased the potential for the establishment of competing invasive species (N. P. U. Barbosa, unpublished data). Besides these threats, cattle management has led to increased fire frequency, a condition which greatly threatens the survival of *C. cereifera*.

Studies of reproductive biology have shown that *C. cereifera* is the only species of Polygonaceae exhibiting trioecy. Staminate, pistillate, and perfect flowers are found to occur separately in different individuals of *C. cereifera*, a condition which could have significant impacts on the reproductive biology and genetic structure of this species (Silva *et al.* 2007).

Microsatellite DNA loci were isolated from *C. cereifera* using a modification of the hybridization capture technique (Armour *et al.* 1994) developed by Glenn and Schable (2005)

which uses a modification of the SNX linker of Hamilton *et al.* (1999) (SuperSNX). Genomic DNA was isolated from a single individual of *C. cereifera* using a modification of the CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) protocol of Doyle and Doyle (1987). The DNA was digested with *RsaI* (Invitrogen) and the resultant fragments ligated to the SuperSNX linker (Invitrogen). This ligated DNA was hybridized in three separate pooled reactions with 3' biotinylated oligos, (i) [(AG)<sub>12</sub>, (AC)<sub>13</sub>, (AAC)<sub>6</sub>, (AAG)<sub>8</sub>, (ATC)<sub>8</sub>, (ACT)<sub>12</sub>], (ii) [(AAAC)<sub>6</sub>, (AAAG)<sub>6</sub>, (AATC)<sub>6</sub>, (AATG)<sub>6</sub>, (ACAG)<sub>6</sub>], and (iii) [(AAAT)<sub>8</sub>, (AACT)<sub>8</sub>, (AAGT)<sub>8</sub>, (ACAT)<sub>8</sub>] (Invitrogen). Enrichment of microsatellite-containing DNA fragments was performed using Streptavidin coated Magnetic Dynabeads (Dyna) according to the procedure outlined in Glenn and Schable (2005). The enriched fragments were then amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the SuperSNX forward primer and cloned into plasmids using the TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen). Colonies were grown on Luria-Bertani (LB) ampicillin plates with X-Gal and IPTG overnight. Positive (white) colonies were randomly selected, allowed to grow for 12 h in LB media, and plasmid DNA isolated using a QIAprep<sup>®</sup> Miniprep Kit (QIAGEN). Plasmid DNA was then digested with *EcoRI* (Invitrogen) and resultant digestions run on an agarose gel. Plasmids exhibiting different digestion profiles were then selected for sequencing using the M13 forward and reverse primers on an ABI-Prism 3100-*Avant* genetic analyzer using BigDye Terminator<sup>®</sup> version 3.1 sequencing chemistry (Applied Biosystems).

Sequences were assembled and edited using Sequencher version 4.7 (GeneCodes Corporation). Ninety-six plasmids were selected for sequencing and 23 contained microsatellite loci with flanking regions suitable for primer design. Primers were designed using PRIMER 3 software (Rozen & Skaletsky 2000). Primer pairs were tested to verify amplification and determine optimal annealing temperatures in individual 25 µl PCR reactions as follows: 10× PCR Buffer (containing 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 µM each dNTP, 0.2 µM each primer, 1 U *Taq* (Invitrogen), 10 ng DNA. Amplifications were performed in an Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> or Mastercycler<sup>®</sup> ep gradient

thermocycler using the following conditions: initial denaturation at 95°C for 4 min, 25 cycles consisting of denaturation at 94°C for 30 s, 30 s at 50–65°C annealing temperature and 30 s of extension at 72°C; a final extension at 72°C was included for 7 min. PCR products were run on a 2% agarose gel staining with ethidium bromide.

Multiplexing of primer pairs with similar annealing temperatures was performed in four individual groups (see Table 1). PCR was performed using the QIAGEN Multiplex Kit (QIAGEN) in 5 µl reactions as follows: 1× Multiplex PCR Master Mix, 2 µM each primer, dH<sub>2</sub>O, and 5 ng DNA. Forward primers were fluorescently labeled (Table 1) while reverse primers were left unlabeled. The Multiplex PCR followed the manufacturer's recommendations and consisted of an initial activation step of 95°C for 15 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 54, 57, 58 or 61°C for 90 s (Table 1), and extension at 72°C for 60 s, followed by a final extension at 60°C for 30 min. Multiplex PCR products were diluted by 50% in dH<sub>2</sub>O and run in an ABI-Prism 3100-*Avant* genetic analyzer with the GeneScan-500 LIZ size standard included (Applied Biosystems). Fragment analysis and final sizing was performed using GENEMAPPER version 4 (Applied Biosystems).

Levels of polymorphism of the isolated microsatellite loci were tested in 40 individuals collected at regular intervals along an eight km transect spanning the area of occurrence of *C. cereifera* (km 106-114 Highway MG-010). Levels of expected and observed heterozygosities, linkage disequilibrium and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were calculated using GENEPOP version 3.4 (Raymond & Rousset 2004).

Thirteen of the 23 primers tested were found to contain polymorphic loci. The number of alleles ranged from two to six and observed and expected heterozygosity per locus ranged from 0.21 to 0.95 and 0.34 to 0.72, respectively (Table 1). Eight out the 13 primers contained moderate to high degrees of polymorphism, with expected heterozygosities equal or higher than 0.50. Seven of these contained four to six alleles. Linkage disequilibrium was found between the following pairs of loci: 1 vs. 18, 17 vs. 4, 6 vs. 7, 17 vs. 10, and 10 vs. 9 after application of a Bonferroni correction (Table-wide  $\alpha$ ,  $P \leq 0.0005$ ) (Rice 1989). Most individual

loci were additionally found to be out of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ( $P \leq 0.05$ ) (Table 1), with the majority of these due to an excess of homozygosity. This may be due to the presence of null alleles at these loci or a consequence of the restricted distribution and/or unknown patterns of inheritance due to the complex breeding system.

These markers will be useful for future studies to address the evolutionary history of *C. cereifera* and to provide data to assist in its conservation and management. Currently, a spatial genetic study of the entire distribution of the species is being performed using these markers.

### **Acknowledgements**

We thank LC Resende for field work and laboratory assistance. This study was supported by grants provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 304851/2004-3) and Fapemig (CRA 583/01, 683/06) and Planta Ltda. Permission to transport biological material from Brazil was granted by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis, CITES/FLORA - (license number 07BR000321/DF). This study was completed in partial fulfillment of the masters degree of R.G.M. at the Universidade Federal de Minas Gerais.

## References

Armour JAL, Neumann R, Gobert S, Jefferys AJ (1994) Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*, **3**, 599-605.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, **19**, 11-15.

Glenn TC, Schable NA (2005) Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, **395**, 202-222.

Hamilton MB, Pincus EL, DiFiore A, Fleischer R C (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, **27**, 500-507.

Melo E (2000) Polygonaceae da Cadeia do Espinhaço, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, **14**, 273-200.

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.

Ribeiro KT, Fernandes GW (1999) Geographic distribution of *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae), a narrow endemic from Serra do Cipó, Brazil. *Bios*, **7**, 7-12.

Ribeiro KT, Fernandes GW (2000) Patterns of abundance of a narrow endemic species in a tropical and infertile montane habitat. *Plant Ecology*, **147**, 205-217.

Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.

Rozen S, Skaletsky HJ (2000) PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds Krawetz S, Misener S), pp. 365-386. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.

Silva CA, Cano MAO, Vieira MF, Fernandes GW (2007) Trioecy in *Coccoloba cereifera* Schwacke (Polygonaceae), a narrow endemic and threatened tropical species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* (in press).

Viana LR, Fernandes GW, Silva CA (2005) 'Ecological road' threatens endemic Brazilian plant with extinction. *Plant Talk*, **41**, 15.

**Table 1** Characterization of 13 microsatellite primers for *Coccoloba cereifera* isolated through enrichment. Listed are locus name, sequences for forward (F) and reverse (R) primers, repeat motif, size range, range of annealing temperatures when run individually and multiplexed ( $T_a$ ), fluorescent label for multiplexing (Label), number of alleles ( $A$ ), overall means of observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) measures of heterozygosity, number of successfully genotyped individuals (from total of 40), and GenBank accession number.

Name	Primer sequence 5'-3'	Repeat motif	Size range (bp)	$T_a$ (°C)	Label	$A$	$H_o$	$H_e$	No. Successfully Genotyped	GenBank Accession #
Coc-1*†	F ATGCACCAAAGACGCTAACC R GAACCGGAGCCCGTTACTAT	(GA) <sub>8</sub>	152-165	53-58/57	VIC	4	0.54	0.62	37	EU049568
Coc-2*†	F CAAAAGGCAAACACACAGACA R CAACACAGCAAGGCAGGTAA	(AG) <sub>8</sub>	181-192	53-57/57	NED	5	0.21	0.60	34	EU049569
Coc-4*†	F TGATACCAATTTCTCGGTGCT R CCCGCTGTTCTTCTTCTTCA	(TC) <sub>9</sub>	145-163	53-57/57	6-FAM	5	0.40	0.60	35	EU049570
Coc-5*	F TGGATGTGGTTCAGTTCCAA R TCCTCATGCAACTGGTCACT	(CT) <sub>12</sub>	151-157	52-56/54	6-FAM	4	0.95	0.62	39	EU049571
Coc-6	F AACCATCACGCATGAATCAA R GGATGTGGGAACATGTAATGC	(GA) <sub>12</sub>	238-240	51-57/57	VIC	2	0.52	0.50	29	EU049572
Coc-7	F GCTGTCACAATCTTGGTGGA R TTGCTTGGGTCGCAATTTAT	(ACT) <sub>4</sub>	233-237	50-56/54	6-FAM	4	0.54	0.54	37	EU049573
Coc-9*	F CCCCTAGACCCCGTGTATC R TTAAAGCCATGCATTCCTGA	(GTT) <sub>4</sub>	161-162	51-59/58	VIC	2	0.54	0.40	39	EU049574
Coc-10	F GGAGAAGATCTTTGGGTTTGC R TGACTGGCTAATCAATGAAGGA	(CTTT) <sub>5</sub>	154-155	55-59/58	6-FAM	2	0.54	0.42	39	EU049575
Coc-12*†	F GGCTGCTTGGAAATCAAAAAG R GGATGAGCCAAAGGATGAGA	(GA) <sub>4</sub> A(GA) <sub>11</sub>	213-223	53-56/54	PET	3	0.26	0.42	35	EU049576
Coc-15*†	F AGCTGGTAAACATGAGCATCC R AAGCAACCCAGATTTTGTGG	(AG) <sub>4</sub> AA(AG) <sub>8</sub>	206-217	52-58/58	VIC	2	0.21	0.34	38	EU049577
Coc-16*†	F GCTCTTCAGCTCTTCGTGCT R CAAATTGACCCAAACCAACC	(TC) <sub>10</sub> AT(TC) <sub>7</sub>	154-176	52-58/58	PET	6	0.29	0.72	38	EU049578
Coc-17	F GGGAGCTGGTTCATCATTGT R CTTACACGGGGTCCCTTTT	(CTT) <sub>2</sub> T <sub>3</sub> (CTT) <sub>5</sub>	241-251	53-57/57	NED	4	0.59	0.61	29	EU049579
Coc-18	F TCAGCGCTTCATCTCTCAAA R CTAGTGCTCGGGGTGAGAGT	CAACA(CAA) <sub>5</sub> (CTA) <sub>4</sub>	151-171	53-57/57	PET	2	0.46	0.39	37	EU049580

\* Not in Hardy-Weinberg Equilibrium

† Deviation from HWE due to homozygosity excess



## CAPÍTULO 2

Artigo submetido ao periódico *Conservation Genetics* no ano de 2008.

**Spatial genetic structure of *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae), a critically endangered microendemic species of Brazilian rupestrian fields**

Rennan G. Moreira<sup>1</sup>, Ross A. McCauley<sup>2,3</sup>, Aurea C. Cortés-Palomec<sup>2</sup>, G. Wilson Fernandes<sup>1</sup> and Ken Oyama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ecologia Evolutiva & Biodiversidade/DBG  
ICB/Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte, 30161-970, Brazil

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones en Ecosistemas  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701  
Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta  
Morelia, Michoacán, C.P. 58190 México

<sup>3</sup>Present Address:

Department of Biology  
Fort Lewis College  
Durango, Colorado 81301 USA

Corresponding author: Rennan G. Moreira

Email: [rennangm@gmail.com](mailto:rennangm@gmail.com)

Telephone number: +55 31 3409 2580

Fax number: +55 31 3409 2570

**Abstract**

*Coccoloba cereifera* (Polygonaceae) is an extremely rare endemic shrub found exclusively in the rupestrian fields of Serra do Cipó, southeastern, Brazil. We assessed the genetic diversity and structure across the single occurrence area of *C. cereifera*. The genetic variation at 13 microsatellite loci was estimated from 139 individuals sampled in nine patches. The number of alleles per locus varied from two to ten; the expected and observed heterozygosity ranged from 0.324 to 0.566 and 0.337 to 0.529, respectively. Microsatellites detected low but statistically significant levels of differentiation among patches ( $F_{ST} = 0.123$ ,  $R_{ST} = 0.105$ ), whereas Mantel test results showed a weak but significant pattern of isolation by distance ( $r^2 = 0.31$ ,  $p < 0.002$ ). Bayesian clustering indicated two subdivisions connected via admixture. Habitat heterogeneity across the drainage basin of the Rio Indequicé is likely limiting gene flow within patches of the geographically restricted population. While there is currently no evidence for a direct genetic risk to species survival, the apparent natural segregation occurring within the species could be exacerbated by future land use changes and the influx of alien species which could lead to demographic reductions in population size leading to a reduction in genetic diversity and an increase in population subdivision. We suggest that maintaining the integrity of the habitat within the small range of the species and continued monitoring of the effects of alien species would be the wisest use of management resources.

Key Words: Rupestrian fields, Microsatellite, Rare, Narrow, Endemism, Trioecy

## Introduction

Knowledge of how genetic diversity is structured in a spatial context, either within a population or among multiple populations, can contribute greatly to our understanding of species evolutionary history and population dynamics. In endemic species this information may be of crucial importance for designing conservation strategies due to the theorized reduction in genetic diversity and consequences for individual fitness seen in such populations (Hamrick et al. 1991; Frankham et al. 2002; Cole 2003; Leimu et al. 2006; Willi et al. 2006). Accurate identification of populations or portions of a species' range that contain the greatest allelic variation, and hence evolutionary potential, can assist in the designation of priority areas for protection and helps capture genetic variation to be used in reintroduction and *ex-situ* preservation programs (Moritz 1994; Holtsford and Hancock 1998; Frankham et al. 2002).

Despite the high numbers of endemic and rare species that can be found in almost all ecoregions of Brazil, the Cerrado (savanna) is of great importance due to its large area (2.2 million Km<sup>2</sup>) and high proportion of endemic species (4,400 of almost 10,000 total plant species, Ratter et al. 1997; Myers et al. 2000). Within the Cerrado domain the rupestrian fields (rocky outcrops at high elevations) exhibit a peculiar physiognomy in which a very high level of endemism and biodiversity is found (Giulietti et al. 1997). This environment, dominated by sclerophyllous plant communities, is exposed to severe abiotic conditions, including strong winds, frequent fires, wide diurnal temperature variations (Giulietti et al. 1997; Ribeiro and Fernandes 2000; Jacobi et al. 2007), and a long dry season (approximately 5 months, Madeira and Fernandes 1999).

Among the hundreds of plant species endemic to the rupestrian fields ecosystem, *Coccoloba cereifera* Schw. (Polygonaceae) is one of the most restricted in overall distribution. It is a microendemic shrub, found only in an area of approximately 26 km<sup>2</sup>, within the Espinhaço mountains of Minas Gerais, Brazil (Ribeiro and Fernandes 1999). It occurs between 900 and 1300 m above sea level, in a region of quartzitic outcrops among shallow, acidic, nutrient-poor and highly erodible sands (Ribeiro and Fernandes 1999). Due

to this highly restricted range *C. cereifera* has been identified as critically endangered in an unofficial list of endangered species for the state of Minas Gerais in 2007 (Biodiversitas 2007). The species has not however been included in the national list of Brazilian endangered species. While the species range is within close proximity to the National Park of Serra do Cipó, all the known occurrences are found outside of the park boundary and are thus not offered any form of protection (Ribeiro and Fernandes 1999). Much attention has been paid recently to the consequences of the recent paving of the road that crosses the distribution area of the species (Viana et al. 2005, see also Fig. 1). The road has led to an increase in automobile traffic and tourist visits and there are serious concerns that this may lead to an increased fire risk and a higher probability of alien species invasion that could negatively affect the survival of *C. cereifera*.

*Coccoloba cereifera* occurs in a patchy distribution throughout its range with highly variable patch sizes and individual densities. These aggregations generally follow a strong association with sandy soils formed among the rocky outcrops (Ribeiro and Fernandes 1999, see also Fig. 1). Individual plants may reach nearly three meters in height with the branches growing from a lignotuber. The leaves of *C. cereifera* are bluish-purple and are covered with a thick layer of wax that protects them from complete burning during the frequent fires of the region. The species has been shown to reproduce via facultative apomixis and has a complex sexual reproductive system in which each individual produces one of four flower types: staminate, pistillate and two different hermaphroditic forms (Silva et al. 2008). Additionally, *C. cereifera* may grow vegetatively by the production of stolons resulting in a preponderance of patches of genetically identical individuals (ramets). Ramets within a patch will all co-flower, and different patches flower at different times, resulting in nearly continuous flowering across the species' range throughout the whole year. While there have been no detailed studies describing pollination and/or seed dispersal in *C. cereifera*, Silva et al. (2008) has indicated that two different hymenopteran species are likely serving as pollinators.

Our primary aim in completing this study was the collection of genetic information important toward the generation of a management plan for species conservation to complement that gained through studies of demography (Ribeiro and Fernandes 2000). Therefore we sought to understand how genetic variability is distributed across the range of the species. We hypothesized that diversity within populations would be moderate to low due to species' restricted range and asexual reproduction. Because of its complex sexual reproductive system and proximity among patches we also expect low genetic differentiation and lack of geographic structuring.

## **Materials and Methods**

### *Sampling and DNA extraction*

Following the description and mapping of species occurrence (Ribeiro and Fernandes 1999), we sampled a total of 139 individuals distributed across nine patches, covering the whole area of species distribution (Fig. 1). We collected leaves and recorded geographical coordinates from individuals that were separated by at least five meters in an attempt to avoid sampling possible clonal individuals (Silva et al. 2008). The number of plants sampled in each aggregation was variable due to differences in plant density. DNA was extracted following a modification of the CTAB protocol of Doyle and Doyle (1987).

### *Microsatellite Analyses*

To genotype all individuals, we used thirteen microsatellite loci previously developed and optimized for *C. cereifera* (Moreira et al. 2008) in multiplex reactions with fluorescently labeled primers. The polymerase chain reaction (PCR) was performed using the QIAGEN Multiplex Kit<sup>®</sup> (QIAGEN) in 5 µl reactions as follows: 1× Multiplex PCR Master Mix, 2 µM each primer, dH<sub>2</sub>O, and 5 ng DNA. The Multiplex PCR followed the manufacturer's recommendations and consisted of an initial activation step of 95°C for 15 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 54, 57, 58 or 61°C for 90s, and extension at 72°C for 60s, followed by a final extension at 60°C for 30 min; all cycling reactions were performed in an Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> thermocycler. Multiplex PCR

products were diluted by 50% in dH<sub>2</sub>O and run in an ABI-Prism 3100-*Avant*<sup>®</sup> genetic analyzer with the GeneScan-500 LIZ size standard included (Applied Biosystems). We used GENEMAPPER version 4 (Applied Biosystems) to perform fragment analysis and final sizing.

### *Statistical Analysis*

We used the software FSTAT (Goudet 2002) to characterize the microsatellite loci. We assessed the number of alleles, the expected and observed heterozygosities under Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), and linkage disequilibrium between pairs of loci employing a Bonferroni correction (Rice 1989; Goudet et al. 1996) at the level  $p < 0.05$ . For each individual patch of *C. cereifera* we calculated average number of alleles, allelic richness [using Hulbert's rarefaction method (Hulbert 1971)], and expected and observed heterozygosities under HWE using FSTAT. We also used this program to perform tests for deviation from HWE for loci and patches with allelic permutations among individuals within samples.

We used the software FSTAT (Goudet 2002) to obtain the parameters  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  and  $F_{IT}$  for each locus and over all loci after multilocus analyses. Calculations followed the procedure of Weir and Cockerham (1984). The fixation index,  $F_{ST}$ , is a measure of the genetic difference among patches, whereas the inbreeding coefficient,  $F_{IS}$ , is a measure of allelic frequency correlation among individuals within patches. Furthermore, the  $F_{IT}$  index quantifies the variation observed at the individual level relative to the total amount of variation across all individuals sampled. Due to the stepwise mutation nature of microsatellites (Valdes et al. 1993), we also used FSTAT to perform analyses of  $R_{ST}$  for each locus and over all loci to subsequently compare with  $F_{ST}$  estimates. For all comparisons we applied significance tests at the  $p < 0.05$  level with a Bonferroni correction.

To obtain the likely number of populations, we performed Bayesian clustering analyses using the software STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). We executed analyses with both prior information on patch structure and with no *a-priori* structure to evaluate the consistency of results. Parameter sets assumed the admixture model with alleles correlated among patches. In both analyses we performed ten independent runs of  $10^5$  burn-in-length

MCMC chains and  $5 \times 10^5$  additional simulations testing from one to twelve clusters ( $K = 1-12$ ). We calculated the average of each  $K$  likelihood values through all runs as well as  $\Delta K$  statistics (Evanno et al. 2005) to verify the correct number of segregate groupings.

To test for isolation by distance among different patches, we performed a Mantel test (Mantel 1967) using the software GENEALX (Peakall and Smouse 2006). First, a matrix of pairwise  $R_{ST}$  genetic distance among patches was generated; subsequently it was compared against a matrix of geographic distance. Significance tests were performed following 999 permutations ( $p < 0.05$ ).

## Results

### *Genetic Diversity*

All microsatellite loci assessed were polymorphic and did not deviate from HWE ( $p < 0.0004$ ). The total number of alleles found were 58, ranging from two to ten per locus, with an average of 4.46 alleles per locus. After multilocus analysis using all loci, expected and observed heterozygosities were 0.507 and 0.479 (Table 1). Locus Coc-9 showed the lowest values of expected and observed heterozygosities, being 0.196 and 0.219, respectively (Table 1) while locus Coc-5 showed the highest heterozygosity values, being 0.691 and 0.894 (Table 1). No significant values of linkage disequilibrium were observed in any locus pair comparison ( $p < 0.0006$ ). All patches sampled were under HWE ( $p < 0.0004$ ). Loci Coc-4 and Coc-12 were monomorphic at patch F and at patches C and F respectively. The mean number of alleles observed in each patch was 2.7 ranging from 2.15 in patch F to 3.08 in patch B, whereas allelic richness ranged from 2.23, in patch F, to 3.04, in patch H (Table 2). Patch F showed the lowest values of expected and observed heterozygosity ( $H_e = 0.324$  and  $H_o = 0.337$ ), while the highest values were found, respectively, in patch H ( $H_e = 0.566$ ) and patch G ( $H_o = 0.529$ ) (Table 2).

### *Population structure and geographic distribution of the genetic variability*

Values of  $F_{IS}$  were not significantly different from zero for any locus or when calculations were performed over all loci (Table 1). On the other hand, in  $F_{IT}$  analyses three loci were positive and statistically different from zero. Similarly, multilocus analysis of  $F_{IT}$

resulted in a positive (0.070) and statistically significant ( $p < 0.0004$ ) value (Table 1). In the  $F_{ST}$  and  $R_{ST}$  analyses only loci Coc-6 and Coc-7 showed values not significantly different from zero, whereas loci Coc-1 and Coc-12 presented the highest values. Values of  $F_{ST}$  and  $R_{ST}$  in multilocus analyses were similar ( $F_{ST} = 0.123$  and  $R_{ST} = 0.105$ ), with both being statistically different from zero ( $p < 0.0004$ ) (Table 1). Bayesian analyses using prior information about patches showed greater mean posterior probabilities at  $K = 10$  (Fig. 2a), but application of the cluster determining method of Evanno et al. (2005) indicated that two clusters was the most likely number of populations (Fig. 2b). Bar plots representing each individual estimated membership fraction in each of the two inferred clusters showed varying extents of admixture among populations (Fig. 3). Most individuals of patches A, B, D and E showed a shared genetic pattern while most individuals of patches F, G and H exhibited dominance of an alternate pattern. Patches C and I had an even mix of genotypes from both clusters. The same results of  $K$  and bar plot pattern were obtained when patches were not established *a priori*.

Pairwise  $R_{ST}$  comparisons among patches showed statistically significant levels of differentiation between most patches (Table 3), mainly when comparisons included patches C, D or F. Patch A proved to be the most divergent of the individual patches showing a statistically significant differentiation from all patches except for patch H. Patches geographically distant from each other generally showed greater and statistically significant  $R_{ST}$  values, as evidenced by the comparison of patches C and F. These pairwise analyses corroborated well with Mantel tests performed at the patch level showing a significant “isolation by distance” pattern ( $r^2 = 0.31$ ,  $p < 0.002$ ) (Fig. 4).

## **Discussion**

### *Genetic diversity*

On average, studies conducted with plant species using microsatellites show approximately 10.0 alleles per locus and expected and observed heterozygosities of 0.61 and 0.58, respectively (Nybom 2004). However, *C. cereifera* showed low allelic diversity (average of 4.46 alleles per locus) and low levels of heterozygosity ( $H_e = 0.48$  and  $H_o =$



0.51). On the other hand, the values found are quite similar to the ones reported for other rare endemic plant species (Nybom 2004; Gao 2005; Kang et al. 2008; Furches et al. 2009). All patches displayed similar levels of allelic richness and heterozygosity (Table 2), which indicates an even distribution of the genetic variability of the species through its occurrence range.

No inbreeding evidence was found suggesting a successful mechanism to maintain outcrossing within the species. Studies on the reproductive system of *C. cereifera* (Silva et al. 2008) have reported the occurrence of trioecy, a complex breeding system in which staminate, pistillate, and hermaphrodite morphs co-occur in natural populations. On the other hand, no information is available on the differential contribution of each morph to the breeding system and their spatial distribution and functionality in the landscape mosaic of the species. As the breeding system has a strong determinant of the level of genetic diversity within populations (Loveless and Hamrick 1984; Hamrick et al. 1991) efforts must be made to fully understand trioecy in *C. cereifera* and its role in the generation and distribution of the genetic variability. Otherwise, in light of the findings on genetic diversity, there appear to be no explicit genetic risks of extinction at the present time given the current abundance of individuals. Nevertheless, demographic changes which could affect levels of population genetic diversity are possible, primarily due to ongoing habitat disturbance and fragmentation which could lead to increased segregation of the species.

#### *Population genetic structure and geographic variability distribution*

$F_{IS}$  results agree with HWE analyses performed for each patch and for each locus within each patch, confirming no evidence of inbreeding. However, the result of  $F_{IT}$  after multilocus analysis was positive and statistically significant, indicating a deficiency of heterozygotes, as would be expected if patches differ significantly in their allele frequencies (Wahlund effect). In addition, the multilocus analysis also resulted in statistically significant values of  $F_{ST}$  and  $R_{ST}$  indicating a moderate level of substructuring. While  $F_{ST}$  and  $R_{ST}$  values are less than the average found for other plant species (Nybom 2004), it still indicates a limitation in gene flow among patches. Similar results of  $R_{ST}$  and  $F_{ST}$  suggest that allele's

identity by descent and by state had not diverged in these patches. Additionally, the negative  $R_{ST}$  value found at locus Coc-16 probably occurred because of an error in estimation (Aldrich et al. 1998).

Evidence from both pairwise  $R_{ST}$  and Bayesian STRUCTURE analyses also indicated the presence of significant population substructuring within the restricted range of *C. cereifera*. Earlier studies (Silva et al. 2008) have suspected that gene flow may be restricted due to the unique breeding system. While our data does not show a widespread restriction of gene flow across all populations, it does indicate differences in levels of gene flow between some different patches. Comparison of pairwise  $R_{ST}$  analysis and results from STRUCTURE with the sampling distribution shows that microhabitat differences may be exerting partial control over gene flow patterns. The proximity to water courses, particularly the close proximity to the drainage area of the Rio Indequicé appears to be grouping patches A, B, D, and E and to a lesser extent patch C into a natural group segregated from the remainder of the sampled patches which all occur toward the edge of this drainage basin. Pairwise  $R_{ST}$  comparisons between patches on opposite sides of the drainage basin (e.g. Patches F & I) additionally show significant differentiation (Table 3). Combined with the significant correlation found in Mantel tests performed at the patch level (Fig. 4) this evidence suggests an isolation by distance effect on gene flow likely due to heterogeneity of habitat. While the linear distance among the most divergent populations is small, less than 5 km, such fine-scale differentiation due to habitat has been demonstrated within other species showing small and restricted ranges (Wang et al. 2006; Furches et al. 2009).

This microhabitat scale differentiation may be due to either differential pollinator behavior or the limiting of seed dispersal to areas on either side of or within the drainage basin. Such small limitation in gene flow may be attributable to the flight range of the bee *Trigona spinipes* (Fabr.), a suspected pollinator (Silva et al. 2008) which has been shown to have a flight range of 840 m (Araújo et al. 2004), promoting pollen exchange only among nearby aggregations. Future assessments will need to investigate more fully the patterns of

pollination, particularly the habitat preferences of *T. spinipes* and seed dispersal within *C. cereifera* if we want to understand how this pattern is being maintained.

#### *Conservation implications*

While there is currently no information regarding the evolutionary history of *C. cereifera* it is likely that it has been maintaining a relatively low yet homogeneous level of genetic diversity across its restricted range. Barring future demographic changes which could greatly decrease the number of individuals, or negatively affect the pollinator (and thus the pollination process), survival of *C. cereifera* does not appear to be presently linked to any specific genetic risk. The fact however that the population does show natural differentiation among patches within its small range, likely caused by microhabitat differences, suggests that any additional anthropogenic barriers to gene flow could serve to segregate the small population. Further segregation could lead to a reduction in effective population size and jeopardize the survival ability of isolated patches either through demographic factors or through decreased fitness due to the accumulation of mildly deleterious alleles (Couvét 2002; Theodorou and Couvet 2006).

Management should focus on maintaining the integrity of the current population area allowing for the continued, albeit, low level of gene flow across the drainage of the Rio Indequicé. Maintenance of current population numbers is critical to ensure no loss of unique alleles or reduction in overall genetic diversity. With the recent paving of the road (Highway MG 010) and the increased visitation pressure this places on the area it will be important to actively limit any future development which could serve to disrupt the contiguous natural vegetation and corresponding gene flow. Of more pressing concern is the need to address the potential of alien species establishment due to migration along the road corridor and assess the effects that this might have on the survival of *C. cereifera*. Continued monitoring of the population sizes of *C. cereifera* is critical to determine if any demographic changes as a result of the increased disturbance in the area are occurring. Further research into two additional aspects of the biology of *C. cereifera* would additionally be warranted, 1) increased understanding of the relationship among pollinator behavior, plant breeding

system and the maintenance of genetic diversity and 2) elucidating the evolutionary history of the species to determine if the species has a relatively recent origin or if the current levels of diversity are the result of a past bottleneck effect.

### **Acknowledgments**

We thank K Paige and T Holtsford for comments on earlier drafts of this manuscript. We thank LC Resende for field work and laboratory assistance. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (30.9633/2007-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (CRA 697/06) and Planta Tecnologia Ambiental. Permitting to transport biological material from Brazil was granted by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis, CITES/FLORA - (license number 07BR000321/DF). This study was completed in partial fulfillment of the masters degree of R.G.M. at the Universidade Federal de Minas Gerais.

### **References**

- Aldrich PR, Hamrick JL, Chavarriaga-Aguirre P, Kochert G (1998) Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Mol Ecol* 7: 933–944.
- Araújo ED, Costa M, Chaud-Netto J, Fowler HD (2004) Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): Inference of flight range and possible ecological implications. *Braz J Biol* 64:563-568.
- Biodiversitas (2007) Revisão das Listas das Espécies da Flora e da Fauna ameaçadas de Extinção do Estado de Minas Gerais. In: Fundação Biodiversitas (ed), Belo Horizonte, pp 1–47. Available at: [http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/RelatorioListasmg\\_Vol2.pdf](http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/RelatorioListasmg_Vol2.pdf). Accessed Nov 2008.

- Cole CT (2003) Genetic variation in rare and common plants. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34: 213-237.
- Couvet D (2002) Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. *Conserv Biol* 16:369–376.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytoch Bull* 19:11–15.
- Evanno 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.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Furber MS, Wallace LE, Helenurm K (2009) High genetic divergence characterizes populations of the endemic plant *Lithophragma maximum* (Saxifragaceae) on San Clement Island. *Conserv Genet* 10:115–126.
- Gao LZ (2005) Microsatellite variation within and among populations of *Oryza officinalis* (Poaceae), an endangered wild rice from China. *Mol Ecol* 14:4287–4297.
- Giulietti AM, Pirani JR, Harley RM (1997) Espinhaço range region: eastern Brazil. In: Davis SD, Heywood VH, Herrera-MacBryde O, Villa-Lobos J, Hamilton AC (eds.) *Centre of plants diversity: a guide and strategy for their conservation*. World Wildlife Fund/World Conservation Union, Cambridge, pp 397–404.

- Goudet J, Raymond M, de Meeds T, Rousset F (1996) Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144:1933–1940.
- Goudet J (2002) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3.2. Available at <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Hamrick J L, Godt MJ, Murawski DA, Loveless MD (1991) Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk DA, Holsinger KE (eds.) *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, pp 75–86.
- Helenurm K (2001) High levels of genetic polymorphism in the insular endemic herb *Jepsonia malvifolia*. *J Hered* 92:427–432.
- Holtford TP, Hancock JF (1998) Evolution, population genetics and germplasm preservation. *HortScience* 33:3–5.
- Hulbert SH (1971) The non-concept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* 52:577–586.
- Jacobi CM, Carmo FF, Vincent RC, Stehmann JR (2007) Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biod Conserv* 16:2185–2200.
- Kang M, Wang J, Huang H (2008) Demographic bottlenecks and low gene flow in remnant populations of the critically endangered *Berchemiella wilsonii* var. *pubipetiolata* (Rhamnaceae) inferred from microsatellite markers. *Conserv Genet* 9:191–199.

- Leimu R, Mutikainen P, Koricheva J, Fischer M (2006) How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *J Ecol* 94: 942–952.
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann Rev Ecol Syst* 15:65–95.
- Madeira JA, Fernandes GW (1999) Reproductive phenology of sympatric taxa of *Chamaecrista* (Leguminosae) in Serra do Cipó, Brazil. *J Trop Ecol* 15:463–479.
- Mantel NA (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27:209–220.
- Moreira RG, McCauley RA, Cortés-Palomec AC, Lovato MB, Fernandes GW, Oyama K (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae), an endangered species endemic to the Serra do Cipó, Brazil. *Mol Ecol Res* 8:854–857.
- Moritz C (1994) Defining “evolutionarily significant units” for conservation. *TREE* 9:373–375.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB and Kent J (2000) Biodiversity hot spots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858.
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol* 13:1143–1155.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295.

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S (1997) The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann Bot* 80:223–230.
- Ribeiro KT, Fernandes GW (1999) Geographic distribution of *Coccoloba cereifera* Schw. (Polygonaceae), a narrow endemic plant from Serra do Cipó, Brazil. *Bios* 7:7–12.
- Ribeiro KT, Fernandes GW (2000) Patterns of abundance of a narrow endemic species in a tropical and infertile montane habitat. *Plant Ecol* 147:205–218.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
- Silva CA, Cano MAO, Vieira MF, Fernandes GW (2008) Trioecy in *Coccoloba cereifera* Schwacke (Polygonaceae), a narrow endemic and threatened tropical species. *Braz Arch Biol Technol* 51:1003–1010.
- Theodorou K, Couvet D (2006) Genetic load in subdivided populations: interactions between the migration rate, the size and the number of subpopulations. *Heredity* 96:69–78.
- Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1993) Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133:737–749.
- Viana LR, Fernandes GW, Silva CA (2005) 'Ecological road' threatens endemic Brazilian plant with extinction. *Plant Talk* 41:15.



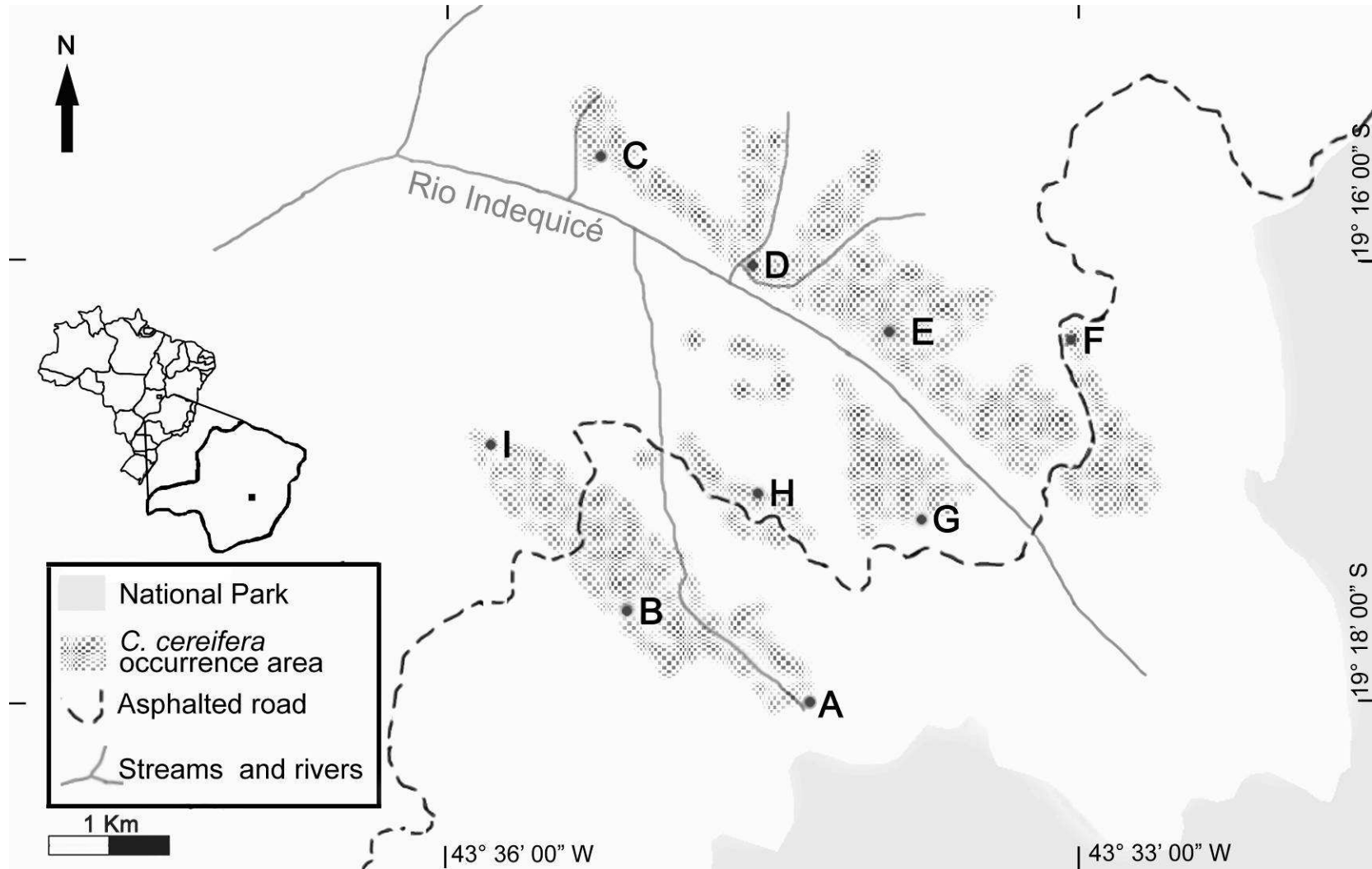
Wang L, Guo J, Zhao GF (2006) Genetic diversity of the endangered and endemic species *Psathyrostachys huashanica* natural populations using simple sequence repeats (SSRs) markers. *Biochem Syst Ecol* 34:310–318.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.

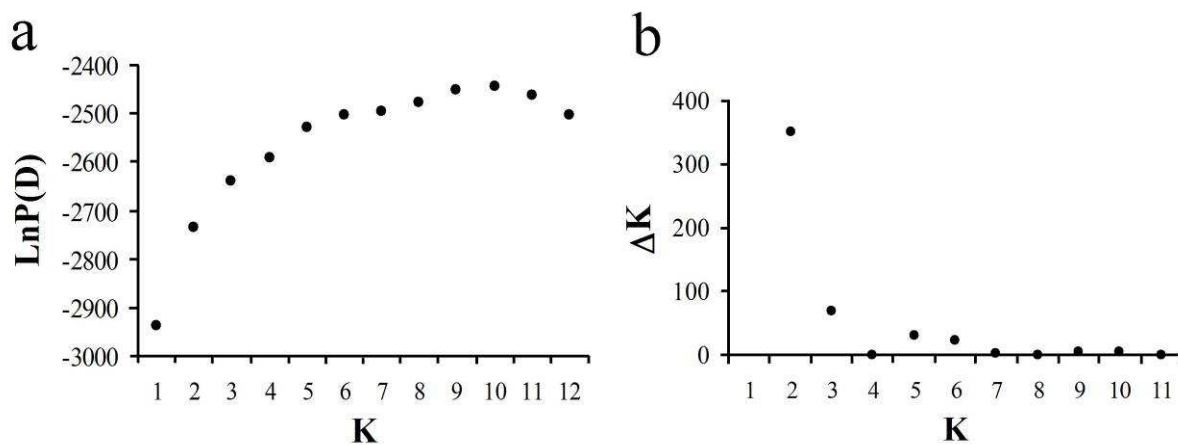
Willi Y, Van Buskirk J, Hoffmann AA (2006) Limits to the adaptive potential of small populations. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 37: 433–458.

Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28:114–1.

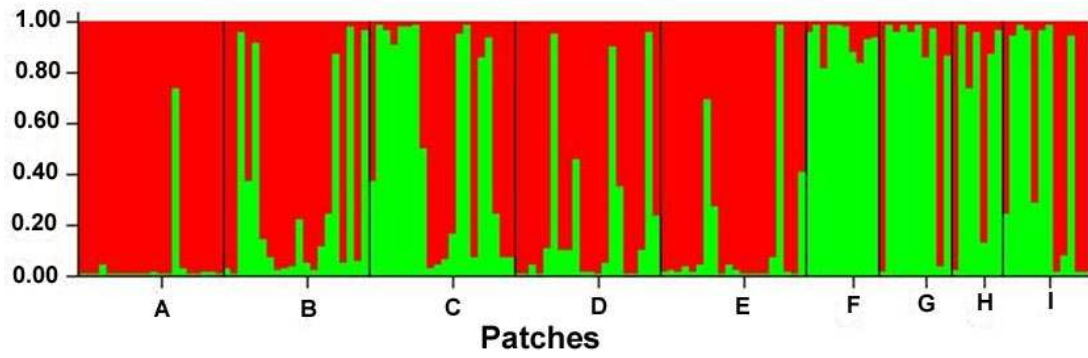
Fig. 1 Location of sample patches taken across the range of *Coccoloba cereifera*



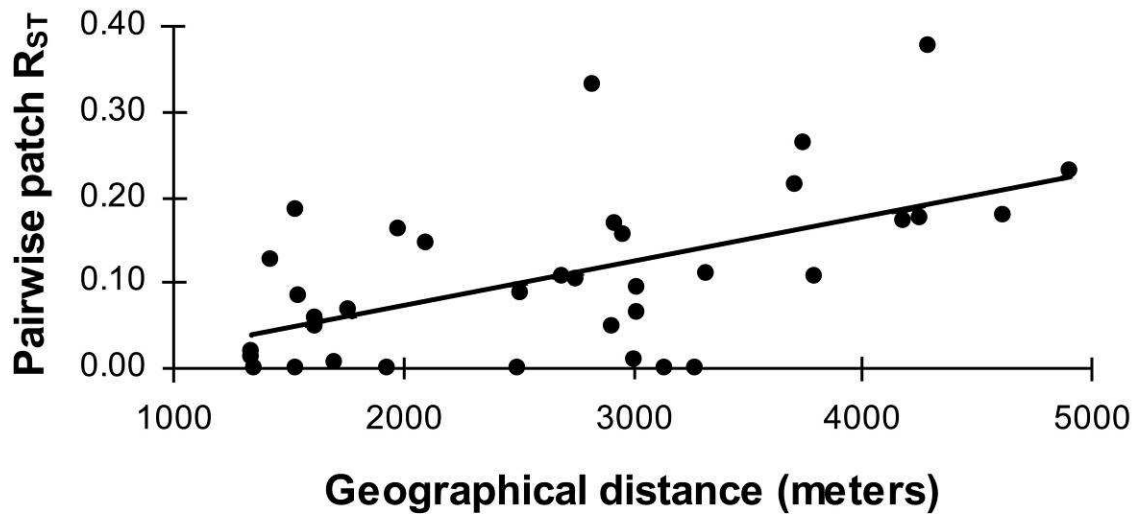
**Fig. 2** Analyses of STRUCTURE results for the determination of unique clusters within the distribution range of *Coccoloba cereifera*. **a.** Average log probability of data  $\text{LnP}(D)$  for each  $K$  of 10 independents runs, showing ten as the likely number of populations. **b.** Average  $\Delta K$  for each  $K$  of 10 independents runs, showing two as the likely number of populations



**Fig. 3** Bars plot representing each individual estimated membership fraction in two inferred clusters within the distribution of *Coccoloba cereifera*. The locations of patches A-I are indicated in Fig. 1.



**Fig. 4** Relationship between patch pairwise  $R_{ST}$  and geographical distance in meters among sampled patches of *Coccoloba cereifera* (Mantel test of correlation,  $r^2 = 0.31$ ,  $p < 0.002$ )



**Table 1** Genetic diversity and population structure at the individual locus level for each of 13 microsatellite loci across 139 *Coccoloba cereifera* individuals.

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>A</i> <sup>a</sup>	<i>H<sub>E</sub></i> <sup>b</sup>	<i>H<sub>O</sub></i> <sup>c</sup>	<i>F<sub>IS</sub></i> <sup>d</sup>	<i>F<sub>ST</sub></i> <sup>d</sup>	<i>F<sub>IT</sub></i> <sup>d</sup>	<i>R<sub>ST</sub></i>
<i>Coc-1</i>	135	5	0.618	0.644	-0.289	0.211*	-0.017	0.265*
<i>Coc-2</i>	132	5	0.454	0.326	0.235	0.070*	0.289*	0.088*
<i>Coc-4</i>	133	7	0.564	0.534	-0.082	0.140*	0.070	0.135*
<i>Coc-5</i>	132	4	0.691	0.894	-0.407	0.089*	-0.282	0.018*
<i>Coc-6</i>	120	3	0.506	0.450	0.038	0.087	0.121	0.089
<i>Coc-7</i>	115	4	0.519	0.426	0.125	0.070	0.186	0.064
<i>Coc-9</i>	137	2	0.196	0.219	-0.252	0.118*	-0.104	0.118*
<i>Coc-10</i>	138	3	0.326	0.304	0.002	0.073*	0.075	0.075*
<i>Coc-12</i>	113	6	0.518	0.354	0.134	0.232*	0.336*	0.191*
<i>Coc-15</i>	134	2	0.408	0.388	-0.069	0.122*	0.062	0.123*
<i>Coc-16</i>	135	10	0.663	0.481	0.175	0.135*	0.286*	-0.010*
<i>Coc-17</i>	119	4	0.649	0.672	-0.119	0.084*	-0.025	0.065*
<i>Coc-18</i>	135	3	0.484	0.533	-0.256	0.137*	-0.084	0.141*
<i>Multilocus values</i>			0.507	0.479	-0.061	0.123*	0.070*	0.105*

<sup>a</sup> alleles per locus

<sup>b</sup> expected heterozygosity

<sup>c</sup> observed heterozygosity

<sup>d</sup> calculated using the estimation procedure of Weir and Cockerham (1984)

\*significant ( $p < 0.0004$ ) following a Bonferroni correction

**Table 2** Characteristics of nine patches of *Coccoloba cereifera* based on 13 microsatellite loci

<i>Patches</i>	$N^a$	$A (SD)^b$	$A_r^c$	$H_E^d$	$H_O^e$
<i>Patch A</i>	20	2.92 (0.86)	2.32	0.406	0.484
<i>Patch B</i>	20	3.08 (1.04)	2.66	0.485	0.519
<i>Patch C</i>	20	2.38 (0.87)	2.35	0.398	0.482
<i>Patch D</i>	20	2.62 (0.87)	2.55	0.472	0.504
<i>Patch E</i>	20	2.92 (1.04)	2.67	0.445	0.429
<i>Patch F</i>	10	2.15 (0.90)	2.23	0.324	0.337
<i>Patch G</i>	10	2.54 (0.88)	2.65	0.537	0.529
<i>Patch H</i>	7	2.92 (1.12)	3.04	0.566	0.495
<i>Patch I</i>	12	2.77 (0.83)	2.82	0.514	0.489
<i>Mean values</i>	15.4	2.7	2.64		

<sup>a</sup> number of individuals sampled

<sup>b</sup> average number of alleles; *SD*, standard deviations

<sup>c</sup> allelic richness

<sup>d</sup> expected heterozygosity

<sup>e</sup> observed heterozygosity

**Table 3** Pairwise  $R_{ST}$  (above diagonal) and geographical distances (meters, below diagonal) between patches of *Coccoloba cereifera*.

	<i>Patch A</i>	<i>Patch B</i>	<i>Patch C</i>	<i>Patch D</i>	<i>Patch E</i>	<i>Patch F</i>	<i>Patch G</i>	<i>Patch H</i>	<i>Patch I</i>
<i>Patch A</i>	--	0.048*	0.232*	0.215*	0.093*	0.263*	0.069*	0.057	0.048*
<i>Patch B</i>	1614	--	0.109*	0.064*	0.010	0.175*	0.000	0.013	0.000
<i>Patch C</i>	4898	3792	--	0.084*	0.156*	0.378*	0.172*	0.109*	0.103*
<i>Patch D</i>	3709	3018	1543	--	0.126*	0.331*	0.092*	0.076*	0.069*
<i>Patch E</i>	3023	3010	2960	1419	--	0.185*	0.000	0.008	0.000
<i>Patch F</i>	3740	4254	4293	2820	1526	--	0.161*	0.169*	0.179*
<i>Patch G</i>	1756	2494	4177	2696	1527	1985	--	0.019	0.000
<i>Patch H</i>	1613	1337	3318	2102	1705	2923	1335	--	0.000
<i>Patch I</i>	2908	1352	2750	2507	3134	4611	3266	1933	--

\* Statistically different from zero after 999 permutations,  $p < 0.05$ .



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho consolidou a metodologia de construção de bibliotecas enriquecidas como um processo efetivo, rápido e de custo relativamente baixo para o isolamento de microssatélites. Várias colônias positivas para a presença de inserto foram obtidas. Dentre estas, houve a necessidade de seqüenciar apenas 96 clones para que se fosse obtido um número satisfatório de regiões com microssatélites. Repetições compostas por dinucleotídeos foram encontradas com maior freqüência (14 microssatélites). Devido à maior abundância desses microssatélites nos genomas de plantas (Lagercrantz et al. 1993; Tóth et al. 2000) esse resultado é de certa forma esperado. Repetições de tri e tetranucleotídeos também estiveram presentes, porém em menores frequências (nove e três microssatélites, respectivamente). Das 26 regiões de microssatélites encontradas, aproveitou-se 23 fragmentos para o desenho de *primers*, dos quais 22 foram amplificados com sucesso. Levando-se em consideração as diferenças de abundância de microssatélites entre as espécies, o rendimento obtido para *Coccoloba cereifera* (caracterizado como a relação entre o número de fragmentos seqüenciados e o número de regiões com microssatélites) foi de 27%, valor considerado satisfatório e em conformidade com os resultados de trabalhos recentes (Cuc et al. 2008; Fatemi & Gross 2008; Ohtani et al. 2008; Ramakrishnan et al. 2008).

Foram realizados testes no programa Micro-checker (Oosterhout et al. 2004), que evidenciassem a ocorrência de alelos nulos, “*stutter*” e “*dropout*”. Os resultados obtidos para os 13 locos testados indicaram que apenas os locos coc-2 e coc-12 possuem indícios de alelos nulos enquanto o loco coc-16 apresentou indícios de alelos nulos e “*stutter*”. Levando-se em conta a possibilidade da ocorrência de resultados superestimados relacionados à existência de alelos nulos (Medeiros 2006) e que poucos locos apresentaram evidência de erros, os resultados do processo de isolamento e caracterização podem ser considerados satisfatórios. Porém, ainda são necessárias análises mais detalhadas para garantir que estudos futuros sejam mais precisos. Uma medida a ser tomada seria a identificação por seqüenciamento de cada um dos alelos obtidos, para que se possa caracterizar com precisão o tamanho de cada um deles.

A caracterização dos locos microssatélites desenvolvidos para *C. cereifera* foi realizada com sucesso. Trinta e nove indivíduos foram genotipados com os 22 *primers* que produziram produtos de PCR nos testes de amplificação. Treze locos apresentaram polimorfismo, revelando números reduzidos de alelos. Apesar de pouco polimórficos, os microssatélites desenvolvidos indicaram alto índice de probabilidade combinada de identidade genética ( $1,092 \times 10^{-42}$ ) e alto poder combinado de exclusão de paternidade

(0,988) (para maiores detalhes veja Chakravarat & Li 1983 e Weir 1996), credenciando-os como marcadores úteis para análises genéticas.

Os marcadores foram utilizados com sucesso no estudo de estrutura genética. Os níveis moderados de diversidade encontrados podem indicar um importante papel desempenhado pelo complexo sistema reprodutivo da espécie. Estudos futuros poderão avaliar de forma mais precisa as conseqüências genéticas que esse sistema de reprodução mista traz para a diversidade mantida em *C. cereifera*.

Apesar de descartar ameaças genéticas imediatas à sobrevivência de *C. cereifera*, é importante ressaltar que os marcadores genéticos utilizados neste estudo são teoricamente neutros, ou seja, talvez não reflitam fielmente o comportamento genético dos locos relacionados a características importantes, sobre as quais a seleção natural atua. Portanto, os resultados obtidos com marcadores neutros podem não refletir possíveis incapacidades genéticas que ameaçariam a sobrevivência da espécie. Por outro lado, o presente estudo enfatizou que o contexto ecológico, evolutivo e geográfico de *C. cereifera* possui grande importância como estímulo aos esforços necessários à sua conservação e manutenção. Apesar da pequena área de ocorrência de *C. cereifera* aumentar a susceptibilidade à sua manutenção, tal limitação também credencia a espécie como modelo para estudos mais complexos. Sua área de distribuição restrita facilita o monitoramento e controle de diversos experimentos, principalmente os que necessitam de coletas periódicas de dados e os que requerem o controle de um grande número de parâmetros bióticos e abióticos.

Ademais, este estudo forneceu novas perspectivas para o melhor entendimento da dinâmica de fluxo gênico e das interações entre os indivíduos de *C. cereifera* dentro de um contexto geográfico. Para tanto, além da obtenção de dados de posicionamento espacial mais precisos, estudos de avaliação das interações ecológicas da espécie com o ambiente físico e biológico são indispensáveis, bem como estudos sobre os processos de polinização e dispersão das sementes.

Portanto, o desenvolvimento de marcadores microssatélites e a sua utilização bem sucedida forneceram um suporte eficiente para que estudos genéticos sejam iniciados. A caracterização dessa ferramenta e os resultados obtidos no presente trabalho poderão contribuir para um melhor entendimento da dinâmica biológica de *C. cereifera*, enriquecendo análises ecológicas e evolutivas posteriores.

## REFERÊNCIAS

Asa C. Miller P, Agnew M, Rebolledo JAR, Lindsey SL, Callahan M & Bauman K (2007). Relationship of inbreeding with sperm quality and reproductive success in Mexican gray wolves. *Animal Conservation*, 10:326–33.

Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J (2001). Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers *American Journal of Botany* 88:419-428.

Brandbyge J (1990). The diversity of micromorphological features in the genus *Coccoloba* (Polygonaceae). *Nordic Journal of Botany*, 10:25-44.

Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips H, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR (1993). Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC) n microsatellite markers. *American Journal of Human genetics*, 52: 922-927.

Cavallari MM, Forzza RC, Veasey EA, Zucchi MI & Oliveira GCX (2006). Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from Cadeia do Espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. *Biodiversity and Conservation* 15:4357–4373.

Chakraborty R, De Andrade M, Daiger SP, Budowle B (1992). Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*, 56:45–57.

Chakravarat I & Li CC (1983). **The effect of linkage on paternity calculations.** pp. 41 1-420. In: *Inclusion Probabilities in Parentage Testing*, Edited by R. H. Walker. American Association of Blood Banks, Arlington, Va.

Ciampi AV, Brondani, RPV, Grattapaglia, D (2000). Desenvolvimento de marcadores microsatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba) Leguminosae – Caesalpinioideae e otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa*, 16:1-40.

Ciampi AY, Azevedo VCR, Gaiotto FA, Ramos ACS, Lovato MB (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. *Molecular Ecology Resources*, 8:1074-1077.

Clark JM (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 16:9677-9686.

Collevatti RG; Brondani RPV; Grattapaglia D (1999). Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*, 83:748-756.

Cuc LM, Mace ES, Crouch JH, Quang VD, Long TD & Varshney RK (2008). Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea*). *BMC Plant Biology*, 8:55.

Depeiges A (1995). Identification of the most represented repeated motifs in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 91:160-168.

Fatemi M, Gross CL (2008). Development and characterization of microsatellite markers for lippia (*Phyla canescens*: Verbenaceae). *Molecular Ecology Resources* 8:1338–1339.

Frankham R (1995). **Inbreeding and Extinction: A Threshold Effect**. *Conservation Biology*, 9:792-795.

Frankham R, Ballou JD & Briscoe DA (2002). **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press.

Frankham R (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126:131-140.

Galeuchet DJ, Perret C, Fischer M (2005). Microsatellite variation and structure of 28 populations of the common wetland plant, *Lychnis flos-cuculi* L., in a fragmented landscape. *Molecular Ecology*, 14:991–1000.

Gilpin ME, Soulé ME (1986). Minimum viable populations: process of species extinction. In: **Conservation Biology, the Science of Scarcity and Diversity** (ed. Soulé ME), pp. 19 – 34. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Giulietti AM, Menezes NL, Pirani JR, Meguro M & Wanderley MGL (1987). Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista das espécies. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 9:1-151.

Giulietti AM, Pirani JR, Harley RM (1997). **Espinhaço range region: eastern Brazil.** In: Davis SD, Heywood VH, Herrera-MacBryde O, Villa-Lobos J, Hamilton AC (Eds), *Centre of plants diversity: a guide and strategy for their conservation*. World Wildlife Fund/World Conservation Union, Cambridge, pp. 397-404.

Gomes V, Collevatti RG, Silveira FAO, Fernandes GW (2004). The distribution of genetic variability in *Baccharis concinna* (Asteraceae), an endemic, dioecious and threatened shrub of rupestrian fields of Brazil. *Conservation Genetics* 5:157–165.

Groombridge J (2007). Genetics and extinction of island endemics: the importance of historical perspectives. *Animal Conservation*, 10:147–148.

Hauge XY, Litt M (1993). A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Human Molecular Genetics* 2:411-415.

Howard RA (1961). Studies in the genus *Coccoloba*, X. New species and a summary of distribution in South America. *Journal of the Arnold Arboretum*, 42:87-95.

Hu G (1993). DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA and Cell Biology*, 12:763-770.

Jacobi CM, Carmo FF, Vincent RC & Stehmann JR (2007). Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodiversity and Conservation*, 16:2185-2200.

Jarne P & Lagoda PJJ (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11:424-429.

Jeffreys AJ, Murray J, Neumann R (1998). High-resolution mapping of crossovers in human sperm defines a minisatellite-associated recombination hotspot. *Molecular Cell*, 2:267-273.

Jesus FF, Solferini VN, Semir J, Prado PI (2001). Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 226:59-68.

Jesus FF, Abreu AG, Semir J, Solferini VN (2009). Low genetic diversity but local genetic differentiation in endemic *Minasia* (Asteraceae) species from Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 277:187–196.

Kashi Y & Soller M (1999). Functional Roles of Microsatellites and Minisatellites. In: **Microsatellites: Evolution and Applications**. Edited by Goldstein and Schlotterer. Oxford University Press.

Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L (1993). The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 21:1111-1115.

Lian C, Wadud MA, Geng Q, Shimatani K, Hogetsu T (2006). An improved technique for isolating codominant compound microsatellite markers. *Journal of Plant Research*, 119:415–417.

Litt M, Hauge X; Sharma, V (1993). Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. *Biotechniques*, 15:280–284.

Luikart G & England PE (1999). Statistical analysis of microsatellite data. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 253-256.

Machado RB, Ramos Neto MB, Pereira P, Caldas E, Gonçalves D, Santos N, Tabor K & Steininger M (2004). **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Conservation International do Brasil, Brasília.

Madeira JA, Fernandes GW (1999). Reproductive phenology of sympatric taxa of *Chamaecrista* (Leguminosae) in Serra do Cipó, Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 15: 463-479.

Medeiros, ACB (2006). Desenvolvimento, caracterização e erros de genotipagem para locos microssatélites de *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). Dissertação Mestrado, Brasília: UCB, 109p.

Medina BMO & Fernandes GW (2007). Natural regeneration potential of rupestrian fields soils in Serra do Cipó, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, 30:665-678.

Melo E (2004). As espécies de *Coccoloba* P. Browne (Polygonaceae) da Amazônia brasileira. *Acta Amazônica*, 34:525 – 551.

Morellato LPC & Haddad CFB (2000). Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica*, 32:786-792.

Morgante M, Olivieri AM (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, 3:175-182.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB & Kent J (2000). Biodiversity hot spots for conservation priorities. *Nature*, 403:853-858.

Nielsen LR, Siegismund HR, Hansen T (2007). Inbreeding depression in the partially self-incompatible endemic plant species *Scalesia affinis* (Asteraceae) from Galápagos islands. *Evolution Ecology*, 21:1–12.

Ohtani M, Tani N & Yoshimaru H (2008). Development and characterization of microsatellite markers for *Hibiscus glaber* Matsum. ex Nakai, an endemic tree species of the oceanic Bonin Islands, Japan. *Molecular Ecology Resources* 8:1316–1318.

Oosterhout CV, Hutchinson W, Wills D, Shipley P (2004). Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4:535–538.

Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barrett JA (1995). Nonamplifying alleles at microsatellite *loci*: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4:249-252.

Pereira AC, Borba EL, Giulietti AM (2007). Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 153:401–416.

Powell W, Machra GC, Provan J (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1:215-222.

Ramakrishnan AP, Rosenthal DM, Musial T & Cruzan MB (2008). Isolation and characterization of nine microsatellite markers for *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) Beauv., a recently invasive grass species in Oregon. *Molecular Ecology Resources* 8:1297–1299.

Ratter JA, Ribeiro JF & Bridgewater S (1997). The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, 80:223-230.

Reed DH, Briscoe DA & Frankham R (2002) Inbreeding and extinction: The effect of environmental stress and lineage. *Conservation Genetics*, 3:301–307.

Ribeiro KT & Fernandes GW (1999). Geographic distribution of *Coccoloba cereifera* Schw. (Polygonaceae), a narrow endemic plant from Serra do Cipó, Brazil. *Bios*, 7:7-12.

Ribeiro KT, Fernandes GW (2000). Patterns of abundance of a narrow endemic species in a tropical and infertile montane habitat. *Plant Ecology*, 147:205-218.

Ribeiro RA, Rezende MFS, Resende LC, Lemos-Filho JP, Kalapothakis E, Lovato MB (2008)a. Development of polymorphic microsatellite markers for *Dalbergia nigra* (Papilionoideae), an endangered tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology Resources*, 9:203-206.

Ribeiro PL, Borba EL, Smidt E de C, Lambert SM, Schnadelbach AS, Berg C. van den (2008)b. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution* 270:109–137.

Rizzini CT (1979). **Tratado de fitogeografia do Brasil**. Vol. 2. Hucitec/EDUSP, São Paulo.

Rizzini CM (1986). Contribuição ao estudo do gênero *Coccoloba* (Polygonaceae). Espécies Campestres. Rio de Janeiro: Universidade do Rio de Janeiro. Tese de mestrado. 116p.



Silva RM da, Fernandes GW, Lovato MB (2007). Genetic variation in two *Chamaecrista* species (Leguminosae), one endangered and narrowly distributed and another widespread in the Serra do Espinhaço, Brazil. *Canadian Journal of Botany*, 85:629–636.

Silva CA, Cano MAO, Vieira MF, Fernandes GW (2008). Trioecy in *Coccoloba cereifera* Schwacke (Polygonaceae), a narrow endemic and threatened tropical species. *Braz Arch Biol Technol* 51:1003-1010.

Smith JR, Carpten JD, Brownstein MJ, Ghosh S, Magnuson VL, Gilbert DA, Trent JM, Collins FS (1995). Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA-polymerase. *Genome Research*, 5:312–317.

Sobel E, Papp JC, Lange K (2002). Detection and Integration of Genotyping Errors in Statistical Genetics. *American Journal of Human Genetics*, 70:496–508.

to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biology*, 12:763-770.

Spielman D, Brook BW & Frankham R (2004). Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 101:15261–15264.

Strand M, Prolla TA, Liskay RM & Petes TD (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 365:274-276.

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

Tachida H, Lizuka M (1992). Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics* 131:471–478.

Tautz T, Trick M & Dover GA (1986). Cryptic simplicity in DNA is a major source of DNA variation. *Nature (London)* 332:652-658.

Tóth G, Gaspariz Z, Jurka J (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes; survey and analysis. *Genome Research* 10:967–981.

Thuillet AC, Bataillon T, Poirier S, Santoni S & David JL (2005). Estimation of long-term effective population sizes through the history of durum wheat using Microsatellite data. *Genetics*, 169:589-1599.

Viana LR, Fernandes GW, Silva CA (2005). 'Ecological road' threatens endemic Brazilian plant with extinction. *Plant Talk*, 41:15.

Wattier R, Engel CR, Saumitou-Laprade P, Valero M (1998). Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite *loci*: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, 7:1569-1573.

Weber JL (1990). Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>.(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, 7:524-530.

Weir JL (1996). **Genetic data analysis** Sunderland, MA: Sinauer Associates.

## ANEXO I

**Figura 1.** Indivíduo de *Coccoloba cereifera***Figura 2.** Inflorescência de *C. cereifera***Figura 3.** Indivíduos de *C. cereifera*

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)