

Fábio Pinheiro

**Estrutura genética de zonas de hibridação
natural entre *Epidendrum fulgens* e *E.
puniceoluteum* (Orchidaceae)**

**Genetic structure of natural hybrid zones
between *E. fulgens* and *E. puniceoluteum*
(Orchidaceae)**



**São Paulo
2009**

Fábio Pinheiro

Estrutura genética de zonas de hibridação
natural entre *Epidendrum fulgens* e *E.*
puniceoluteum (Orchidaceae)

Genetic structure of natural hybrid zones
between *E. fulgens* and *E. puniceoluteum*
(Orchidaceae)

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Botânica.

Orientador: Dr. Fábio de Barros

São Paulo

2009

P 654e

Pinheiro, Fábio

Estrutura genética de zonas de
hibridação natural entre *Epidendrum*
fulgens e *E. puniceoluteum*

(Orchidaceae) / Fábio Pinheiro. – São
Paulo : F. P. , 2009.

101p. : il.

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo. Departamento de Botânica, 2009.

1. Orchidaceae - Evolução 2.

Orchidaceae - Hibridação 3.

Microsatélites 4. *Epidendrum*. I.

Universidade de São Paulo. Instituto de
Biotecnologia. Departamento de Botânica.

LC QK 495.o64

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Fábio de Barros

Orientador(a)

À minha família,
com todo meu amor,
respeito e admiração

“How many generations are necessary for one species or race to absorb another by repeated crosses has often been discussed; and the requisite number has probably been much exaggerated ... with plants, one species could be made to absorb another in from three to five generations...”

“With respect to the influence of the conditions of life on any two breeds which are allowed to cross freely...they will, in all probability, be unequally affected by the conditions, and this will modify the result.”

“There can be no doubt that crossing, with the aid of rigorous selection during several generations, has been a potent means in modifying old races, and in forming new ones.”

“...nature opposes no barrier to successful admixture; in the course of time, by the aid of selection and careful weeding, it is practicable to establish a new breed.”

“The crossing of distinct forms, which have already become variable, increases in the offspring the tendency to further variability, by the unequal commingling of the characters of the two parents, by the reappearance of long-lost characters, and by the appearance of absolutely new characters.”

“If we assume that each particular variation was from the beginning of all time preordained, then that plasticity of organisation, which leads to many injurious deviations of structure, as well as the redundant power of reproduction which inevitably leads to a struggle for existence, and, as a consequence, to the natural selection or survival of the fittest, must appear to us superfluous laws of nature. On the other hand, an omnipotent and omniscient Creator ordains everything and foresees everything. Thus we are brought face to face with a difficulty as insoluble as is that of free will and predestination.”

C.R. Darwin

The variation of animals and plants under domestication.
Volume 2, segunda edição.
John Murray, London. 1875.

Agradecimentos

Este trabalho só foi possível graças à ajuda de muitas pessoas, que me auxiliaram das mais diferentes formas. A ordem em que os nomes aparecem nada significa, todos são importantes, de todos eu lembrarei com carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estágio de doutorado no exterior. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao CNPq pelo financiamento do projeto, através de auxílio à pesquisa concedido ao Dr. Fábio de Barros. A realização do estágio no Jodrell Laboratory, Kew Gardens, só foi possível com o financiamento concedido pelo Prance Fellowship in Neotropical Botany, dentro do programa Kew Latin American Research Fellowship Programme (KLARF).

Ao Dr. Diogo Meyer, Dra. Lúcia G. Lohmann, Dra. Anete P. Souza, Dr. Michel Vincentz, Dr. Antonio Salatino, Dr. Salvatore Cozzolino, Dr. Christian Lexer e Dr. Mike Fay por terem acreditado no meu projeto e me auxiliado em etapas bastante importantes do trabalho.

Ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências – USP e às seções de Orquidário do Estado e de Curadoria do Herbário do Instituto de Botânica, por terem oferecido as condições necessárias para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Dr. Eduardo L.M. Catharino por ter apoiado este trabalho e permitido o acesso à coleção de orquídeas localizada na Seção de Orquidário do Estado, no Instituto de Botânica.

A realização deste trabalho recebeu a contribuição de muitas pessoas, seja nas etapas iniciais onde dados ainda não existiam, seja quando o volume de dados não me permitia entender o significado de tudo aquilo. Agradeço a Clarisse Palma da Silva, Melissa O. Santos, Juliana Lovo, Richard C. Winkworth, Mourisa M. S. Ferreira, Rebeca P. Romanini, Camila M. Zanella, Gecele M. Paggi, Daniela Fuhro, Robberson B. Setúbal, Rodrigo B. Singer, Jorge L. Waechter, Samantha Koehler, Rosana P. Perez, Romário Chaves, Andréia M. Corrêa, Rogério M. Suzuki.

Durante minha permanência no exterior, muitas pessoas me ajudaram, seja com amizade ou com apoio no laboratório, e queria expressar aqui minha sincera

gratidão. À Valentina Tranchida, Giovanni Scopece, Marta Michalik, Rosita Rinaldi, Nicola Juillet, Elizabeth Balloch, Gerhard Prenner, Amélia Baracat, Dion Devey, Nicolas Rush, Maria Kaye, Benedetta Bernardini, Edith Kapinos, Robin Collins, Ethan, Phylipp Arnold, e a todos que me ajudaram a seguir adiante em terras distantes.

Agradeço muito ao meu orientador, Dr. Fábio de Barros, por me mostrar a seriedade e o rigor de sua forma de trabalhar com orquídeas, por me ensinar muito e, principalmente, por ter acreditado em mim em todos estes anos, me apoiando com muita coragem em projetos que, muitas vezes, pareciam impossíveis. Espero poder ter sua colaboração em projetos futuros.

À minha família, que durante toda minha vida, foi uma grande “Fundação de Amparo à Pesquisa”!!! Com ela, conquistei tudo aquilo que parecia impossível, incerto, distante, difícil e complicado. Sempre recebi um apoio tão generoso e sincero, que o caminho a ser trilhado, por mais tortuoso que fosse, sempre foi vencido. Palavras não são suficientes para expressar toda minha gratidão, por isso espero que meus atos estejam a altura de todo amor e carinho que sempre recebi. Ivana, Carlos, Marcos e Clarisse, dedico este trabalho a vocês.

Índice

Introdução Geral	A importância de marcadores moleculares na caracterização dos processos evolutivos em populações naturais de orquídeas.....	01
Capítulo 1.	Isolation and characterization of microsatellite loci in the Brazilian orchid <i>Epidendrum fulgens</i>	13
Capítulo 2.	Isolation and characterization of microsatellite loci in <i>Epidendrum puniceoluteum</i> , an endemic orchid from the Atlantic Rainforest.....	19
Capítulo 3.	Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus <i>Epidendrum</i>	25
Capítulo 4.	Chloroplast microsatellite markers for the Neotropical orchid genus <i>Epidendrum</i> , and cross-amplification in other Laeliinae species (Orchidaceae).....	37
Capítulo 5.	Hybridization and introgression in the Neotropical orchids, <i>Epidendrum fulgens</i> and <i>E. puniceoluteum</i> (Orchidaceae).....	49
Discussão Geral e Conclusões	97
Resumo e Abstract	100

Introdução Geral

A importância de marcadores moleculares na caracterização dos processos evolutivos em populações naturais de orquídeas

O emprego de marcadores moleculares em estudos de evolução na família Orchidaceae

Com cerca de 24.000 espécies, Orchidaceae é a maior família dentre as Angiospermas (WORLD Checklist of the Monocotyledons, 2006). A diversidade da família é proporcional ao número de estratégias evolutivas que podem ser encontradas em diferentes espécies de orquídeas. Uma extensa variação morfológica, diferentes níveis de especialização ao hábitat e síndromes de polinização variadas mostram como a evolução de orquídeas pode ser investigada num contexto multidisciplinar.

O potencial que a família Orchidaceae oferece para a pesquisa e compreensão dos processos evolutivos (diversificação de linhagens, co-evolução, convergência evolutiva, especiação) foi primeiramente reconhecido por Darwin, que dedicou um livro inteiro ao assunto (DARWIN, 1877). Considerando a importância do livro de Darwin, orquídeas deveriam ter sido o sistema biológico preferido dos cientistas para a pesquisa em evolução (PEAKALL, 2007). Porém, orquídeas não receberam a atenção que se esperava da comunidade científica, e muitas lacunas de conhecimento ainda existem (DRESSLER, 1981), especialmente nas regiões tropicais. Para FAY & CHASE (2009), a falta de interesse da comunidade científica sobre orquídeas se deve ao extenso tamanho da família, que dificulta o estabelecimento de relações de parentesco em diversos níveis taxonômicos (subfamílias, subtribos, subgêneros). Este fato inibe o teste de hipóteses evolutivas, uma vez que existe controvérsia na escolha e delimitação dos táxons que serão utilizados no estudo. Porém, famílias botânicas que possuem uma diversidade comparável a Orchidaceae, como Asteraceae e Poaceae, foram intensamente abordadas em estudos de evolução ao longo da história, e possuem um número comparativamente maior de estudos sobre especiação, evolução e mecanismos de isolamento reprodutivo em plantas (PEAKALL, 2007).

Segundo PEAKALL (2007), orquídeas não possuem espécies de interesse agrícola, que sejam intensamente estudadas sob diversos aspectos biológicos, e que possam servir de modelo, para estudos similares com espécies selvagens. Este fato

pode ser constatado pela deficiência de marcadores moleculares específicos desenvolvidos para espécies de orquídeas ao longo dos anos (PEAKALL, 2007), se comparado ao número de marcadores desenvolvidos para famílias que possuem representantes com interesse agrícola. Este fato dificulta o progresso do conhecimento sobre processos evolutivos que ocorrem numa escala populacional, uma vez que para este tipo de trabalho, são necessários marcadores moleculares com um nível de especificidade maior do que aqueles empregados em estudos de filogenias, em níveis taxonômicos superiores.

Em espécies modelo, que possuem interesse comercial, há grande abundância de marcadores moleculares para estudos populacionais, fato que não acontece com Orchidaceae (PEAKALL, 2007). A carência de marcadores moleculares específicos para orquídeas é ainda mais notável na região Neotropical, que contraditoriamente, concentra a maior diversidade de espécies de orquídeas. Se se considerar, por exemplo, o número de trabalhos que isolaram e caracterizaram *loci* de microssatélites nucleares para Orchidaceae, apenas três, dos 15 publicados até o momento, foram realizados com espécies neotropicais (PINHEIRO, 2009). Claramente, um esforço maior deve ser empregado no sentido de tentar diminuir esta diferença, uma vez que as técnicas que permitem o desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para espécies de interesse têm se tornado mais acessíveis nos últimos anos. Trabalhos que medem o potencial de amplificação cruzada destes marcadores também são importantes porque ampliam a utilização de marcadores previamente caracterizados (BÁRBARA *et al.*, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2009).

Mesmo estando em desvantagem, se comparada a outras famílias, marcadores moleculares foram fundamentais para a expansão dos estudos evolutivos em Orchidaceae, principalmente quando integrados a outras áreas do conhecimento como ecologia, morfologia, fisiologia e sistemática (AVISE, 2004; PEAKALL, 2007). A existência de hipóteses filogenéticas baseadas em polimorfismos de DNA foi fundamental para que grupos de táxons fossem reconhecidos num contexto evolutivo (ACETO *et al.*, 1999). Tais filogenias foram utilizadas em estudos subsequentes para testar diversos tipos de hipóteses de diversificação de linhagens e tendências evolutivas, principalmente em gêneros de Orchidaceae provenientes de regiões temperadas. O reconhecimento de processos demográficos históricos de expansão e retração populacional foi fundamental, por exemplo, para o entendimento dos padrões de diversificação dos gêneros *Dactylorhiza* (PILLON *et al.*, 2007) e *Anacamptis*

(COZZOLINO *et al.*, 2003). Eventos de hibridação também começaram a ser investigados e descritos para diversos grupos de orquídeas, revelando que ser, este, um processo bastante comum e difundido em diversos grupos, principalmente em orquídeas polinizadas por engodo (COZZOLINO & WIDMER, 2005).

Trabalhos que formularam hipóteses filogenéticas para grupos de orquídeas neotropicais foram fundamentais para que hipóteses evolutivas de diversificação de linhagens e especiação fossem testadas (KOEHLER *et al.*, 2008; CHASE *et al.*, 2009; VAN DEN BERG *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, no prelo). Porém, enquanto o número de filogenias para orquídeas neotropicais aumenta a cada ano, poucos são os trabalhos que utilizam filogenias pré-existentes como fontes de hipóteses a serem testadas. Deste modo, são raros os trabalhos que empregam marcadores moleculares num contexto multidisciplinar, com o objetivo de esclarecer processos evolutivos que ocorrem numa escala populacional. Como exemplo, pode-se destacar a série de estudos realizados com o gênero *Acianthera*, no qual marcadores moleculares (isoenzimas) foram integrados a dados ecológicos e morfológicos, num contexto multidisciplinar. Os resultados indicaram que a manutenção das barreiras reprodutivas se baseia na existência de polinizadores distintos e específicos para cada espécie de *Acianthera* (BORBA & SEMIR, 2001). A manutenção de elevados níveis de diversidade genética nas populações analisadas (BORBA *et al.*, 2001b) parecem estar correlacionados com a existência de auto-incompatibilidade e depressão por endocruzamento detectada em diversas populações (BORBA *et al.*, 2001a). Além disso, as semelhanças morfológicas entre as espécies não são devidas a similaridades genéticas, mas sim à existência de convergência floral entre espécies que possuem os mesmos polinizadores (BORBA *et al.*, 2002).

A popularização e a expansão do uso de marcadores nucleares e plastidiais em orquídeas, numa escala populacional, é um passo importante rumo à melhor compreensão dos processos que promovem e mantêm o grande número de espécies em Orchidaceae, principalmente em regiões com elevada biodiversidade, como a região Neotropical.

Hibridação em populações naturais de plantas

O estudo de barreiras reprodutivas em grupos de espécies é fundamental para o entendimento dos processos que deram origem às espécies atuais, uma vez que a intensidade de fluxo gênico pode determinar o grau em que populações, linhagens

e/ou espécies se mantêm como unidades coesivas (COYNE & ORR, 2004). Neste contexto, a investigação de zonas de hibridação permite a avaliação da intensidade das barreiras reprodutivas entre espécies, revelando o quanto indivíduos híbridos facilitam, ou não, o fluxo gênico entre os táxons parentais (ARNOLD, 2006). Zonas de hibridação permitem que o sucesso reprodutivo do genótipo híbrido adulto seja avaliado sob condições naturais, o que é muito difícil de conseguir para espécies perenes com geração longa (RIESEBERG & BUERKLE, 2002; LEXER *et al.*, 2003, 2005), como ocorre com muitas orquídeas por exemplo. O processo de hibridação, além de promover fluxo gênico entre espécies previamente isoladas, pode dar origem a novas linhagens e espécies (RIESEBERG, 1997), e pode ser responsável pela radiação adaptativa de diferentes grupos de organismos (SEEHAUSEN, 2004).

Para diversos grupos de plantas, o processo de hibridação possui uma grande conexão com habitats perturbados ou compostos por mosaicos de vegetação que oferecem diferentes condições ecológicas (ARNOLD, 2006). O fato de indivíduos híbridos combinarem elementos genômicos de espécies distintas pode aumentar a amplitude ecológica e a diversidade de habitats que estes indivíduos são capazes de aproveitar (JOHNSTON *et al.*, 2001; SEEHAUSEN, 2004; LEXER *et al.*, 2005). Além disso, eventos de hibridação podem originar indivíduos híbridos capazes de ocupar habitats distintos daqueles ocupados pelas espécies parentais, dando origem a novas espécies (RIESEBERG, 1997; RIESEBERG *et al.*, 2003; ARNOLD, 2006).

As causas e as conseqüências da hibridação natural interespecífica, sob uma perspectiva conservacionista, sugerem que a perda de heterogeneidade de ambientes, devida à ação antrópica, poderia causar a perda da biodiversidade através do aumento do contato entre espécies previamente isoladas, promovendo sua hibridação e introgressão. Este fenômeno foi chamado de “especiação reversa”, e se baseia no princípio da perda de biodiversidade causada pela introgressão entre espécies previamente isoladas, as quais ocorriam em habitats que se encontram em processo de fragmentação e deterioração (SEEHAUSEN *et al.*, 2008). A probabilidade do contato secundário entre populações ou espécies previamente isoladas tem sido alterada constantemente ao longo dos milhares de anos de evolução das espécies, mas recentemente tem aumentado de forma drástica devido ao crescente impacto do homem sobre a natureza.

A hibridação natural na família Orchidaceae é intensamente estudada em grupos de espécies européias, principalmente na região do Mediterrâneo, onde as

zonas híbridas descritas apresentam grande variação na arquitetura genética (COZZOLINO & WIDMER, 2005; COZZOLINO *et al.*, 2006; MOCCIA *et al.*, 2007). No gênero *Ophrys*, no qual se pensava que as barreiras pré-zigóticas eram bastante eficientes devido à alta fidelidade entre o polinizador e a espécie de orquídea polinizada, foram revelados diversos casos de hibridação e introgressão (SOLIVA & WIDMER, 2003; CORTIS *et al.*, 2009). Além disso, existem evidências de que eventos de hibridação em *Ophrys* podem gerar indivíduos que possuem flores capazes de produzir aromas distintos daqueles observados nas espécies parentais (CORTIS *et al.*, 2009), caracterizando um possível evento de especiação. Em outros gêneros, como *Orchis* e *Anacamptis*, a existência de hibridação também é comum, mas é restrita à formação de gerações F1, e a ausência de introgressão é decorrente de intensas barreiras pós-zigóticas (SCOPECE *et al.*, 2007), relacionadas principalmente a diferenças cariotípicas entre as espécies parentais (COZZOLINO *et al.*, 2004).

Na região Neotropical, eventos de hibridação em orquídeas são raramente estudados. Como exceções podem ser citados os trabalhos realizados com *Bulbophyllum* (BORBA & SEMIR, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2006). Considerando que existe uma grande quantidade de híbridos artificiais produzidos para fins comerciais, utilizando espécies neotropicais, o potencial de descoberta e pesquisa de zonas de hibridação em populações naturais é bastante elevado. A disponibilidade de marcadores moleculares capazes de produzir polimorfismos suficientes para detectar e caracterizar a estrutura genética de zonas de hibridação é importante para propiciar maior número de estudos com hibridação em populações naturais. A integração de marcadores moleculares com experimentos de biologia reprodutiva permite avaliar o sucesso reprodutivo das espécies parentais e híbridos, e indica os mecanismos envolvidos na manutenção das barreiras reprodutivas e no surgimento de novas linhagens e/ou espécies (MOCCIA *et al.*, 2007; CORTIS *et al.*, 2009). A interface com outras áreas do conhecimento como morfologia (COZZOLINO *et al.*, 2006), citogenética (COZZOLINO *et al.*, 2004), e ecologia (CRUZAN & ARNOLD, 1993; JOHNSTON *et al.*, 2001) também são fundamentais, uma vez que o processo de hibridação é um fenômeno complexo, e sua pesquisa deve se inserir num contexto multidisciplinar (RIESEBERG & CARNEY, 1998).

Caracterização do sistema biológico de interesse – o gênero *Epidendrum*

Epidendrum L. é o maior gênero da família Orchidaceae na região Neotropical com cerca de 1.500 espécies, e sua distribuição geográfica vai desde o Sul da Flórida até o Norte da Argentina (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005). Como características principais do gênero podem ser ressaltadas a ampla variação morfológica e cromossômica, que dificulta a circunscrição do gênero e de diversos grupos de espécies, mais conhecidos como “complexos” (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005; PINHEIRO *et al.*, no prelo). Hipóteses filogenéticas publicadas por VAN DEN BERG *et al.* (2000) e HÁGSATER & SOTO-ARENAS (2005) indicam que o gênero é monofilético e que os agrupamentos internos correspondem, em grande parte, a grupos previamente reconhecidos com base em caracteres morfológicos descritos em tratamentos taxonômicos históricos (LINDLEY, 1852-1859; BRIEGER, 1976-1977).

O subgênero *Amphiglottium*, descrito primeiramente por LINDLEY (1852-1859), reúne espécies que exibem extensa variação morfológica e cromossômica, e que possuem barreiras reprodutivas fracas, com diversos casos de hibridação descritos na literatura (DUNSTERVILLE, 1979; DRESSLER, 1989; HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005; PANSARIN & AMARAL, 2008; PINHEIRO *et al.*, no prelo). As espécies do grupo também compartilham características ecológicas, como a habilidade de ocupar habitats em que elementos abióticos apresentam situação extrema, como dunas arenosas, afloramentos rochosos e terrenos alagados (HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005). Ambientes originados por ação antrópica, como margens de rodovias e encostas desmatadas, também são frequentemente ocupados por espécies do subgênero *Amphiglottium*, originando populações com características morfológicas distintas daquelas que ocorrem em áreas preservadas (PINHEIRO & BARROS, 2008) e zonas de hibridação entre espécies previamente isoladas (DUNSTERVILLE, 1979; HÁGSATER & SOTO-ARENAS, 2005).

Recentemente PINHEIRO *et al.* (no prelo) formularam uma hipótese filogenética para o subgênero *Amphiglottium* empregando marcadores moleculares nucleares (AFLP) e de cloroplasto (espaçador intergênico *trnL-trnF*). Com base nos resultados obtidos, grupos de espécies reconhecidos na filogenia puderam ser associados à presença de características comuns aos táxons que compõem os respectivos grupos, como caracteres morfológicos (subseção *Tuberculata*, incluindo *E. secundum*, *E. xanthinum* e *E. cochlidium*) e padrões biogeográficos, com espécies distribuídas ao longo da Cordilheira dos Andes e Planalto das Guianas (clado andino,

incluindo *E. calanthum*, *E. ibaguense* e *E. incisum*) e espécies distribuídas ao longo do litoral brasileiro, com ocorrência de populações disjuntas em áreas sob o domínio de Cerrado e Caatinga (clado Atlântico - *E. cinnabarinum*, *E. denticulatum*, *E. fulgens* e *E. puniceoluteum*).

As espécies que compõem o clado Atlântico possuem grande variação morfológica, que torna muitas vezes incerta a delimitação das espécies (PINHEIRO & BARROS, 2006). Além disso, populações podem ser encontradas ao longo de toda a distribuição costeira da Mata Atlântica, desde o Norte do Rio Grande do Sul até o Norte do Rio Grande do Norte, bem como em áreas inseridas em outros biomas, com populações disjuntas em Cerrado e inselbergues de Caatinga. Nas áreas de ocorrência simpátrica já foram relatados casos de hibridação (PINHEIRO & BARROS, 2006; PANSARIM & AMARAL, 2008; PINHEIRO, 2009), mas como este processo afeta a arquitetura genética das espécies ainda é uma questão a ser investigada.

De especial interesse são as populações simpátricas de *E. fulgens* e *E. puniceoluteum*, que se estendem desde o litoral sul de São Paulo até o sul de Santa Catarina. Nestas populações é possível observar diversos indivíduos com características morfológicas intermediárias entre *E. fulgens* e *E. puniceoluteum*, fato que dificulta a identificação de ambas as espécies e abre oportunidades para que a ocorrência de hibridação entre os táxons seja investigada (PINHEIRO & BARROS, 2006).

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- a) Isolar e caracterizar marcadores nucleares e plastidiais para *Epidendrum fulgens* e *E. puniceoluteum*;
- b) Testar a taxa de transferência e utilidade destes marcadores em outras espécies de *Epidendrum* e em outros gêneros de Laeliinae;
- c) Utilizar marcadores nucleares e plastidiais para investigar a ocorrência de hibridação entre *E. fulgens* e *E. puniceoluteum*.

Neste contexto, a composição genética das zonas híbridas, o papel de barreiras reprodutivas pré e pós-zigóticas no isolamento reprodutivo das espécies parentais, o potencial de indivíduos híbridos promoverem fluxo gênico entre as espécies parentais, e a existência de indivíduos híbridos que caracterizem novas linhagens e/ou espécies foram discutidos. Os resultados obtidos com marcadores moleculares também foram discutidos em um contexto ecológico, considerando o papel dos diferentes habitats que as espécies parentais ocupam na manutenção do isolamento reprodutivo.

Referências bibliográficas

- ACETO, S.; CAPUTO, P.; COZZOLINO, S.; GAUDIO, L.; MORETTI, A. Phylogeny and Evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 13, p. 67-76. 1999.
- ARNOLD, M.L. *Evolution through genetic exchange*. New York: Oxford University Press, 2006. 252p.
- AVISE, J.C. *Molecular markers, natural history and evolution, second edition*. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 684p.
- AZEVEDO, C.O.; BORBA, E.L.; VAN DEN BERG, C. Evidence of natural hybridization and introgression in *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F. Barros and *B. weddellii* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil, by using allozyme markers. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 29, p. 415-421. 2006).
- BARBARA, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, M.F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 3759-3767. 2007.
- BORBA, E.L.; SEMIR, J. *Bulbophyllum ×cipoense* (Orchidaceae), a new natural hybrid from the Brazilian 'campos rupestres'. *Lindleyana*, v. 13, p. 113-120. 1998a.
- BORBA, E.L.; SEMIR, J. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany*, v. 88, p. 75-88. 2001.
- BORBA, E.L.; SEMIR, J.; SHEPHERD, G.J. Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany*, v. 88, p. 89-99. 2001a.
- BORBA, E.L.; FELIX, J.M.; SOLFERINI, V.N.; SEMIR, J. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany*, v. 88, p. 419-428. 2001b.
- BORBA, E.L.; SHEPHERD, G.J.; VAN DEN BERG, C.; SEMIR, J. Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Annals of Botany*, v. 90, p. 219-230. 2002.

- BRIEGER, F.G. Gattungsreihe Epidendra. In: BRIEGER, F.G.; MAATSCH, R.; SENGHAS, K. (Org.) *Schlechter Die Orchideen*. Berlin: Paul Parey, 1976–1977. p. 509-549.
- CHASE, M.W.; WILLIAMS, N.H.; FARIA, A.D.; NEUBIG, K.M.; AMARAL, M.C.E.; WHITTEN, W.M. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany*, v. 104, p. 387-402. 2009.
- CORTIS, P.; VERECKEN, N.J.; SCHIESTL, F.P.; BARONE-LUMAGA, M.R.; SCRUGLI, A.; COZZOLINO, S. Pollinator convergence and the nature of species boundaries in sympatric Sardinian *Ophrys* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, v. 104, p. 497-506. 2009.
- COYNE, J.A.; ORR, H.A. *Speciation*. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 545p.
- COZZOLINO, S.; NOCE, M.E.; MUSACCHIO, A.; WIDMER, A. Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetic bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, v. 90, p. 1681-1687. 2003.
- COZZOLINO, S.; D'EMERICO, S.; WIDMER, A. Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 271, p. 259-262. 2004.
- COZZOLINO, S.; WIDMER, A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology & Evolution*, v. 20, p. 487-494. 2005.
- COZZOLINO, S.; NARDELLA, A.M.; IMPAGLIAZZO, S.; WIDMER, A.; LEXER, C. Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological Conservation*, v. 129, p. 14–23. 2006.
- CRUZAN, M.B.; ARNOLD, M.L. Ecological and genetic associations in an *Iris* hybrid zone. *Evolution*, v. 47, p. 1432-1445. 1993.
- DARWIN, C.R. *The various contrivances by which orchids are fertilized by insects*. London: Murray, 1877. 300p.
- DRESSLER, R.L. *The Orchids: natural history and classification*. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 332p.
- DRESSLER, R.L. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? *American Orchid Society Bulletin*, v. 58, p. 796-800. 1989.

- DUNSTERVILLE, G.C. Orchids of Venezuela – *Epidendrum elongatum*. *American Orchid Society Bulletin*, v. 48, p. 447-454. 1979.
- FAY, M.F.; CHASE, M.W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany*, v. 104, p. 359-364. 2009.
- HÁGSATER, E.; SOTO-ARENAS, M.A. *Epidendrum* L. In: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W.; Rasmussen, F.N. (Org.). *Genera Orchidacearum 4*. Oxford: Oxford University Press, 2005. p. 236-251.
- JOHNSTON, J.A.; WESSELINGH, R.A.; BOUCK, A.C.; DONOVAN, L.A.; ARNOLD, M.L. Intimately linked or hardly speaking? The relationship between genotype and environmental gradients in a Louisiana *Iris* hybrid population. *Molecular Ecology*, v. 10, p. 673-681. 2001.
- KOEHLER, S.; CABRAL, J.S.; WHITTEN, W.M.; WILLIAMS, N.H.; SINGER, R.B.; NEUBIG, K.M.; GUERRA, M.; SOUZA, A.P.; AMARAL, M.C.E. Molecular phylogeny of the neotropical genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): species delimitation and insights into chromosome evolution. *Annals of Botany*, v. 102, p. 491–507. 2008.
- LEXER, C.; RANDELL, R.A.; RIESEBERG, L.H. Experimental hybridization as a tool for studying selection in the wild. *Ecology*, v. 84, p. 1688–1699. 2003.
- LEXER, C.; FAY, M.F.; JOSEPH, J.A.; NICA, M.S.; HEINZE, B. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 1045-1057. 2005.
- LINDLEY, J. *Epidendrum*. In: LINDLEY, J. (Org.). *Folia Orchidacea*. London: J. Matthews, 1852–1859. p. 1-97.
- MOCCIA, M.D.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. The strength of reproductive isolation in hybridizing food deceptive orchids. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 2855–2866. 2007.
- PANSARIN, E.R.; AMARAL, M.C.E. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) - floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology*, v. 10, p. 211-219. 2008.
- PEAKALL, R. Speciation in the Orchidaceae: confronting the challenges. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 2834-2837. 2007.
- PILLON, Y.; FAY, M.F.; HEDRÉN, M.; BATEMAN, R.M.; DEVEY, D.S.; SHIPUNOV, A.B.; VAN DER BANK, M.; CHASE, M.W. Insights into the

- evolution and biogeography of Western European species complexes in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Taxon*, v. 56, p. 1185–1208. 2007.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F. *Epidendrum puniceoluteum*, uma nova espécie de Orchidaceae do litoral brasileiro. *Hoehnea*, v. 33, p. 247-250. 2006.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany*, v. 25, p. 129-136. 2008.
- PINHEIRO, F. *Utilização de marcadores genéticos microssatélites nucleares para estudos evolutivos em Orchidaceae*. In: Congresso Nacional de Botânica, 60., 2009, Feira de Santana. Anais do 60º Congresso Nacional de Botânica, Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009. 1 DVD.
- PINHEIRO, F.; PALMA-SILVA, C.; BARROS, F.; COZZOLINO, S. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, p. 337-339. 2009.
- PINHEIRO, F.; KOEHLER, S.; CORRÊA, A.M.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, A.; BARROS, F. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*. No prelo.
- RIESEBERG, L.H. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, v. 28, p. 359-389. 1997.
- RIESEBERG, L.H.; CARNEY, S.E. Plant hybridization. *New Phytologist*, v. 140, p. 599–624. 1998.
- RIESEBERG, L.H.; BUERKLE, C.A. Genetic mapping in hybrid zones. *American Naturalist*, v. 159, p. S37–S49. 2002.
- RIESEBERG, L.H.; RAYMOND, O.; ROSENTHAL, D.M.; LAI, Z.; LIVINGSTONE, K.; NAKAZATO, T.; DURPHY, J.L.; SCHWARZBACH, A.E.; DONOVAN, L.A.; LEXER, C. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*, v. 301, p. 1211–1216. 2003.
- SCOPECE, G.; MUSACCHIO, A.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. Patterns of reproductive isolation in Mediterranean deceptive orchids. *Evolution*, v. 61, p. 2623–2642. 2007.
- SEEHAUSEN, O. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 19, p. 198-207. 2004.

- SEEHAUSEN, O.; TAKIMOTO, G.; ROY, D.; JOKELA, J. Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Molecular Ecology*, v. 17, p. 30-44. 2008.
- SOLIVA, M.; WIDMER, A. Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution*, v. 57, p. 2252-2261. 2003).
- VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W.E.; DRESSLER, R.L.; WHITTEN, W.M.; ARENAS, M.A.S.; CULHAM, A.; CHASE, M.W. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana*, v. 15, p. 96-114. 2000.
- VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W.E.; DRESSLER, R.L.; WHITTEN, W.M.; SOTO-ARENAS, M.A.; CHASE, M.W. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany*, v. 104, p. 417-430. 2009.
- WORLD Checklist of the Monocotyledons. 2006. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/monocots/>>. Acesso em: 07 de out. 2009.

Capítulo 1

Isolation and characterization of microsatellite loci in the Brazilian orchid *Epidendrum fulgens*

Fábio Pinheiro, Melissa O. Santos, Fábio de Barros, Diogo Meyer, Antonio Salatino,
Anete P. Souza, Salvatore Cozzolino

Artigo publicado no periódico “Conservation Genetics”, volume 9, páginas 1661-
1663, ano 2008.

Isolation and characterization of microsatellite loci in the Brazilian orchid *Epidendrum fulgens*

F. Pinheiro · M. O. Santos · F. Barros · D. Meyer ·
A. Salatino · A. P. Souza · S. Cozzolino

Received: 7 January 2008 / Accepted: 8 January 2008 / Published online: 18 January 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract *Epidendrum fulgens* has a patchy distribution along the Atlantic Rainforest in the Brazilian coast, due to the destruction of its native habitat. Here, we report on both the development of nine new microsatellite markers isolated from this species and the characterization of their allele variability in two distant and unrelated populations. The number of alleles observed for each locus ranged from 2 to 17 with an average of 6.4 alleles per locus. These microsatellites should be valuable tools for studying the effect of habitat fragmentation on the genetic structure of *E. fulgens* populations.

Keywords *Epidendrum* · Orchidaceae · Microsatellites · Atlantic Rainforest · Cross-amplification

F. Pinheiro (✉) · A. Salatino
Departamento de Botânica, IB/USP, 05508-900 Sao Paulo,
SP, Brazil
e-mail: biopinheiro@yahoo.com.br

F. Pinheiro · S. Cozzolino
Dipartimento delle Scienze Biologiche, Università degli Studi
Federico II, 80139 Naples, Italy

M. O. Santos · A. P. Souza
Departamento de Genética e Evolução, IB/UNICAMP,
13083-970 Campinas, SP, Brazil

M. O. Santos · A. P. Souza
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG),
UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

F. Barros
Instituto de Botânica, Seção de Curadoria do Herbário,
04301-012 Sao Paulo, SP, Brazil

D. Meyer
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB/USP,
05508-900 Sao Paulo, SP, Brazil

Epidendrum fulgens is an endemic orchid of coastal Brazilian Atlantic Rainforest. In the past, this orchid had a wide geographic distribution between the Brazilian States of Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul but, nowadays, its populations are small and fragmented due to habitat loss. The knowledge of patterns of genetic diversity and gene flow is essential to guide conservation management decisions and for understanding the genetic consequences of habitat loss in fragmented populations. Therefore, the aim of this study was to develop a set of polymorphic microsatellite (simple sequence repeat—SSR) markers for *E. fulgens* for describing the population genetic structure of this threatened species.

Total DNA was extracted from silica gel exsiccated leaves of *E. fulgens* following the protocol of Doyle and Doyle (1990). Marker isolation involved the construction of a genomic library partially enriched for (CT)_n and (GT)_n repeats by using biotinylated oligonucleotide sequences bound to Streptavidin-coated magnetic particles as described by Kijas et al. (1994) with modifications by Billote et al. (1999). Microsatellite-enriched DNA fragments were ligated into pGEM-T Easy vector (Promega) as described by supplier and used to transform XL1Blue competent *E. coli* cells (Stratagene). A total of 96 recombinant colonies were obtained and sequenced using the BigDye v3.1 terminator kit on the ABI PRISM 3130 Sequence Analyser (Applied Biosystems). For 25 clones, containing SSR motifs, forward and reverse sequences were aligned in SeqMan (DNASTAR package), and primers were designed for 16 loci using the PRIMER3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

For each SSR, the forward primers were synthesized with a 19 bp long M13 tail (5'-CACGACGTTGTAA AACGAC-3') following the amplification method of Schuelke (2000), which involved three primers: a forward

Table 1 Characteristics of microsatellite loci from *Epidendrum fulgens*, including locus name, primer sequences, repeat type (interrupted microsatellites are indicated by a (...) between repeats), no. of alleles (A), allele size range, observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity for each population, and test for departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE)

Locus	Primer sequences ^a		Repeat	A	Size range (bp)	Guaratuba		Imbituba	
	F	R				H_O	H_E	H_O	H_E
EFF06	F: TCAAAGCCTATCATAAGTGCTCCA	R: CCTTGTGCAACTGGGTGTT	(CA) ₈	4	364–370	0.500	0.567	0.500	0.633
EFF26	F: TGTCTAAGTCAAAGTGGGGTIT	R: TCCGAGTCTGTCGGTCTTTT	(GT) _{1,5}	4	199–205	0.400	0.343	0.550	0.680
EFF29	F: TCCGCTGATTTGAGTTTGCT	R: CTGGTCCCCTAAGATCAATCAC	(TC) _{3,3}	17	185–229	0.900	0.910	0.700	0.915*
EFF43	F: TGCCCCACAGACAATTAAGC	R: CCTCGATGGAACCCCATAT	(GA) ₉	6	148–160	0.100	0.097	0.700	0.584
EFF45	F: TTGGGTTTCGTCTCACATCA	R: CCCTCAGTATCCGCCACTT	(CT) _{1,1... (CT)₄}	4	288–294	0.450	0.514	0.550	0.670
EFF51	F: CTTGTCTACGTGAGGGCCTG	R: TCAACAACGTGAAAAGCCATC	(GT) ₈	5	369–377	0.700	0.744*	0.600	0.573
EFF58	F: TGAATGCTTATACTCTCCCATCA	R: AAGTGGCAAAAGCACCATGTA	(CA) ₇	2	210–212	0.200	0.184	0.200	0.430*
EFF61	F: TGTCCCCTATATTCGTGATGGTG	R: AGGGTTTTAGGTCAAAGTGCTC	(CA) ₉	2	264–266	0.050	0.050	0.350	0.357
EFF70	F: CCGGAGATTGTTCCAAACC	R: GCTCCACGCAAAAACCTTTT	(AG) _{3,0}	14	321–349	0.750	0.866*	0.700	0.896*

Genbank Accession nos. EU363791–EU363799

^a All forward primers were M13-tailed at the 5' end. Significant departures from HWE: * $P < 0.001$

Table 2 Cross-species and genera amplification of nine microsatellite primers from *Epidendrum fulgens* within the subtribe Laelliinae

Species	EFF6	EFF26	EFF29	EFF43	EFF45	EFF51	EFF58	EFF61	EFF70
<i>Epidendrum xanthinum</i>	–	+	W	+	+	–	+	W	+
<i>Epidendrum secundum</i>	–	+	W	+	+	+	+	+	++
<i>Pseudolaelia cipoensis</i>	–	+	W	+	–	–	W	W	–
<i>Cattleya eldorado</i>	–	–	W	+	+	–	W	+	–
<i>Prosthechea vespa</i>	–	+	W	+	–	–	W	+	–

Successful amplifications with a single band visualized (+), successful amplifications with more than one band visualized (++), weak amplifications (W) and failed amplifications (–) are indicated

SSR-specific primer with the M13 tail at its 5' end, a reverse locus-specific primer, and a universal M13 primer labelled with a fluorescent dyes, 6-FAM or JOE (Applied Biosystems) respectively. All PCR amplifications were performed in a Applied Biosystems 2700 thermocycler in 10 µl reactions containing: 10 ng DNA template, 1× PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 1 pmol forward primer, 4 pmol reverse primer, 0.4 pmol universal M13 primer and 0.5 U *Taq* polymerase (Amersham Pharmacia Biotech). A 'touchdown' cycling program was used: 95°C for 3 min, then 10 cycles of 94°C for 30 s, 58°C decreasing to 48°C at 1°C per cycle for 30 s, 72°C for 30 s followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 48°C for 30 s, 72°C for 30 s, followed by a final extension of 20 min at 72°C. Microsatellite alleles were resolved on a 3130 DNA Sequence Analyser and were sized with LIZ (500) standard by using GENEMAPPER v3.7 software (Applied Biosystems).

A total of 40 individuals from two Brazilian populations of *E. fulgens* (Imbituba and Guaratuba) were analyzed to evaluate SSR polymorphism. ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al. 2005) software was used to calculate observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, to test for departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and for linkage disequilibrium between all pairs of loci. MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al. 2004) software was used to quantify genotyping errors. Nine SSRs were polymorphic, with number of alleles per locus ranging from 2 to 17 with an average of 6.4 alleles per locus. The observed and expected heterozygosities (H_O and H_E) ranged from 0.10 to 0.90 and 0.05 to 0.91, with averages of 0.494 and 0.556, respectively (Table 1). Four loci showed a significant departure from Hardy–Weinberg equilibrium ($P < 0.001$), three due to heterozygote deficiency (EFF29, EFF58 and EFF70) in Imbituba population, and one due to heterozygote excess (EFF51) in the Guaratuba population. The small size of the Imbituba population and fragmentation history of the region may be the factors promoting the local observed low

levels of heterozygosity. No linkage disequilibrium was detected among any pair of loci, and no genotyping errors due to presence of null alleles, short allele dominance or scoring of stutter peaks was detected.

Cross-species and cross-genera amplification were performed on *Epidendrum* species and allied genera, on single individuals by using the same amplification conditions used for *E. fulgens*. Several positive amplifications occurred across all tested species (Table 2).

The primers proved to be useful in revealing levels of diversity in *E. fulgens* and thus can be used to explore the genetic structure of scattered populations across its actual geographical range.

Acknowledgements We thank C. Palma-Silva and R. P. Romanini for technical support and helpful discussions on this manuscript. This work was supported by grants from FAPESP (06/54189-3) and CNPq (471929/2006-9) to F. Pinheiro and F. Barros, and by awards from CAPES to F. Pinheiro and CNPQ to F. Pinheiro, F. Barros, A. Salatino and A. P. Souza.

References

- Billote N, Risterucci A-M, Baurens F-C (1999) Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–288
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
- Excoffier L, Laval LG, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0 An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50
- Kijas JM, Fowler JC, Garbett CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques* 16:656–660
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233–234
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538

Capítulo 2

Isolation and characterization of microsatellite loci in *Epidendrum puniceoluteum*, an endemic orchid from the Atlantic Rainforest

Fábio Pinheiro, Melissa O. Santos, Clarisse Palma-Silva, Fábio de Barros, Diogo Meyer, Antonio Salatino, Anete P. Souza, Salvatore Cozzolino

Artigo publicado no periódico “Molecular Ecology Resources”, volume 8, páginas 1114-1116, ano 2008.

PERMANENT GENETIC RESOURCES

Isolation and characterization of microsatellite loci in *Epidendrum puniceoluteum*, an endemic orchid from the Atlantic Rainforest

F. PINHEIRO,*†† M. O. SANTOS,†‡ C. PALMA-SILVA,§ F. BARROS,¶ D. MEYER,** A. SALATINO,*
A. P. SOUZA†‡ and S. COZZOLINO††

*Departamento de Botânica, IB/USP, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil, †Departamento de Genética e Evolução, IB/UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil, ‡Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil, §Departamento de Genética, IB/UFRGS, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil, ¶Instituto de Botânica, Seção de Curadoria do Herbário, 04301-012 São Paulo, SP, Brazil, **Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB/USP, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil, ††Dipartimento delle Scienze Biologiche, Università degli Studi Federico II, I-80139 Napoli, Italy

Abstract

Epidendrum puniceoluteum is an endemic orchid of Atlantic Rainforest, restricted to few populations only due to the destruction and fragmentation of its native habitat. Here, we report on the development of 10 microsatellite markers isolated from this orchid species. Genetic variability was characterized in two distant populations from Brazil coast. The number of alleles observed for each locus ranged from two to 12 and with an average of 6.4 alleles per locus. These microsatellites should be valuable tools for studying both fine-scale genetic structure of scattered *E. puniceoluteum* population and patterns will be useful genetic markers for other closely related taxa.

Keywords: Atlantic Rainforest, cross-amplification, *Epidendrum*, microsatellites, Orchidaceae

Received 10 December 2007; revision accepted 12 February 2008

The fragmentation of the Atlantic Rainforest, a worldwide biodiversity hotspot, represents a dramatic process with a strong impact on genetic diversity of local plant community (Cardoso *et al.* 2005). Knowledge about demographic events that shape the genetic patterns in fragmented populations can help conservation efforts to preserve threatened species. Among the several Neotropic orchids of the Atlantic Rainforest, *Epidendrum* is the largest genus showing great morphological diversity that has recently generated many taxonomic doubts about its generic classification and species delimitation (Hágsater 1984). *Epidendrum puniceoluteum* is a recently described orchid species (Pinheiro & Barros 2006) that had a wide distribution in the past, from São Paulo and Rio Grande do Sul States, Brazil, but is now restricted to few populations only due to the destruction of its native habitat. Here, we report on the development of a set of polymorphic

microsatellite [simple sequence repeat (SSR)] markers for *E. puniceoluteum* that will be useful in addressing questions on the genetic structure of this endangered species.

Total genomic DNA was extracted from silica gel-exsiccated leaves of *E. puniceoluteum* following the protocol of Doyle & Doyle (1990). Markers isolation involved the construction of a genomic library partially enriched for (CT)_n and (GT)_n repeats by using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles as described by Kijas *et al.* (1994) with modifications by Billote *et al.* (1999). Microsatellite-enriched DNA fragments were ligated into pGEM-T Easy vector (Promega) as described by the supplier and used to transform XL1-Blue competent *Escherichia coli* cells (Stratagene). A total of 96 recombinant colonies were obtained and sequenced using the BigDye version 3.1 terminator kit on the ABI PRISM 3130 Sequence Analyser (Applied Biosystems). For 21 clones, containing SSR motifs, forward and reverse sequences were aligned in SEQMAN (DNASTAR package), and primers were designed for 14 loci using the PRIMER 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Correspondence: Fabio Pinheiro, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, Rua do Matão 277, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 113091 7547; E-mail: biopinheiro@yahoo.com.br

Table 1 Characteristics of microsatellite loci from *Epidendrum puniceoluteum*, including locus name, primer sequences, repeat type (interrupted microsatellites are indicated by a (...) between repeats), no. of alleles (*A*), allele size range, observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity for each population, and the significance of the test for departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). Locus EPP49 was monomorphic for Imbituba population. GenBank Accession nos EU326290–EU326299

Locus	Primer sequences†	Repeat	<i>A</i>	Size range (bp)	Pontal		Imbituba	
					H_O	H_E	H_O	H_E
EPP08	F: TGTTCAAGAACAACATCCGGACT R: TCTTGCTGGTTGGCATTATCT	(GA) ₉	3	219–223	0.100	0.184	0	0.405*
EPP10	F: GGAGGCCAATGTGATGAAAC R: TCGAATAAGCTCCTGCATCC	(GT) ₅ ... (AG) ₉ ... (AG) ₂₅	6	234–250	0.350	0.344	0.400	0.478
EPP12	F: GTCGGTGAGGGTCCAGAAA R: CACCATCTTCTCTCCCCTGAG	(GA) ₂₁	9	177–197	0.600	0.715	0.400	0.457
EPP17	F: AGCACATCCGGCCTAACTA R: TGCCTGGCATCCATAATGAC	(TC) ₁₃ T(TC) ₉	10	203–223	0.700	0.750	0.250	0.708*
EPP18	F: TGCATACGTAACAACATGGAGGT R: GGAAGGTCATTCTAACCAGGAA	(AG) ₂₄	12	288–324	0.350	0.321	0.400	0.503
EPP49	F: GCAAGGGAGAGCAGATTGAG R: AGCATTTTTCGCCCTTAACA	(GA) ₁₇	2	182–186	0.150	0.142	mono	mono
EPP56	F: ACGCTCTTTGGCTGGAAC R: CTCACATGCCTTTAGCCTCAC	(TC) ₁₆	2	136–144	0.150	0.142	0.300	0.492
EPP86	F: CAGCCTTTAGGCATTCTTGG R: GCTCATTTGGCCTTAGTGACC	(GA) ₁₄	11	215–239	0.550	0.650	0.950	0.846
EPP89	F: TTCTTGTTGTCGCCTTCGAT R: TCAGAGAGCTCGTCCGACA	(GA) ₃ AA(GA) ₃ ... (GA) ₁₀ GG(GA) ₅	4	284–290	0.300	0.328	0.350	0.314
EPP96	F: TCTAACATGCGAAGGCAAAA R: TTTGGTTGTTAAGCCCCATT	(AG) ₁₂	5	291–299	0.650	0.544	0.600	0.635

†All forward primers were M13-tailed at the 5' end. Significant departures from HWE: * $P < 0.001$.

For each SSR, the forward primers were synthesized with a 19-bp long 5' M13 tail (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') following the amplification method of Schuelke (2000). All polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed in an Applied Biosystems 2700 thermocycler in 10- μ L reactions containing: 10 ng template, 1 \times PCR buffer (Amersham Pharmacia Biotech), 2 mM MgCl₂, 100 μ M dNTPs, 1 pmol forward primer, 4 pmol reverse primer, 0.4 pmol label (6-FAM or JOE: Applied Biosystems) M13 primer and 0.5 U *Taq* polymerase (Amersham Pharmacia Biotech). A 'touchdown' cycling programme was used: 95 °C for 3 min, then 10 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C decreasing to 48 °C at 1 °C per cycle for 30 s, 72 °C for 30 s followed by 40 cycles of 94 °C for 30 s, 48 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, followed by a final extension of 20 min at 72 °C. PCR products were resolved on a 3130 DNA Sequence Analyser and were sized with Genescan 500 LIZ size standard using GENEMAPPER version 3.7 software (Applied Biosystems).

A total of 40 individuals from two Brazilian populations of *E. puniceoluteum* (Imbituba and Pontal do Paraná) were analysed to evaluate SSR polymorphism. ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) software was used to calculate observed and expected heterozygosities, and to test for departure from Hardy–Weinberg equilibrium and for linkage disequilibrium

between all pairs of loci. Ten SSRs were polymorphic, with the number of observed alleles per locus ranging from two to 12 with an average of 6.4 alleles per locus. The observed heterozygosity for the polymorphic loci ranged between zero and 0.95 with an average of 0.377 (Table 1). We found an absence of polymorphism at locus EPP49 in the Imbituba population. In the same population, two loci (EPP8 and EPP17) showed a significant departure from Hardy–Weinberg equilibrium ($P < 0.001$), due to heterozygote deficiency. The small size of the Imbituba population and fragmentation history of the region may be causing the observed low levels of diversity and the Hardy–Weinberg disequilibrium for some loci in this population. No linkage disequilibrium between any pair of loci was detected.

The primers proved to be useful in revealing levels of diversity in both populations and thus can be used to explore the genetic structure of fragmented populations of *E. puniceoluteum* across its actual geographical range. Historical demographic patterns such as bottlenecks and range contraction will be compared with information on reproductive success and seed dispersal ability in order to identify the evolutionary processes that are shaping their actual genetic patterns of populations.

Table 2 Cross-species and genera amplification of 10 microsatellite primers from *Epidendrum puniceoluteum* within the subtribe Laeliinae. Successful amplification with a single band visualized with expected allele size (+), successful amplification with more than one band visualized, with at least one band with the expected allele size (++) , weak amplification of a band with the expected allele size (W) and failed amplification (–) are indicated

Species	EPP8	EPP10	EPP12	EPP17	EPP18	EPP49	EPP56	EPP86	EPP89	EPP96
<i>Epidendrum xanthinum</i>	+	W	+	+	+	+	++	++	+	+
<i>Epidendrum secundum</i>	+	W	+	–	++	++	++	+	+	+
<i>Pseudolaelia cipoensis</i>	+	–	+	+	W	+	–	++	+	W
<i>Cattleya eldorado</i>	W	–	W	–	W	+	+	+	+	W
<i>Prosthechea vespa</i>	+	–	+	–	++	+	++	+	+	W

Cross-species and cross-genera amplification of the microsatellite primers were performed on *Epidendrum* species and related members from subtribe Laeliinae (Table 2). Amplification was performed on single individual of each tested species using the same amplification conditions used for *E. puniceoluteum*. Several positive amplifications of PCR products with the expected allele sizes occurred across all tested species. These primers therefore should be useful for population studies both in *E. puniceoluteum* and in related species and genera, contributing to the knowledge about diversification processes and conservation in South American orchids.

Acknowledgements

We thank V. Tranchida Lombardo, R. Rinaldi, F. Monteiro, R.C. Winkworth, M.M.S. Ferreira and J. Lovo for technical support and helpful discussions on this manuscript. This work was supported by grants from FAPESP (06/54189-3) and CNPq (471929/2006-9) to F.P. and F.B., and by awards from CAPES to F.P. and CNPq to F.P., F.B., A.S. and A.P.S.

References

- Billote N, Risterucci A-M, Baurens F-C (1999) Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, **54**, 277–288.
- Cardoso SRS, Provan J, Lira CCD, Pereira LDR, Ferreira PCG, Cardoso MA (2005) High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. *Biodiversity and Conservation*, **14**, 1047–1057.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 13–15.
- Excoffier L, Laval LG, Schneider S (2005) ARLEQUIN, Version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Hágsater E (1984) Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: *Proceedings of the 11th World Orchid Conference* (ed. Tan KW) World Orchid Conference Inc., Miami, Florida.
- Kijas JM, Fowler JC, Garbett CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques*, **16**, 656–660.
- Pinheiro F, Barros F (2006) *Epidendrum puniceoluteum*, uma nova espécie de Orchidaceae do litoral brasileiro. *Hoehnea*, **33**, 247–250.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, **18**, 233–234.

Capítulo 3

Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*

Fábio Pinheiro, Clarisse Palma-Silva, Fábio de Barros, Salvatore Cozzolino

Artigo publicado no periódico “Genetics and Molecular Biology”, volume 32, páginas
337-339, ano 2009.



Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*

Fábio Pinheiro^{1,4}, Clarisse Palma-Silva², Fábio de Barros³ and Salvatore Cozzolino⁴

¹Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

²Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³Instituto de Botânica, Seção de Orquidário do Estado, São Paulo, SP, Brazil.

⁴Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Complesso Universitario di Monte S. Angelo, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy.

Abstract

In this study we tested the cross-amplification of 33 microsatellite loci previously developed for two closely related Neotropical orchid genera (*Epidendrum* and *Laelia*). A set of ten loci were polymorphic across five examined species (20 individuals each) with 2 to 15 alleles per locus. The mean expected and observed heterozygosity (average across species) ranged from 0.34 to 0.82 and from 0.27 to 0.85, respectively. In addition we tested all loci in 35 species representative of the genus *Epidendrum*. Of these, 26 loci showed successful amplification. Cross-application of these loci represent a potential source of co-dominant markers for evolutionary, ecological and conservation studies in this important orchid genus.

Key words: *Epidendrum*, Orchidaceae, short tandem repeat, cross-amplification.

Received: September 17, 2008; Accepted: November 18, 2008.

Epidendrum L. is the largest of the orchid genera in the Neotropical region, with approximately 1500 species (Hágsater and Arenas, 2005). Species of this genus display extensive variation in morphological features and growth habits (epiphytic, lithophytic and terrestrial). Moreover, they offer an interesting opportunity for exploring the influence of human activities on natural environments, since they occur within several types of threatened vegetation (Amazon and Atlantic Rainforests, savannas, coastal sand dunes, 'tepui', and 'páramos').

Microsatellite markers are the current choice for most studies on evolution, ecology and conservation, due to their high levels of polymorphism and high reproducibility. Studies increasingly aim at comparing genetic, demographic, behavioural, and breeding system parameters among related species. To address these questions, researchers require 'universal' genetic markers that can easily be transferred between species (Barbara *et al.*, 2007). The capacity to transfer and apply the same set of microsatellite loci in different species can significantly facilitate studies among closely related and endemic taxa. This is important where resources for undertaking conservational genetic studies are limited, thus making it less cost-effective to develop

specific microsatellite loci for many species of the same taxa.

Although, positive cross-amplification of some microsatellite loci have been previously reported for a few species of *Epidendrum* (Cortés-Palomec *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2008a, 2008b), to date, there is no precise and standardized information about amplification-efficiency or polymorphism in these loci. The aim of this study is to report the potential of cross-species transferability of microsatellite markers across the genus *Epidendrum* in order to identify a set of polymorphic loci available for inquiries assessing the effect of landscape fragmentation on gene flow, species delimitation, origin and the maintenance of reproductive barriers among species of this genus.

Total genomic DNA was extracted from silica gel-exsiccated leaves according to the Pinheiro *et al.* (2008a) protocol. We tested three sets of microsatellite markers previously described for *Epidendrum fulgens* (nine loci - Pinheiro *et al.*, 2008a), *E. puniceoluteum* (ten loci - Pinheiro *et al.*, 2008b) and *Laelia speciosa* (14 loci - Cortés-Palomec *et al.*, 2008), the latter a closely related genus belonging to the subtribe Laeliinae, the same subtribe as that of *Epidendrum* (Hágsater and Arenas, 2005). Altogether, we tested 33 microsatellite loci (Table S4) for cross-amplification in 35 species belonging to different sections of genus *Epidendrum*.

For each microsatellite locus, the forward primers were synthesized with a 5'-M13 tail according to the Schuelke (2000) method, involving three primer polymerase chain reactions (PCRs), including a universal M13 primer labelled with a fluorescent dye, 6-FAM (Applied Biosystems). All PCR amplifications were performed in an Applied Biosystems 2700 thermocycler according to Pinheiro *et al.* (2008a, 2008b). The conditions were maintained constant for all loci so as to maximize standardization. Microsatellite alleles were resolved on a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and sized in accordance with LIZ (500) standard by using GENEMAPPER v. 3.7 software (Applied Biosystems).

We initially tested the potential of cross-amplification for all loci with one sample from each of the 35 *Epidendrum* species. Furthermore, we focused our effort on five of those species belonging to different phyletic sections of the genus *Epidendrum* (Hágsater and Arenas, 2005): *E. denticulatum*, *E. secundum*, *E. campestre*, *E. densiflorum* and *E. rigidum*. We sampled 20 individuals from each species of a single population (Table S1). GENEPOP software (Raymond and Rousset, 1995; web version 3.4) was used to calculate observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, and to test for departure from Hardy - Weinberg equilibrium (HWE) as well as for link-

Table 1 - Size range of the PCR products, number of observed alleles (A), expected and observed heterozygosity (H_E/H_O), and the significance of the test for departure from Hardy-Weinberg equilibrium, for the ten selected microsatellite loci (indicated by rows) in each of the five *Epidendrum* species. The size range of the original alleles described by the authors is indicated in parentheses below each locus.

Locus	Species	size range	A	H_E/H_O	Locus	Species	size range	A	H_E/H_O
EPP08 (219-223)	<i>E. campestre</i>	211-219	3	0.19/0.20	EFF26 (199-205)	<i>E. campestre</i>	190-204	8	0.76/0.84
	<i>E. densiflorum</i>	211-229	5	0.71/0.36		<i>E. densiflorum</i>	196-202	4	0.66/0.95
	<i>E. denticulatum</i>	211-213	2	0.51/1.00*		<i>E. denticulatum</i>	164-202	5	0.64/0.65
	<i>E. rigidum</i>	201-215	4	0.64/0.05*		<i>E. rigidum</i>	196-204	5	0.66/0.75
	<i>E. secundum</i>	213-221	4	0.28/0.30		<i>E. secundum</i>	192-204	6	0.77/0.88
	Mean			3.6		0.47/0.38	Mean		
EPP18 (288-324)	<i>E. campestre</i>	274-314	11	0.88/0.89	EFF45 (288-294)	<i>E. campestre</i>	280-284	3	0.50/0.35
	<i>E. densiflorum</i>	284-290	3	0.68/0.70		<i>E. densiflorum</i>	288-294	3	0.49/0.53
	<i>E. denticulatum</i>	288-328	15	0.92/0.84		<i>E. denticulatum</i>	278-294	5	0.32/0.25
	<i>E. rigidum</i>	284-312	4	0.64/0.55		<i>E. rigidum</i>	288-340	5	0.81/0.35*
	<i>E. secundum</i>	284	monomorphic	-		<i>E. secundum</i>	288-294	4	0.67/0.55
	Mean			8.3		0.62/0.60	Mean		
EPP49 (182-186)	<i>E. campestre</i>	no amplification	-	-	EFF58 (210-212)	<i>E. campestre</i>	210-212	2	0.46/0.68
	<i>E. densiflorum</i>	162-187	9	0.79/0.32*		<i>E. densiflorum</i>	210-216	4	0.66/0.95
	<i>E. denticulatum</i>	176-190	6	0.78/0.70		<i>E. denticulatum</i>	212	monomorphic	-
	<i>E. rigidum</i>	170-186	3	0.46/0.10		<i>E. rigidum</i>	210-212	2	0.51/1.00
	<i>E. secundum</i>	176-186	6	0.83/0.63		<i>E. secundum</i>	212	monomorphic	-
	Mean			6		0.71/0.44	Mean		
EPP56 (136-144)	<i>E. campestre</i>	136-154	3	0.14/0.10	Lspe-1 (350-390)	<i>E. campestre</i>	219-221	2	0.36/0.35
	<i>E. densiflorum</i>	148-152	2	0.10/0.10		<i>E. densiflorum</i>	215-225	4	0.49/0.35
	<i>E. denticulatum</i>	132-166	10	0.87/0.85		<i>E. denticulatum</i>	471-493	3	0.34/0.28
	<i>E. rigidum</i>	152-156	2	0.51/0.00*		<i>E. rigidum</i>	225-233	2	0.49/0.00*
	<i>E. secundum</i>	122-162	9	0.78/0.28*		<i>E. secundum</i>	462-488	9	0.85/0.85
	Mean			5.2		0.48/0.27	Mean		
EPP86 (215-239)	<i>E. campestre</i>	217-231	8	0.83/0.85	Lspe-3 (224-250)	<i>E. campestre</i>	250-266	8	0.83/0.79
	<i>E. densiflorum</i>	217-227	6	0.81/0.80		<i>E. densiflorum</i>	250-288	12	0.88/0.40*
	<i>E. denticulatum</i>	217-223	4	0.71/0.60		<i>E. denticulatum</i>	262-304	15	0.93/1.00
	<i>E. rigidum</i>	217-235	7	0.83/1.00*		<i>E. rigidum</i>	268-286	5	0.78/0.25*
	<i>E. secundum</i>	215-229	8	0.85/1.00		<i>E. secundum</i>	244-260	6	0.69/0.90
	Mean			6.6		0.81/0.85	Mean		

Significant departures from HWE: * $p < 0.05$.

age disequilibrium at each locus, by applying the Bonferroni correction to account for multiple comparisons.

Among the 33 loci tested, 26 showed positive amplification and PCR products with the expected allele sizes throughout most of the 35 species tested (Table S2). The percentage of cross-amplification was 78% on an average, thus higher than the mean value reported for monocot species (60% - Barbara *et al.*, 2007).

A total of ten polymorphic loci exhibited the features so desired for use as co-dominant molecular markers in the five examined species (Table 1), with the number of alleles per locus ranging from two to 15 (overall mean 5.6 alleles) Expected and observed heterozygosity ranged from 0.34 to 0.82 and 0.27 to 0.85, respectively (an average of 0.60 and 0.53, respectively) (Table 1). For each sampled population of the five species, we found sporadic cases of departure from HW equilibrium ($p < 0.05$): for loci EPP8 (in *E. denticulatum* and *E. rigidum*), EPP49 (in *E. densiflorum*), EPP56 (in *E. rigidum* and *E. secundum*), EPP86 (in *E. rigidum*), EFF45 (in *E. rigidum*), Lspe-1 (in *E. rigidum*) and Lspe-3 (in *E. rigidum*). Interestingly, six out of ten loci in *E. rigidum* departed significantly from HW equilibrium due to heterozygotic deficiency. Such deviations could be caused by inbreeding and/or Wahlund effects arising from secondary population subdivision. Although null alleles cannot be ruled out, there was no evidence of scoring error due to 'stuttering' or 'large allele dropout', when using MICRO-CHECKER software (van Oosterhout *et al.*, 2004). Three loci in *E. campestre*, five loci in *E. denticulatum*, five loci in *E. rigidum* and seven in *E. secundum* exhibited linkage disequilibrium ($p < 0.001$). Loci that were monomorphic or not amplified in most of the five *Epidendrum* species are listed in Table S3.

This study unveiled evidence that cross-transferability of developed microsatellite loci can increase the availability of markers to address both ecological and evolutionary questions in *Epidendrum*. The markers tested here showed to be of great potential for the use in comparing multiple co-occurring *Epidendrum* species in different ecological communities, thus contributing to knowledge on diversification processes and conservation among neotropical orchids.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPESP (06/54189-3) and CNPq (471929/2006-9) to FP and FB, and by awards from CNPq and CAPES to FP and FB.

References

Barbara T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF and Lexer C (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: Potential and limitations. *Mol Ecol* 16:3759-3767.

Cortés-Palomec AC, McCauley RA and Oyama K (2008) Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Mol Ecol Resour* 8:135-138.

Hågsater E and Arenas MAS (2005) *Epidendrum* L. In: Pridgeon AM, Cribb P, Chase MW and Rasmussen FN (eds) *Genera Orchidacearum*. V. 4. Oxford University Press, Oxford, pp 236-251.

Pinheiro F, Santos MO, Barros F, Meyer D, Salatino A, Souza AP and Cozzolino S (2008a) Isolation and characterization of microsatellite loci in the Brazilian orchid *Epidendrum fulgens*. *Conserv Genet* 9:1661-1663.

Pinheiro F, Santos MO, Palma-Silva C, Barros F, Meyer D, Salatino A, Souza AP and Cozzolino S (2008b) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Epidendrum puniceoluteum*, an endemic orchid from the Atlantic Rainforest. *Mol Ecol Resour* 8:1114-1116.

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233-234.

Internet Resources

Raymond M and Rosset F (1995) Genepop: Population Genetics Software for Exact Test and Ecumenism. *J Hered* 86:248-249. <http://genepop.curtin.edu.au/> (September 15, 2008).

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM and Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538. <http://www.microchecker.hull.ac.uk/> (September 15, 2008).

Supplementary Material

The following online material is available for this article:

Table S1 - Geographical region, sample size and Biome of species sampled.

Table S2 - Cross-species amplification of 26 loci tested for 30 additional *Epidendrum* species. Size range of the PCR products and unsuccessful amplifications are indicated (-).

Table S3 - Size range of the PCR products, number of observed alleles (A), expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), and the significance of the test for departure from Hardy - Weinberg equilibrium (HWE - Significant departures from HWE: $p < 0,001$), for the microsatellite loci (indicated by rows) that were not detected as polymorphic (monomorphic), or not amplified (na) in most of the five *Epidendrum* species. The size range of the original alleles described by the authors is indicated in parentheses on the bottom of each locus.

Table S4 - Primer names, sequences and Genbank Accession numbers of 33 orchid species SSR loci.

Associate Editor: Everaldo Gonçalves de Barros

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table S1. Geographical region, sample size and Biome of species sampled.

Species	N	Population	Biome
<i>E. denticulatum</i>	20	Araruama, Rio de Janeiro, RJ	Atlantic Rainforest
<i>E. densiflorum</i>	20	Ilha do Cardoso, Cananéia, SP	Atlantic Rainforest
<i>E. rigidum</i>	20	Ilha do Cardoso, Cananéia, SP	Atlantic Rainforest
<i>E. secundum</i>	20	Serra do Cipó, Conceição do Mato Dentro, MG	Cerrado
<i>E. campestre</i>	20	Serra do Cipó, Conceição do Mato Dentro, MG	Cerrado

Table S2. Cross-species amplification of 26 loci tested for 30 additional *Epidendrum* species. Size range of the PCR products and failed amplifications are indicated (-).

Locus	epp_8§	epp_10§	epp_18§	epp_86§	epp_49§	epp_56§	epp_89§	epp_96§	eff_06Ψ	eff_26Ψ	eff_29Ψ	eff_43Ψ	eff_45Ψ
species													
<i>E. xanthinum</i>	213	250-264	306-308	221-227	170-179	-	291	292-294	372	200-202	193	150	288
<i>E. catillus</i>	214-216	306	280-290	219-241	156-165	119-146	-	-	-	200-202	198	150	286
<i>E. calanthum</i>	215	-	290-331	217-223	156-165	119	-	-	372	-	205	150	-
<i>E. funkii</i>	215-219	252-266	278	223-241	157-166	159	-	-	-	200-202	-	150	282-286
<i>E. myrmecophorum</i>	213-219	278	284-286	219-225	152-161	144-154	-	-	-	200-202	-	150	288
<i>E. purpureum</i>	213	268	284-300	241	-	141-153	289	300	370	198-	203	150	288
<i>E. ibaguense</i>	215	-	290-304	221-223	156-165	-	-	-	375	200-202	-	150	-
<i>E. radicans</i>	215	246	288-290	223-225	168-178	129-139	-	-	368	200-202	179-181	150	288
<i>E. incisum</i>	215	245	288-290	217-219	-	-	-	-	377	200-202	191	150	289
<i>E. cinnabarinum</i>	210	221	286	221-227	-	-	281-285	294-298	366-370	196-200	193-191	150	289
<i>E. martianum</i>	213-219	-	289-291	225	-	140-151	-	-	378	200-202	-	150	278
<i>E. flexuosum</i>	219	223	290	223	161-169	-	-	-	368	200-202	-	150	279
<i>E. ramosum</i>	213-219	250-254	290	219-223	152-160	140-151	-	-	-	200-202	-	150	288
<i>E. saxatile</i>	219	290	290	242	169-172	144-147	-	-	-	200-202	-	150	305-316
<i>E. cristatum</i>	215-219	236	284-286	219-225	-	133-144	-	-	372	200-202	-	150	289-291
<i>E. purpurascens</i>	219	254-261	304-306	225-227	169-172	-	-	-	-	200-202	-	150	-
<i>E. ciliare</i>	212-219	303,69	290-308	217-223	-	141-152	-	-	-	200-202	-	150	-
<i>E. nocturnum</i>	215-219	-	295-321	219-225	-	141-152	-	-	391	200-202	-	150	319-321
<i>E. cooperianum</i>	219	-	290	215-219	159-161	141-152	-	-	-	200-202	-	150	-
<i>E. warasii</i>	219	261	297	219-221	156-166	139-150	-	-	377	200-202	-	150	286
<i>E. avicola</i>	213-221	250-252	290-308	217-219	-	-	-	-	330	200-202	-	150	-
<i>E. schlechterianum</i>	212-219	290	290-308	219-227	167-169	241-246	-	-	-	200-202	-	150	-
<i>E. coronatum</i>	220-222	-	289-307	219	161-164	-	-	-	373	200	-	150	279
<i>E. filicaule</i>	219	-	290-306	225-229	139-149	-	-	-	377	200-202	-	150	-
<i>E. chlorinum</i>	219	-	290-306	217-219	-	-	259	-	-	200-202	-	150	321-323
<i>E. tridactylum</i>	212-219	-	290-306	-	188-198	-	-	-	-	200-202	-	150	-
<i>E. vesicatum</i>	215	-	290-308	227-229	166-168	-	-	-	-	200-202	-	150	295-301
<i>E. latilabre</i>	219-221	261	313	221-223	152-161	-	-	-	-	200-202	-	150	-
<i>E. fulgens</i>	210	265-275	286-308	219-243	152-160	-	284	-	366	199-203	201-211	150-152	291-295
<i>E. puniceoluteum</i>	211-219	271-273	290-310	221-227	160-184	136-144	288	294	370	197	219-225	150	289-291

§Markers isolated by Pinheiro et al (2008b); ΨMarkers isolated by Pinheiro et al (2008a); *Markers isolated by Cortés-Palomec et al (2008).

Table S2. Continue

Locus	eff_58Ψ	eff_61Ψ	eff_70Ψ	eff_51Ψ	Lspe_1*	Lspe_3*	Lspe_4*	Lspe_6*	Lspe_8*	Lspe_9*	Lspe_10*	Lspe_11*	Lspe_14*
species													
<i>E. xanthinum</i>	212	265-271	329	335	218	249	214	172-175	221-247	219-229	-	205	254
<i>E. cattilus</i>	210	264	322-328	369-371	218-220	258-260	214	172-175	221	231-	-	205	254
<i>E. calanithum</i>	208	265	-	376-383	229	253	214	172-175	221	223-231	172-197	205	253
<i>E. funkii</i>	210	265	325-329	-	220	247	214	172-175	242	229-235	-	205	255
<i>E. myrmecophorum</i>	212-216	265	327-329	375-378	-	237-242	214	172-175	207-211	229-231	-	205	254
<i>E. purpureum</i>	212	265-270	328-341	375-377	215-218	233-237	214	172-175	207-211	232	172	205	254
<i>E. ibaguense</i>	208	265	300	-	218-220	269-271	214	172-175	208-210	231	172	205	254
<i>E. radicans</i>	210	265-272	308	374-376	221-227	258-260	214	172-175	243	231	-	205	252
<i>E. incisum</i>	210	266-275	329-331	376-382	242	241	214	172-175	221-247	229-233	-	205	254
<i>E. cinnabarinum</i>	210-212	266-270	325	376	-	-	214	172-175	244-246	232	-	205	252
<i>E. martianum</i>	210-215	262-265	320-325	-	218	260	214	172-175	226-230	229-231	197	205	258
<i>E. flexuosum</i>	208	265	336	-	225	250-252	214	172-175	-	231	275	205	253
<i>E. ramosum</i>	210-212	264-266	327-330	-	220	242	213-214	172-175	246	232	-	205	246
<i>E. saxatile</i>	210	266	339	-	226	234-236	214	172-175	203-205	229-231	196	205	209
<i>E. cristatum</i>	212	266	324-326	370	218-220	258	213	172-175	207	231	-	205	253
<i>E. purpurascens</i>	210	266	323-336	-	218	248-252	213-220	172-175	207-209	226-231	-	205	253
<i>E. ciliare</i>	222	264-266	325-329	339-340	218	259	214	172-175	214-218	227-232	219	205	259
<i>E. nocturnum</i>	211	264-266	329-336	372-380	217	239-242	214	172-175	220	227-233	-	205	253
<i>E. cooperianum</i>	216	-	323-326	373	219-222	261-263	213	172-175	237	231	-	205	253
<i>E. warasi</i>	216	264-266	318-330	372	218	264-272	214-218	172-175	219	231-237	196	205	246-253
<i>E. avicola</i>	210-213	264-266	323-325	272	-	253	213	172-175	220	232	-	205	254
<i>E. schlechterianum</i>	210	264-266	328	375	228-234	248	213-214	172-175	220	232	-	205	253
<i>E. coronatum</i>	210	262-266	318-323	373	226-228	242	213	172-175	238	231	152-172	205	249-256
<i>E. filicaule</i>	219	264-266	329-330	335	218	264-274	214	172-175	221	233-239	172	205	253
<i>E. chlorinum</i>	215	264-266	323-325	-	218	251	214	172-175	218-220	229-232	-	205	254
<i>E. tridactylum</i>	210-213	270-277	321-329	335	218-224	236	213	172-175	192	231-238	197-219	205	253
<i>E. vesicatum</i>	216	264-266	-	335	218-220	260-266	213	172-175	219-226	231	120-172	205	254
<i>E. latilabre</i>	210	264-266	328-338	374	216-226	268-270	213	172-175	247	231	-	205-209	253
<i>E. fulgens</i>	210-212	266	343-345	371-375	215	256-266	214	172-175	221-247	232	142	205	253
<i>E. puniceoluteum</i>	210-212	264-266	333-347	373-377	215-218	251-272	214	172-175	247	232	-	205	253

§Markers isolated by Pinheiro et al (2008b); ΨMarkers isolated by Pinheiro et al (2008a); *Markers isolated by Cortés-Palomec et al (2008).

Table S3. Size range of the PCR products, number of observed alleles (A), expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho) and the significance of the test for departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE - Significant departures from HWE: $P < 0,001$), for the microsatellite loci (indicated by rows) that were not successful polymorphic (monomorphic), or not amplified (na) in most of the five *Epidendrum* species. The size range of the original alleles described for the authors is indicated in parentheses on the bottom of each locus.

Locus	Species	size range	A	He	Ho	HWE
EPP10 (234–250)	<i>E. campestre</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. densiflorum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. denticulatum</i>	252-274	9	0.836	0.900	ns
	<i>E. rigidum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	246-278	10	0.903	0.833	***
EPP89 (284-290)	<i>E. campestre</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. densiflorum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. denticulatum</i>	279-291	6	0.200	0.432	***
	<i>E. rigidum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	na	-	-	-	-
EPP96 (291-299)	<i>E. campestre</i>	286-302	5	0.643	0.765	ns
	<i>E. densiflorum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. denticulatum</i>	282-310	9	0.849	0.500	***
	<i>E. rigidum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	286-308	8	0.795	0.450	***
EFF29 (185–229)	<i>E. campestre</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. densiflorum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. denticulatum</i>	193-225	13	0.920	0.850	***
	<i>E. rigidum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	na	-	-	-	-
EFF43 (148–160)	<i>E. campestre</i>	150	monomorphic	-	-	-
	<i>E. densiflorum</i>	150	monomorphic	-	-	-
	<i>E. denticulatum</i>	150-154	3	0.405	0.400	***
	<i>E. rigidum</i>	150	monomorphic	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	150	monomorphic	-	-	-
EFF70 (321–349)	<i>E. campestre</i>	353-369	7	0.800	0.800	ns
	<i>E. densiflorum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. denticulatum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. rigidum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	na	-	-	-	-

Significant departures from HWE: ns – not significant; *** $P < 0.05$.

Table S3. Continued.

Locus	Species	size range	No. of alleles	He	Ho	HWE
Lspe-4 (176–189)	<i>E. campestre</i>	213	monomorphic	-	-	-
	<i>E. densiflorum</i>	212	monomorphic	-	-	-
	<i>E. denticulatum</i>	213	monomorphic	-	-	-
	<i>E. rigidum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	213	monomorphic	-	-	-
Lspe-6 (176–185)	<i>E. campestre</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. densiflorum</i>	172	monomorphic	-	-	-
	<i>E. denticulatum</i>	172	monomorphic	-	-	-
	<i>E. rigidum</i>	173-175	2	0.097	0.100	ns
	<i>E. secundum</i>	172	monomorphic	-	-	-
Lspe-8 (222–239)	<i>E. campestre</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. densiflorum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. denticulatum</i>	247-251	5	0.773	0.150	***
	<i>E. rigidum</i>	246	monomorphic	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	na	-	-	-	-
Lspe-9 (190–206)	<i>E. campestre</i>	229	monomorphic	-	-	-
	<i>E. densiflorum</i>	219-235	6	0.767	0.400	-
	<i>E. denticulatum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. rigidum</i>	na	-	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	na	-	-	-	-
Lspe-11 (183–184)	<i>E. campestre</i>	204	monomorphic	-	-	-
	<i>E. densiflorum</i>	204	monomorphic	-	-	-
	<i>E. denticulatum</i>	204	monomorphic	-	-	-
	<i>E. rigidum</i>	204	monomorphic	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	204	monomorphic	-	-	-
Lspe-14 (221–233)	<i>E. campestre</i>	208	monomorphic	-	-	-
	<i>E. densiflorum</i>	243-251	5	0.792	0.368	***
	<i>E. denticulatum</i>	252	monomorphic	-	-	-
	<i>E. rigidum</i>	259	monomorphic	-	-	-
	<i>E. secundum</i>	252	monomorphic	-	-	-

Significant departures from HWE: ns – not significant; *** $P < 0.05$.

Table S4: Primer names, sequences and Genbank Accession numbers of 33 orchid species loci.

Name	Forward sequence	Reverse sequence	Genbank Accession
epp_8§	F: TGTTC AAGAACAACATCGGACT	R: TCTTGCTGGTTGGCATTATCT	EU326290
epp_10§	F: GGAGGCCAATGTGATGAAAC	R: TCGAATAAGCTCCTGCATCC	EU326291
epp_12§	F: GTCGGTGAGGGTCCAGAAA	R: CACCATCTTCTCTCCCCTGAG	EU326292
epp_17§	F: AGCACATCCGGGCCTAACTA	R: TGCCTGGCATCCATAATGAC	EU326293
epp_18§	F: TGCATACGTAACAACCTGGAGGT	R: GGAAGGTCATTCTAACCAGGAA	EU326294
epp_49§	F: GCAAAGGGAGACGATTTGAG	R: AGCATTTTTTCGCCCTTAACA	EU326295
epp_56§	F: ACGCTCTTTGGCTGGAAC T	R: CTCACATGCCTTTAGCCTCAC	EU326296
epp_86§	F: CAGCCTTTAGGCATTCTTG G	R: GCTCATTGGCCTTAGTGACC	EU326297
epp_89§	F: TTCTTGTTGTCGCCTTCGAT	R: TCAGAGAGCTCGTCCGACA	EU326298
epp_96§	F: TCTAACATGCGAAGGCAAAA	R: TTTGGTTGTTAAGCCCCATT	EU326299
eff_06Ψ	F: TCAAGCCTATCATAAGTGCTCCA	R: CCTTGTTGCAACTGGGTGTT	EU363791
eff_26Ψ	F: TGTCCTAAGTCAAGTGGGGTTT	R: TCCGAGTCTGTCGGTCTTTT	EU363792
eff_29Ψ	F: TCCGCTGATTTGAGTTTGCT	R: CTGGTCCCGTAAGATCAATCAC	EU363793
eff_43Ψ	F: TGCCCCACAGACAATTAAGC	R: CCTCGATGGAACCCCATAAT	EU363794
eff_45Ψ	F: TTGGGTTTCGTCTCACATCA	R: CCCTCAGTATCCGCCACTT	EU363795
eff_51Ψ	F: CTTGTCTACGTGAGGGCACTG	R: TCAACAACGTGAAAAGCCATC	EU363796
eff_58Ψ	F: TGAATGCTTATACTCTCCCATCA	R: AAGTGGCAAAGCACCATGTA	EU363797
eff_61Ψ	F: TGTCCTTATATCTGATGGTG	R: AGGGTTTTAGGTCAAAGTGCTC	EU363798
eff_70Ψ	F: CGCGAGATTGTTCCAAACC	R: GCTCCACGCAAAACCTTTTTTA	EU363799
Lspe_1*	F: AGAGAAAGCCCTTGTTGG	R: TCAGCTCTTCCGATTCTGGT	EF439820
Lspe_2*	F: GCAGATCCCACCATGAACTC	R: AATGTTGGAAATCGGTAGCA	EF439821
Lspe_3*	F: GCTTCAAGCAAGTGCAGAAA	R: AAGACAGGCCAACCAGAGAA	EF439822
Lspe_4*	F: GCATCGTTGAAGTTGCCAAT	R: TTTAGGGATCACCACCTTGG	EF439824
Lspe_5*	F: CCCACACAACCCCTGAACTA	R: ATGATTCGGGTTGACGAAAG	EF439825
Lspe_6*	F: GAAGCCCGTCGTCAGAAGTA	R: AAAAGAAGACCCCGAGCCTA	EF439826
Lspe_7*	F: CTTGAGGTGGGGAGTGATGT	R: GGCTTAGCTGTTTGGAAATCG	EF439827
Lspe_8*	F: AAGCTCCTAGTGCCTGCTTG	R: CATGTGGCTCTGGATTGTTG	EF439828
Lspe_9*	F: GGGGAAGAAATGCAAAC TAGC	R: CACAGGCATACGCACACAT	EF439829
Lspe_10*	F: TGGTTTGCTAAGTATTTCTTCAAGTT	R: TATGCAAAGCTTCCCCAAGT	EF439830
Lspe_11*	F: TGAATGCAAAAATCCAATTGCT	R: GAAATATTCAAGCACGATGATCC	EF439831
Lspe_12*	F: GGGGAAACAGAAGAAGGAAGA	R: AGACCTGGAGCAACTTTCCA	EF439832
Lspe_13*	F: TCTCTAAATACCATAAGTGGAGTGAAA	R: TTCAACCGAGAGCCACCTAC	EF439835
Lspe_14*	F: TGAGACGAAAAACCCATTCTT	R: GGTTACCAGCCATTCCCTTT	EF439836

§Markers isolated by Pinheiro et al (2008b); ΨMarkers isolated by Pinheiro et al (2008a); *Markers isolated by Cortés-Palomec et al (2008).

Capítulo 4

**Chloroplast microsatellite markers for the Neotropical orchid genus
Epidendrum, and cross-amplification in other Laeliinae species (Orchidaceae)**

Fábio Pinheiro, Clarisse Palma-Silva, Fábio de Barros, Leonardo P. Félix, Christian
Lexer, Salvatore Cozzolino, Mike F. Fay

Artigo publicado no periódico “Conservation Genetics Resources”,

DOI: 10.1007/s12686-009-9121-9.

Chloroplast microsatellite markers for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*, and cross-amplification in other Laeliinae species (Orchidaceae)

Fábio Pinheiro · Clarisse Palma-Silva · Fábio de Barros ·
Leonardo P. Félix · Christian Lexer · Salvatore Cozzolino ·
Mike F. Fay

Received: 2 October 2009 / Accepted: 4 October 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract One of the most significant challenges confronting orchid researchers is the lack of specific molecular markers, mainly for species in the Neotropics. Here we report the first set of specific chloroplast microsatellite primers (cpSSR) developed for Neotropical orchids. In total, nine polymorphic cpSSR loci were isolated and characterized in four species occurring in the Brazilian Atlantic Rainforest: *Epidendrum cinnabarinum*, *E. denticulatum*, *E. fulgens* and *E. puniceoluteum*. Levels of

intraspecific polymorphism were characterized using two populations for each species, with 13–20 individuals each. Allele numbers varied from two to three per locus, while the number of haplotypes ranged from three to six per species. Extensive differentiation among the taxa was detected. All markers were successfully cross-amplified in eight other different genera. These cpSSRs markers will enable novel insights into the evolution of this important Neotropical genus.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12686-009-9121-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. Pinheiro (✉)

Departamento de Botânica, Instituto de Biociências,
Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277,
São Paulo, SP 05508-900, Brazil
e-mail: biopinheiro@yahoo.com.br

C. Palma-Silva · M. F. Fay
Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens Kew,
Richmond, Surrey TW9 3DS, UK

F. de Barros
Instituto de Botânica, Seção de Orquidário do Estado,
São Paulo, SP 04301-012, Brazil

L. P. Félix
Departamento de Fitotecnia, Laboratório de Citogenética
Vegetal, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, Brazil

C. Lexer
Department of Biology, Unit of Ecology and Evolution,
University of Fribourg, 1700 Fribourg, Switzerland

S. Cozzolino
Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Complesso
Universitario di Monte S. Angelo, Università degli Studi di
Napoli Federico II, 80100 Naples, Italy

Keywords Orchidaceae · *Epidendrum* ·
Marker development · Chloroplast microsatellites ·
Cross-amplification · Populations genetics

Noncoding chloroplast (cp) DNA markers are a valuable resource in plant phylogenetics and evolution. The uniparentally inherited nature of the cpDNA genome is particularly useful to detect historical demographic processes, such as range contractions, expansions, and fragmentation (Cozzolino et al. 2003; Hedrén et al. 2008). Of particular interest for population level studies are chloroplast microsatellites or simple sequence repeats (cpSSR), also known as chloroplast simple sequence repeats (Provan et al. 2001) due to the high amounts of polymorphisms recovered. When genus-specific cpSSR primers are not available, de novo sequencing of noncoding chloroplast regions is the most effective and efficient way to discover chloroplast microsatellites in wild species (Ebert and Peakall 2009).

One of the most significant challenges confronting orchid researchers is the lack of specific molecular markers (Peakall 2007). Specific cpSSRs for orchid species belonging mainly to temperate regions have been developed in the last few years (Fay and Cowan 2001; Hedrén et al. 2008; Ebert et al. 2009). On the other hand, there is a

Table 1 Description of chloroplast universal primers used to search for microsatellite regions in *Epidendrum cinnabarinum*, *E. denticulatum*, *E. fulgens* and *E. puniceoluteum*

Primer pairs (reference)	T_a (°C)	<i>E. cinnabarinum</i>		<i>E. denticulatum</i>		<i>E. fulgens</i>		<i>E. puniceoluteum</i>		Genbank accession no. ^a
		pb	SSR	pb	SSR	pb	SSR	pb	SSR	
<i>trnH^{GUG}</i> (1)– <i>psbA</i> (2)	55	837	T ₉	839	T ₁₁	839	T ₁₁	839	T ₁₁	GQ890570–GQ890573
<i>3' rps16</i> (3)– <i>5' trnK^{UUU}</i> (3)	55	513	(C ₁₁) (T ₁₂)	512	(C ₁₁) (T ₁₁)	512	(C ₁₀) (T ₁₁)	523	(C ₁₁) (T ₉)	GQ890574–GQ890577
<i>trnS^{UGA}</i> (4)– <i>trnI^{CAU}</i> (4)	48	931	T ₁₃	930	T ₁₂	929	T ₁₁	930	T ₁₂	GQ890578–GQ890581
<i>rpS4R2</i> (5)– <i>trnT^{GUU}</i> R (5)	50	476	A ₁₀	531	A ₉	520	A ₉	531	A ₉	GQ890582–GQ890585
<i>trnT^{GUU}</i> A (6)– <i>trnL^{UAA}</i> B (6)	48	549	T ₁₂	475	T ₉	551	T ₁₀	496	T ₉	GQ890586–GQ890589
<i>ndhJ</i> (3)– <i>trnL^{UAA}</i> E (6)	60	589	T ₉	603	T ₉	516	T ₁₀	618	T ₉	GQ890590–GQ890593
<i>trnL^{UAA}</i> C (6)– <i>trnF^{GAA}</i> F (6)	55	1017	(A ₉) (A ₁₀)	1018	(A ₉) (A ₉)	1019	(A ₉) (A ₉)	1002	(A ₉) (A ₉)	GQ890594–GQ890597
<i>ndhF</i> (3)– <i>rpl32R</i> (3)	48–58	mu								
<i>trnD^{GUC}</i> F (4)– <i>trnI^{GCU}</i> (4)	48–58	mu								
<i>psaI</i> (3)– <i>accD</i> (3)	58	516	–	728	–	727	–	728	–	GQ890598–GQ890601
<i>psbMF</i> (5)– <i>trnD^{GUC}</i> R (4)	48–58	mu								
<i>rpl32F</i> (3)– <i>trnL^{UAG}</i> (3)	58	805	–	801	–	791	–	801	–	GQ890602–GQ890605
<i>trnC^{CAA}</i> F (4)– <i>psbMR</i> (5)	48–58	mu								
<i>rpl16F71</i> (7)– <i>rpl16R1516</i> (7)	48–58	mu								
<i>atpI</i> (3)– <i>atpH</i> (3)	48–58	na								

Annealing temperature (T_a), size of the amplified product (base pairs) and microsatellite motif (SSR) are included

References 1, Tate and Simpson (2003); 2, Sang et al. (1997); 3, Shaw et al. (2007); 4, Demesure et al. (1995); 5, Shaw et al. (2005); 6, Taberlet et al. (1991); 7, Small et al. (1998)

–, microsatellite region absent; mu, region not sequenced due to amplification with multiple bands; na, amplification failed

Table 2 Characteristics of chloroplast microsatellite loci in *Epidendrum cinnabarinum*, *E. denticulatum*, *E. fulgens* and *E. puniceoluteum*, including locus name and region from which it was isolated, primer sequences, repeat type (SSR), allele size range, no. of alleles (A) and expected heterozygosity (HE) for each population

Locus (region)	Primer sequences ^a	Species (population code)	SSR	Size	A	H _E
Epcp-01 (<i>trnH-psbA</i>)	F: TTTTGAACATAGAAAAGCAATCC	<i>E. cinnabarinum</i> (PI)	T ₆ -T ₁₀	150-154	2	0.282
	R: GATTCGGATAGAGAAGCAAAA	<i>E. cinnabarinum</i> (RR)	T ₁₀	154	1	0.000
Epcp-02 (<i>rps16-trnK</i>)	F: TTC TTGCTTCTTTTGTGGA R: ATTTGTTGATACGCCATTG	<i>E. denticulatum</i> (AL)	T ₁₀ -T ₁₁	154-155	2	0.458
		<i>E. denticulatum</i> (PC)	T ₁₁ -T ₁₃	155-157	2	0.439
		<i>E. fulgens</i> (IT)	T ₁₁ -T ₁₂	155-156	2	0.133
		<i>E. fulgens</i> (ST)	T ₁₁	155	1	0.000
		<i>E. puniceoluteum</i> (CO)	T ₁₀ -T ₁₁	154-155	2	0.198
		<i>E. puniceoluteum</i> (GU)	T ₁₁	155	1	0.000
		<i>E. cinnabarinum</i> (PI)	C ₈ -C ₁₁	267-270	3	0.666
		<i>E. cinnabarinum</i> (RR)	C ₈	267	1	0.000
		<i>E. denticulatum</i> (AL)	C ₁₁	270	1	0.000
		<i>E. denticulatum</i> (PC)	C ₁₀	269	1	0.000
		<i>E. fulgens</i> (IT)	C ₈ -C ₁₀	267-269	2	0.133
		<i>E. fulgens</i> (ST)	C ₈	267	1	0.000
Epcp-03 (<i>rps16-trnK</i>)	F: GTGCTAATTCAACGCAA R: TTAAAAGCCGAGTACTCTACC	<i>E. puniceoluteum</i> (CO)	C ₈ -C ₁₁	267-270	3	0.444
		<i>E. puniceoluteum</i> (GU)	C ₁₁	270	1	0.000
		<i>E. cinnabarinum</i> (PI)	T ₁₂	218	1	0.000
		<i>E. cinnabarinum</i> (RR)	T ₉	215	1	0.000
		<i>E. denticulatum</i> (AL)	T ₁₂	218	1	0.000
		<i>E. denticulatum</i> (PC)	T ₉	215	1	0.000
		<i>E. fulgens</i> (IT)	T ₁₀ -T ₁₁	216-217	2	0.133
		<i>E. fulgens</i> (ST)	T ₁₁	217	1	0.000
		<i>E. puniceoluteum</i> (CO)	T ₉ -T ₁₁	215-217	2	0.105
		<i>E. puniceoluteum</i> (GU)	T ₉	215	1	0.000
		<i>E. cinnabarinum</i> (PI)	T ₁₃	113	1	0.000
		Epcp-04 (<i>trnS-trnM</i>)	F: TGCATCATGAAGGGATTGGA R: ACATGTCGACTCCATGTCCA	<i>E. cinnabarinum</i> (RR)	T ₁₃	113
<i>E. denticulatum</i> (AL)	T ₁₂			112	1	0.000
<i>E. denticulatum</i> (PC)	T ₁₂ -T ₁₃			112-113	2	0.439
<i>E. fulgens</i> (IT)	T ₁₁			111	1	0.000
<i>E. fulgens</i> (ST)	T ₁₁			111	1	0.000
<i>E. puniceoluteum</i> (CO)	T ₁₁ -T ₁₂			111-112	2	0.280
<i>E. puniceoluteum</i> (GU)	T ₁₂			112	1	0.000

Table 2 continued

Locus (region)	Primer sequences ^a	Species (population code)	SSR	Size	A	H _E	
Epcp-05 (<i>trpS4-trmI</i>)	F: TGTCGGGTCACCGATCTATT	<i>E. cinnabarinum</i> (PI)	A ₁₁	141	1	0.000	
	R: GGAACCTTCAAGCGAAGTTTACG	<i>E. cinnabarinum</i> (RR)	A ₁₀	140	1	0.000	
		<i>E. denticulatum</i> (AL)	A ₉	139	1	0.000	
		<i>E. denticulatum</i> (PC)	A ₉	139	1	0.000	
		<i>E. fulgens</i> (IT)	A ₉	139	1	0.000	
		<i>E. fulgens</i> (ST)	A ₉	139	1	0.000	
		<i>E. puniceoluteum</i> (CO)	A ₉	139	1	0.000	
		<i>E. puniceoluteum</i> (GU)	A ₉	139	1	0.000	
		<i>E. cinnabarinum</i> (PI)	A ₁₀	191	1	0.000	
		<i>E. cinnabarinum</i> (RR)	A ₉	190	1	0.000	
		<i>E. denticulatum</i> (AL)	A ₉	190	1	0.000	
		<i>E. denticulatum</i> (PC)	A ₉	190	1	0.000	
		<i>E. fulgens</i> (IT)	A ₉ -A ₁₀	190-191	2	0.133	
		<i>E. fulgens</i> (ST)	A ₉	190	1	0.000	
Epcp-06 (<i>trmL-trmF</i>)	F: CCTAGCCCCCTGAAITTTCTTAG	<i>E. puniceoluteum</i> (CO)	A ₉	190	1	0.000	
	R: CTTCCAATCCAATCTCAATTG	<i>E. puniceoluteum</i> (GU)	A ₉	190	1	0.000	
		<i>E. cinnabarinum</i> (PI)	A ₉	220	1	0.000	
		<i>E. cinnabarinum</i> (RR)	A ₉ -A ₁₀	220-221	2	0.133	
		<i>E. denticulatum</i> (AL)	A ₉	220	1	0.000	
		<i>E. denticulatum</i> (PC)	A ₉	220	1	0.000	
		<i>E. fulgens</i> (IT)	A ₉	220	1	0.000	
		<i>E. fulgens</i> (ST)	A ₉	220	1	0.000	
		<i>E. puniceoluteum</i> (CO)	A ₉	220	1	0.000	
		<i>E. puniceoluteum</i> (GU)	A ₉	220	1	0.000	
		<i>E. cinnabarinum</i> (PI)	T ₁₂	90	1	0.000	
		<i>E. cinnabarinum</i> (RR)	T ₉	87	1	0.000	
		<i>E. denticulatum</i> (AL)	T ₉	87	1	0.000	
		<i>E. denticulatum</i> (PC)	T ₉	87	1	0.000	
Epcp-07 (<i>trmL-trmF</i>)	F: TGAGATTGGATTGGAAGAAGA	<i>E. fulgens</i> (IT)	T ₉ -T ₁₀	87-88	2	0.133	
	R: TGAGGGTTCAAAGTCCCTCTA	<i>E. fulgens</i> (ST)	T ₁₀	88	1	0.000	
		<i>E. puniceoluteum</i> (CO)	T ₉ -T ₁₀	87-88	2	0.280	
		<i>E. puniceoluteum</i> (GU)	T ₉	87	1	0.000	
	Epcp-08 (<i>trmT-trmL</i>)	F: AGTGCATCTTTGAAATAGTGGA	<i>E. cinnabarinum</i> (PI)	T ₁₂	90	1	0.000
		R: TCAATGAAATGAGAATTCAAAA	<i>E. cinnabarinum</i> (RR)	T ₉	87	1	0.000
		<i>E. denticulatum</i> (AL)	T ₉	87	1	0.000	
		<i>E. denticulatum</i> (PC)	T ₉	87	1	0.000	
		<i>E. fulgens</i> (IT)	T ₉ -T ₁₀	87-88	2	0.133	
		<i>E. fulgens</i> (ST)	T ₁₀	88	1	0.000	
		<i>E. puniceoluteum</i> (CO)	T ₉ -T ₁₀	87-88	2	0.280	
		<i>E. puniceoluteum</i> (GU)	T ₉	87	1	0.000	

Table 2 continued

Locus (region)	Primer sequences ^a	Species (population code)	SSR	Size	A	H _E
Epcp-09 (<i>ndhJ-trnL</i>)	F: TAGGATGATGCACGGGAAA	<i>E. cinnabarinum</i> (PI)	T ₉ -T ₁₀	241-242	2	0.384
	R: GGGGGTTTTTATCAATTGAGGA	<i>E. cinnabarinum</i> (RR)	T ₉ -T ₁₀	241-242	2	0.505
		<i>E. denticulatum</i> (AL)	T ₉	241	1	0.000
		<i>E. denticulatum</i> (PC)	T ₉ -T ₁₀	241-242	2	0.439
		<i>E. fulgens</i> (IT)	T ₁₁	243	1	0.000
		<i>E. fulgens</i> (ST)	T ₁₀ -T ₁₁	242-243	2	0.400
		<i>E. puniceoluteum</i> (CO)	T ₉ -T ₁₀	241-242	2	0.280
		<i>E. puniceoluteum</i> (GU)	T ₉	241	1	0.000

Locus Epcp-05 and Epcp-07 were monomorphic for all populations tested. Genbank accession n°s GQ890606–GQ890614

complete lack of specific cpSSRs for species-rich Neotropical orchid groups, limiting the options for population level research on those taxa.

The target group for the present study is the genus *Epidendrum*, the largest (1500 species) and most widespread (South United States to North Argentina) Neotropical orchid genus (Hágsater and Soto Arenas 2005). *Epidendrum* is famous for its taxonomic uncertainties regarding taxa delimitation in many species complexes, as many of those taxa show an impressive morphological diversification. Studies in *Epidendrum* are mainly limited to the description of new species, and the evolutionary processes involved in species radiation of this genus are poorly understood.

Here, we report on the development of a set of polymorphic chloroplast microsatellite markers for *Epidendrum cinnabarinum*, *E. denticulatum*, *E. fulgens* and *E. puniceoluteum* that will be useful in addressing questions on evolutionary processes shaping the phylogeographic and genetic structure of these species, thus serving evolutionary and conservation purposes.

Total genomic DNA was extracted from silica gel-exsiccated leaves from four *Epidendrum* target species following the protocol of Pinheiro et al. (2008). cpSSR regions were isolated from *E. cinnabarinum*, *E. denticulatum*, *E. fulgens* and *E. puniceoluteum* by sequencing 15 noncoding regions of chloroplast DNA, based on polymorphism levels described in Shaw et al. (2005, 2007). Briefly, the chloroplast DNA fragments of each species were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using universal chloroplast primer pairs described in Table 1. All PCR were carried out in a total volume of 20 µl containing: 10 ng template, 1× Bionline PCR buffer, 2 mM Bionline MgCl₂, 100 µM dNTPs, 20 pmol forward primer, 20 pmol reverse primer, and 2U *Taq* polymerase (Bionline, London, UK). Reactions were performed in a PE Applied Biosystems 9700 thermocycler by using a standard cycling program: 95°C for 3 min, 38 cycles of 94°C for 30 s, T_a (annealing temperature—Table 1) for 30 s, 72°C for 30 s and a final elongation step at 72°C for 10 min. Products were purified (QIAquick, West Sussex, UK) and sequenced using the BigDye terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and a 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Forward and reverse sequences were edited in SeqMan 5.01 software (Lasergene 7.0, DNASTAR Inc.) and multiple sequence alignments were generated with MegAlign software (Lasergene 7.0, DNASTAR Inc.) using the ClustalW option. Based on sequence alignments, specific primers were designed to match regions conserved across the four *Epidendrum* species, flanking cpSSRs with nine or more uninterrupted mononucleotide repeats using Primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

To analyze the polymorphisms of the isolated cpSSR loci, a total of 130 samples were collected from eight natural populations (two for each species) distributed along the Brazilian Atlantic Rainforest (Table 2). Genomic DNA was extracted as described before. For each SSR, the forward primers were synthesized with a 19-bp long 5M13 tail (5'-CACGACGTTGTAACGAC-3') following Schuelke (2000). PCR amplifications, genotyping and allele scoring were performed according to Pinheiro et al. (2008). To ascertain the basis of the observed polymorphism, we sequenced a large proportion of the different length variants for each locus. This allowed us to separately analyze mononucleotide repeat variation from insertion-deletion (indel) variation.

Each locus was characterized for levels of diversity using the number of alleles detected and the gene diversity (H_E) according to Nei (1978). CpSSR length variation was combined to define the haplotype of each individual, and levels of diversity of each population were characterized using the number of haplotypes and the analysis of molecular variance (AMOVA), using the software ARLEQUIN 3.01 (Excoffier et al. 2005). Furthermore, cross-genera amplification tests were performed with these loci on eight related genera from subtribe Laeliinae (Table S2), using the same amplification conditions described above.

Seven regions out of the 15 universal chloroplast regions tested contained microsatellite loci (Table 1). The *rps16/trnK^{UUU}* and *trnL^{UAA}/trnF^{GAA}* regions contained two microsatellite loci each. In total, primers were designed for nine loci (Table 2), and all of them were polymorphic within and/or among species. Between one and three alleles were detected per polymorphic locus, and genetic diversity ranged between 0 and 0.66 (Table 2). The sequencing of polymorphic alleles revealed that the polymorphisms were, indeed, restricted to length variation occurring in the mononucleotide repeats. The number of haplotypes ranged from three to six per species. Unique haplotypes were found for different species and populations (Fig. S1). The analysis of molecular variance (AMOVA) across all populations and species revealed extensive and significant ($P < 0.001$) differentiation among the four species (32.5%), among populations within species (51.6%) and within populations (15.9%). All loci were successfully amplified in the related genera tested for their cross-amplification potential, showing PCR products with the expected allele sizes across all tested species (Table S2).

The results showed that these loci provide cpSSR markers with polymorphisms at different levels, useful in species delimitation, inter and intraspecific phylogeographic studies and for characterization of historical demographic processes. The extensive difference in chromosome numbers and hybridization events reported for many *Epidendrum* species (Hågsater and Soto Arenas

2005) imposes many challenges for molecular marker-based research on this genus. In such groups, results obtained with nuclear markers alone are often difficult to interpret due to independent events of polyploidization and hybridization (Hedrén et al. 2008). Differences in ploidy levels and chromosome numbers do not affect results obtained with organellar markers. Furthermore, when results from nuclear marker loci are combined with results from chloroplast markers, the direction and extension of introgression can be measured (Lexer et al. 2005), facilitating the depiction of complex scenarios of hybridization and species radiation. Chloroplast markers are tools that can overcome these challenging characteristics of *Epidendrum*, and the loci described and characterized here should be useful for population studies both in *Epidendrum* species and in related genera, thus contributing to the knowledge on diversification processes and conservation strategies in South American orchids.

Acknowledgments We thank Felipe N. M. de Assis for help during field work, Robyn S. Cowan, Dion Devey and Edith Kapinos for helping in the laboratory. This research was funded by grants from the Prance Fellowship in Neotropical Botany under the Kew Latin American Research Fellowship Programme (KLARF) to FP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—471929/2006-9) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP—06/54189-3) to FB. FP received fellowship from CNPq.

References

- Cozzolino S, Noce ME, Musacchio A, Widmer A (2003) Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetic bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (Orchidaceae). *Am J Bot* 90:1681–1687
- Demesure B, Sodzi N, Petit RJ (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol Ecol* 4:129–131
- Ebert D, Peakall R (2009) Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. *Mol Ecol Resour* 9:673–690
- Ebert D, Hayes C, Peakall R (2009) Chloroplast simple sequence repeat markers for evolutionary studies in the sexually deceptive orchid genus *Chiloglottis*. *Mol Ecol Resour* 9:784–789
- Excoffier L, Laval LG, Schneider S (2005) ARLEQUIN version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50
- Fay M, Cowan RS (2001) Plastid microsatellites in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae): genetic fingerprints from herbarium specimens. *Lindleyana* 16:151–156
- Hågsater E, Soto Arenas MA (2005) *Epidendrum* L. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) *Genera Orchidacearum* 4. Oxford University Press, Oxford, pp 236–251
- Hedrén M, Nordström S, Ståhlberg D (2008) Polyploid evolution and plastid DNA variation in the *Dactylophiza incarnatalmaculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia. *Mol Ecol* 17:5075–5091
- Lexer C, Fay MF, Joseph JA, Nica MS, Heinze B (2005) Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species,

- P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. *Mol Ecol* 14:1045–1057
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–590
- Peakall R (2007) Speciation in the Orchidaceae: confronting the challenges. *Mol Ecol* 16:2834–2837
- Pinheiro F, Santos MO, Barros F, Meyer D, Salatino A, Souza AP, Cozzolino S (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in the Brazilian orchid *Epidendrum fulgens*. *Conserv Genet* 9:1661–1663
- Provan J, Powell W, Hollingsworth PM (2001) Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 16:142–147
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am J Bot* 84:1120–1136
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233–234
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92:142–166
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am J Bot* 94:275–288
- Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, Seelanan T, Wendel JF (1998) The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogenetic reconstruction in a recently diverged plant group. *Am J Bot* 85:1301–1315
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17:1105–1109
- Tate JA, Simpson BB (2003) Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst Bot* 28:723–737

Table S1: *Epidendrum* species used to develop the chloroplast microsatellite loci, including population origin, number of individuals sampled (n) and voucher information.

Species	Locality – State (code)	n	Voucher ^a
<i>E. cinnabarinum</i>	Pirambú – SE (PI)	13	F. Pinheiro <i>et al.</i> 578
	Serraria – PB (RR)	20	F. Pinheiro <i>et al.</i> 579
<i>E. denticulatum</i>	Alcobaça – BA (AL)	16	F. Pinheiro <i>et al.</i> 580
	Rio de Janeiro – RJ (PC)	14	F. Pinheiro <i>et al.</i> 581
<i>E. fulgens</i>	Itajaí – SC (IT)	15	F. Pinheiro <i>et al.</i> 582
	Porto Alegre – RS (ST)	16	F. Pinheiro <i>et al.</i> 583
<i>E. puniceoluteum</i>	Ilha Comprida – SP (CO)	19	F. Pinheiro <i>et al.</i> 584
	Pontal do Sul – PR (GU)	17	F. Pinheiro <i>et al.</i> 585

^aVouchers are deposited in the Herbarium SP (Instituto de Botânica, São Paulo, Brazil).

SE, Sergipe; PB, Paraíba; BA, Bahia; RJ, Rio de Janeiro; SC, Santa Catarina; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo; PR, Paraná States.

Table S2: Cross-species and genera amplification of nine chloroplast microsatellite loci developed for *Epidendrum* species, within the subtribe Laeliinae. The size of amplified alleles is indicated.

	Epcp-01	Epcp-02	Epcp-03	Epcp-04	Epcp-05	Epcp-06	Epcp-07	Epcp-08	Epcp-09
<i>Prostachea vespa</i>	143	260	275	107	139	193	222	84	241
<i>Encyclia patens</i>	142	261	275	108	138	190	220	90	241
<i>Hoffmensegella crispata</i>	143	268	274	110	140	190	220	90	242
<i>Hadrolaelia purpurata</i>	143	267	274	110	139	191	222	89	242
<i>Cattleya eldorado</i>	142	266	272	112	140	190	222	88	242
<i>Brassavola tuberculata</i>	143	222	276	109	140	189	223	92	241
<i>Sophronis cernua</i>	145	265	273	110	140	188	220	88	188
<i>Pseudolaelia cipoensis</i>	142	276	274	108	140	189	221	89	240

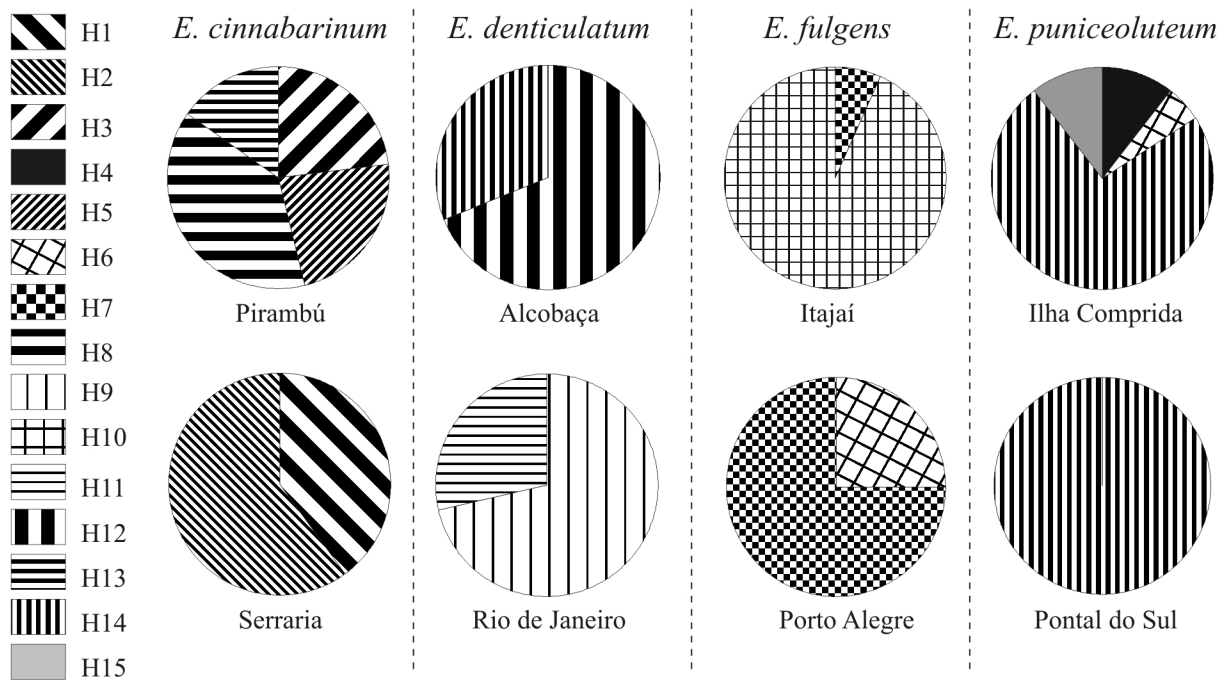


Figure 1: Haplotype frequencies found in natural populations of *E. cinnabarinum*, *E. denticulatum*, *E. fulgens* and *E. puniceoluteum*. Population names are indicated.

Discussão Geral e Conclusões

A presente tese é constituída de cinco trabalhos que fazem parte de um amplo projeto, que tem como objetivo contribuir para o entendimento de questões relacionadas à evolução, delimitação e isolamento reprodutivo de espécies da família Orchidaceae. O conjunto de dados obtidos nestes trabalhos descreve um panorama inicial que contribuirá para o preenchimento de lacunas do conhecimento existentes em Orchidaceae, e auxiliará na compreensão de aspectos da história evolutiva e da dinâmica das populações de espécies do gênero *Epidendrum*.

Inicialmente, marcadores nucleares do tipo microssatélites foram isolados e caracterizados para *Epidendrum fulgens* e *E. puniceoluteum*, totalizando 19 *loci*. O número de alelos e a diversidade genética observada em ambas espécies foram elevadas, indicando que os *loci* possuem um elevado potencial em análises que tenham como objetivo detectar eventos de hibridação e introgressão. Estes marcadores, em conjunto com os *loci* caracterizados para outra espécie da subfamília Laeliinae (*Laelia speciosa* -Cortes-Palomec et al. 2008), mostraram uma taxa de amplificação cruzada entre espécies de *Epidendrum* (total de 35 espécies) de 78%, maior do que o valor previamente publicado para monocotiledôneas (60% - Barbará et al. 2007). Estes resultados indicam que os marcadores isolados possuem potencial bastante elevado para serem utilizados em outras espécies de *Epidendrum*, constituindo uma ferramenta molecular importante para estudos evolutivos no gênero.

A caracterização de *loci* de microssatélites de cloroplasto também foi uma etapa importante do trabalho, uma vez que abre novas possibilidades e incentiva estudos desta natureza no gênero *Epidendrum*. Foi observado elevado poder de discriminação de populações e espécies, indicando que estes marcadores plastidiais são bastante promissores para estudos de genética de populações e filogeografia. Além disso, estes marcadores também foram amplificados em diferentes gêneros da subtribo Laeliinae, da qual *Epidendrum* faz parte, revelando-se uma ferramenta molecular importante para estudos futuros com espécies de orquídeas neotropicais.

Todas as seis populações simpátricas de *E. fulgens* e *E. puniceoluteum*, analisadas com marcadores nucleares e plastidiais, revelaram a presença de híbridos. Os dados obtidos com microssatélites nucleares foram analisados com métodos de atribuição Bayesianos, e os resultados indicaram que os indivíduos híbridos possuem

grande variação genotípica, podendo ser caracterizados híbridos do tipo F1 e introgressão assimétrica na direção de *E. puniceoluteum*. Os marcadores de cloroplasto revelaram que ambas as espécies parentais podem receber e doar pólen para a formação da geração F1. A introgressão na direção de *E. puniceoluteum* ocorre quando indivíduos F1 doam ou recebem o pólen de indivíduos de *E. puniceoluteum*. A ausência de polinizadores específicos para cada uma das espécies contribui para a grande quantidade de híbridos observados nas populações naturais analisadas. A diferença cromossômica entre as espécies (*E. fulgens*: $2x = 24$; *E. puniceoluteum*: $4x = 52$) não constitui uma barreira eficiente ao fluxo gênico entre as espécies.

Indivíduos puros de *E. fulgens* e *E. puniceoluteum* revelaram preferência por diferentes tipos de hábitat: dunas para a primeira espécie e áreas encharcadas para a segunda. Indivíduos híbridos puderam ser encontrados em ambos os tipos de hábitat, sugerindo uma amplitude ecológica maior que a das espécies parentais. Indivíduos híbridos não foram encontrados em habitats distintos daqueles em que as espécies parentais foram coletadas, indicando que os eventos de hibridação ainda não são suficientes para caracterizar eventos de especiação. O processo de hibridação na vegetação de restinga pode ser um processo evolutivo importante para as espécies deste tipo de ambiente, uma vez que promove o fluxo gênico entre espécies adaptadas a diferentes ambientes. A introgressão de elementos genômicos de *E. fulgens*, espécie adaptada às dunas arenosas, na direção de *E. puniceoluteum*, espécie adaptada a áreas encharcadas, produz indivíduos híbridos capazes de crescer nos dois tipos de ambientes. Estes indivíduos podem ser importantes para a sobrevivência de *E. puniceoluteum*, principalmente em períodos em que as áreas encharcadas diminuem de tamanho, tornando-se fragmentadas e ocupando uma área menor, em relação às dunas arenosas. Populações de *E. fulgens* são mais extensas e conectadas entre si do que populações de *E. puniceoluteum*, e o maior fluxo gênico entre populações de *E. fulgens* pode ser um mecanismo importante, que evita a existência de introgressão sobre esta espécie. A vegetação de restinga está submetida a uma dinâmica intensa que modifica a disponibilidade dos habitats nela encontrados, sendo muito influenciada por fatores abióticos, como salinidade e escassez de água, e fatores históricos, como o aumento e a diminuição do nível de água do oceano. Neste contexto, a hibridação interespecífica constitui um fator importante para a manutenção da biodiversidade, uma vez que promove a troca de elementos genômicos

entre espécies distintas, tornando possível a coexistência de diferentes espécies neste tipo de vegetação.

O presente trabalho abre diversas possibilidades de estudos futuros. Uma delas é a execução de experimentos de transplantes recíprocos, utilizando *E. fulgens*, *E. puniceoluteum* e indivíduos híbridos, com o objetivo de verificar a existência de diferentes preferências por hábitat nas espécies parentais, e confirmar a presença de uma maior amplitude ecológica nos híbridos. Uma vez que as plantas são facilmente propagadas vegetativamente, o sucesso reprodutivo de indivíduos com o mesmo genótipo, em hábitats distintos, pode ser facilmente verificado, conferindo maior poder de inferência ao experimento. A existência de fluxo gênico entre espécies com ploidias distintas é um evento interessante, que será investigado utilizando análises citogenéticas, através de análises de comportamento meiótico e bandejamento cromossômico. Eventos de hibridação também podem originar novas linhagens e espécies, e esta questão será estudada através de medidas de sucesso reprodutivo de indivíduos híbridos, em comparação com as espécies parentais, através da realização de cruzamentos artificiais.

Referências bibliográficas

- CORTÉS-PALOMECA, A.C.; MCCAULEY, R.A.; OYAMA, K. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Molecular Ecology Resources*, v. 8, p. 135-138. 2008.
- BARBARA, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, M.F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 3759-3767. 2007.

Resumo

Epidendrum L. é o maior gênero de Orchidaceae da região Neotropical com cerca de 1500 espécies, e os processos de diversificação no grupo são pouco conhecidos. Apesar de existirem muitos relatos sobre hibridação no gênero, não há trabalhos que tenham testado essa hipótese em populações naturais. *Epidendrum fulgens* Brongn. e *E. puniceoluteum* F. Pinheiro & F. Barros são espécies que ocorrem ao longo do litoral brasileiro, frequentemente em simpatria. Para testar a eficiência de suas barreiras reprodutivas, foi examinada a distribuição da variação genética dentro e entre populações simpátricas e alopátricas dessas duas espécies. Nove *loci* de microsátélites nucleares, e cinco *loci* de microssátélites de cloroplasto foram utilizados para genotipar 463 indivíduos de oito populações, ao longo de toda distribuição geográfica das espécies. A utilização de métodos de atribuição Bayesianos (programas STRUCTURE e NEWHYBRIDS) detectou a existência de grande quantidade de híbridos nas populações simpátricas. As zonas de hibridação são constituídas por híbridos F1, F2 e retrocruzamentos. A introgressão foi assimétrica, ocorrendo preferencialmente de *E. fulgens* para *E. puniceoluteum*. Na população da Ilha do Cardoso, foi detectada a predominância de indivíduos F1 e F2, enquanto nas demais localidades a maior parte dos indivíduos híbridos foi identificada como sendo retrocruzamentos na direção de *E. puniceoluteum*. Em Florianópolis, não foi possível observar a existência de indivíduos puros de *E. puniceoluteum*, apenas indivíduos exibindo fortes sinais de introgressão, revelando que o processo de hibridação pode interferir na integridade genética das espécies, levando um dos parentais à extinção. O presente estudo sugere que hibridação e introgressão podem ter papel importante na diversificação em *Epidendrum* e mostra a importância de investigar zonas de hibridação para melhor entender as barreiras reprodutivas e os processos de especiação nas espécies neotropicais de orquídeas.

Abstract

Among members of the genus *Epidendrum*, the largest orchid genus of the Neotropics, *E. fulgens* and *E. puniceoluteum* occur along the seashore in Brazilian Atlantic Rainforest in sympatric populations. To test the strength of their reproductive barriers, we examined the distribution of genetic variation within and among sympatric and allopatric populations of these two species. Nine specifically developed nuclear microsatellite loci and five chloroplast microsatellite loci were used to genotype 463 individuals from eight populations across species geographical range. All six sympatric populations analyzed present hybrid zones, indicating that hybridization between *E. fulgens* and *E. puniceoluteum* is a common phenomenon. Bayesian assignment analysis detected the presence of F₁ and F₂ individuals, and signs of introgression as well, demonstrating a high potential for interspecific gene flow. The introgression patterns are asymmetrical, with differences among populations. Introgression occurs preferentially from *E. fulgens* to *E. puniceoluteum*. In Florianópolis population the hybridization seems to lead a species erosion, where pure individuals of *E. puniceoluteum* were not found. This study suggests that hybridization and introgression could play an important role in the diversification of *Epidendrum*, and indicated the importance to investigate hybrid zones for better understanding reproductive barriers and speciation processes in Neotropical orchid species.