**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Relações filogenéticas e filogeográficas das espécies do complexo *Cattleya*
coccinea (Orchidaceae)**

Jucelene Fernandes Rodrigues

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2015**

Jucelene Fernandes Rodrigues
Ecóloga

**Relações filogenéticas e filogeográficas das espécies do complexo *Cattleya coccinea*
(Orchidaceae)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **ELIZABETH ANN VEASEY**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Rodrigues, Jucelene Fernandes

Relações filogenéticas e filogeográficas das espécies do complexo *Cattleya coccinea* (Orchidaceae) / Jucelene Fernandes Rodrigues. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
141 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Filogenia 2. Delimitação de espécies 3. Inferência bayesiana 4. Modelo coalescente
5. Filogeografia 6. *Cattleya* 7. *Sophranitis* 8. Pleistoceno 9. Floresta Atlântica Brasileira
10. Serra do Espinhaço 11. Conservação I. Título

CDD 635.93415
R697r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao meu marido, à minha mãe, ao meu pai (*in
memoriam*), aos meus irmãos e sobrinhos pelo
amor incondicional, apoio, compreensão e
paciência.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

À escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Genética pela oportunidade. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo 2011/18751-7 pela concessão das bolsas.

À profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey pela orientação, confiança e oportunidade. À profa. Dra. Samantha Koehler pela orientação, pelos ensinamentos, confiança e pela oportunidade. Ao prof. Dr. Giancarlo Conde Xavier Oliveira pela colaboração e pela disponibilização de uso do laboratório no início do projeto. Ao prof. Dr. Eduardo Luís Martins Catharino e seus estagiários pela colaboração, por permitir acesso ao no Orquidário Dr. Carlos Hoehne e cultivo das plantas coletadas. Ao prof. Dr. Cássio van den Berg pela colaboração, idéias e imenso conhecimento em orquídeas.

A todos os funcionários do Departamento de Genética por toda a ajuda e suporte em especial: Fernandinho, Macedônio, Marcos Cella, Josué, Décio, Carlos, Norberto, Capela, Berdan, Rogério, Léia e Wilma. Ao Orquidário Paulo Soderó Martins. Ao SISBIO pela autorização de coleta de plantas em Áreas de Proteção Ambiental. Ao IEMA pela autorização de coleta em Parques Estaduais do Espírito Santo, em especial à Savana, Marcelo, guarda Belo e Antônio. Ao Museu de Biologia Professor Mello Leitão/ES, à secretária Rose Loss e Rosemberg. Ao prof. Dr. Eric Smidt e Thiago Campacci pelas amostras referentes às localidades de Santa Catarina e Paraná. Ao Dr. Robinson Viegas dos Reis, presidente da Orquipira. À Bárbara Simões Leal por toda ajuda com as amostras e primers de microsatélites. À Maria Rita Cabral pela ajuda com a coleta e pela gentileza em nos receber em Paty dos Alferes/RJ. Aos amigos: prof. Dr. Wellington Ferreira do Nascimento, prof. Dr. Thiago Mezette, Iradenia Sousa, Ana Cláudia Cuenca, pelas conversas, momentos divertidos, viagens e ajuda no laboratório. Aos companheiros de lab. Tatiane, Thais que também me ajudou no lab., Adriana, Nancy, Santiago e Gabriel.

E principalmente às pessoas mais importantes: meu marido Antonio Carlos pelo amor e pelo apoio e paciência infinitos, pela ajuda nas viagens, coletas e correção da tese. À minha mãe Aparecida, meu pai Jaime (*in memoriam*), meus irmãos Jussara, Cléber e Haiton, meus sobrinhos: Alexandre, Ana Clara, Airi, Daiki e Aika, pelo amor, apoio e paciência em momentos que estive ausente.

"Somewhere beyond wrong and right, there will be
a garden. I will meet you there".

(Rumi)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos gerais	17
1.1.1 Objetivos específicos	17
1.2 Revisão Bibliográfica	17
1.2.1 As espécies do clado <i>Cattleya coccinea</i>	17
1.2.2 A Filogenia como ferramenta para a delimitação de espécies.....	21
1.2.3 Implicações da genética de populações em estudos filogeográficos	25
Referências	28
2 RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DO COMPLEXO ' <i>Cattleya coccinea</i> ' (ORCHIDACEAE)	36
Resumo	36
Abstract.....	38
2.1 Introdução	38
2.1.1 Objetivos.....	41
2.2 Materiais e Métodos	41
2.2.1 Coleta de indivíduos	41
2.2.2 Extração de DNA.....	42
2.2.3 Amplificação de sequências de DNA.....	49
2.2.4 Amplificação de marcadores microsatélites	50
2.2.5 Análises de dados	52
2.2.5.1 Monofiletismo do complexo ' <i>Cattleya coccinea</i> '	52
2.2.5.2 Delimitação de espécies.....	53
2.2.5.3 Árvore de espécies.....	55
2.3 Resultados.....	55
2.3.1 Árvores de genes	55
2.3.2 Monofiletismo de ' <i>C. coccinea</i> '	56
2.3.3 Relações filogenéticas em ' <i>C. coccinea</i> '	61
2.3.4 Análises de filiação de indivíduos	64
2.3.5 Árvore de espécies.....	67

2.4 Discussão	68
2.4.1 Monofiletismo do complexo ' <i>C. coccinea</i> '	68
2.4.2 Delimitação de espécies	70
2.5 Conclusões	74
Referências	75
3 FILOGEOGRAFIA DE ORQUÍDEAS AMEAÇADAS DO COMPLEXO	
' <i>Cattleya coccinea</i> ' DA FLORESTA ATLÂNTICA BRASILEIRA E	
SERRA DO ESPINHAÇO.....	83
Resumo.....	83
Abstract	84
3.1 Introdução	84
3.1.2 Objetivos	87
3.2 Materiais e métodos	88
3.2.1 Localidades de amostragem e extração de DNA	88
3.2.2 Amplificação de DNA e escolha de iniciadores microsatélites.....	89
3.2.3 Sequenciamento de regiões de cpDNA e rDNA	94
3.2.4 Análises dos dados de microsatélites	95
3.2.5 Análises da sequências de DNA	96
3.3 Resultados	99
3.3.1 Marcadores microsatélites	99
3.3.2 Análises das sequências de DNA.....	107
3.4 Discussão	123
3.4.1 Diversidade genética.....	123
3.4.2 Estruturação genética	125
3.4.3 Fluxo gênico via pólen x via sementes	127
3.4.4 Diversificação do clado <i>C. coccinea</i> em Paleocenários.....	127
3.4.5 Implicações para a conservação	130
3.5 Conclusões	130
Referências	131
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	141

RESUMO

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E FILOGEOGRÁFICAS DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO ‘*Cattleya coccinea*’ (ORCHIDACEAE)

Delimitar espécies e reconstruir a história evolutiva em complexos de espécies pode demandar grandes esforços uma vez que grupos taxonomicamente problemáticos são muitas vezes consequência de eventos de especiação recente ou de rápida especiação. O complexo ‘*Cattleya coccinea*’, da família Orchidaceae, é composto por orquídeas com alto valor ornamental, epifíticas e rupícolas de porte pequeno. Apesar de estarem descritas com caracteres morfológicos diagnósticos claros que permitem sua identificação, a delimitação das espécies atualmente reconhecidas é problemática. Portanto, os objetivos dessa pesquisa foram revisar a delimitação de espécies do complexo e a relação entre as espécies, além de avaliar a diversidade e estrutura genética, aliadas às análises filogeográficas para testar a ocorrência de eventos demográficos históricos. Para responder tais questões foram utilizadas regiões de sequência de cpDNA e nrDNA, 11 locos microssatélites, além de inferência bayesiana e modelo coalescente somadas às estatísticas tradicionais como metodologia. Os resultados suportam o monofiletismo para o clado para as regiões de cpDNA concatenadas. Indicam também quatro grandes eventos de reticulação das espécies do clado *C. coccinea* com outras espécies do gênero *Cattleya*. Adicionalmente, suportam o reconhecimento de sete diferentes espécies para o clado *C. coccinea*, composto por duas principais linhagens evolutivas mais ao norte da região Sudeste: *C. brevipedunculata* predominante da Serra do Espinhaço e *C. wittigiana* do norte da Serra do Mar. E cinco espécies distribuídas ao longo da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (*C. coccinea*, *C. mantiqueirae*, e mais três espécies correspondentes às populações de DMES; SJPSP e CSRS/JOSC/PMPR. As análises de diversidade mostraram de moderados a altos níveis de diversidade genética e apontam que as espécies *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* apresentam os maiores níveis de diversidade comparadas a outras espécies do clado. A estruturação genética entre populações dentro de espécies mostrou variação entre níveis baixos a altos. A análise de atribuição de indivíduos a partir de inferência bayesiana mostrou a formação de oito grupos geneticamente distintos. A análise de taxa de dispersão de fluxo gênico pólen x semente mostrou que a dispersão via pólen é aproximadamente oito vezes mais eficiente que a dispersão via sementes somente para *C. coccinea*. Além disso, a rede de haplótipos indicou que as espécies raramente compartilham haplótipos e que *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* apresentam maior diversidade com eventos de expansão. A análise de estimativa de tempo de divergência demonstrou que *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana* provavelmente se originaram entre o Plioceno e o Pleistoceno. As outras espécies do clado se diversificaram no Pleistoceno. Eventos de expansão populacional foram observados para todas as espécies em eras glaciais do Pleistoceno. Por se tratarem de espécies ameaçadas, esse estudo recomenda a conservação “*in situ*” como também a conservação “*ex situ*” de todas as espécies do clado, com atenção especial às duas espécies do Espírito Santo: *C. wittigiana* e a espécie da localidade DMES, além da espécie da localidade SJPSP em São Paulo.

Palavras-chave: Filogenia; Delimitação de espécies; Inferência bayesiana; Modelo coalescente; Filogeografia; *Cattleya*; *Sophronitis*; Pleistoceno; Floresta Atlântica Brasileira; Serra do Espinhaço; Conservação

ABSTRACT

PHYLOGENETIC AND PHYLOGEOGRAPHIC RELATIONSHIPS OF THE SPECIES OF THE COMPLEX '*Cattleya coccinea*' (ORCHIDACEAE)

Species delimitation and reconstruction of the evolutionary history of species complexes may require great efforts since taxonomically problematic groups are often a result of recent speciation events or rapid speciation. The '*Cattleya coccinea*' complex, of the orchid family, consists of epiphytic and small rupicolous orchids with high ornamental value. Despite being described with clear diagnostic morphological characters that allow their identification, delimitation of the currently recognized species is problematic. Therefore, the objectives of this study were to review the species delimitation of the complex and the relationship between species, and to evaluate the genetic diversity and structure, combined with phylogeographic analyzes to test the occurrence of historical demographic events. To answer such questions, cpDNA and nrDNA sequence regions, 11 microsatellite loci, and Bayesian inference and coalescent model were used, combined with traditional statistics and methodology. The results support the monophyly for the clade for concatenated cpDNA regions. They also indicate four major reticulation events of *C. coccinea* species clade with other species of the genus *Cattleya*. Additionally, results support the recognition of seven different species for *C. coccinea* clade, composed of two main evolutionary lineages further north in the Southeast: *C. brevipedunculata* predominant in the Serra do Espinhaço and *C. wittigiana* from northern Serra do Mar. And five species distributed along the Serra do Mar and Serra da Mantiqueira (*C. coccinea*, *C. mantiqueirae*, and three other species of the populations DMES; SJPSP and CSRS/JOSC/PMPR. The diversity analyzes showed moderate to high levels of genetic diversity and point out that the species *C. coccinea* and *C. brevipedunculata* have the highest levels of diversity compared to other species of the clade. The genetic structure of populations within species showed variation from low to high. Assigning individuals analysis from Bayesian inference showed the formation of eight genetically distinct groups. The dispersal rate analysis of pollen x seed gene flow showed that dispersal through pollen is approximately eight times more efficient than the dispersal through seeds only for *C. coccinea*. Furthermore, the haplotype network indicated that the species rarely share haplotypes and that *C. coccinea* and *C. brevipedunculata* present greater diversity with expansion events. The divergence time estimation analysis showed that *C. brevipedunculata* and *C. wittigiana* probably originated between the Pliocene and the Pleistocene. The other clade species have diversified in the Pleistocene. Population expansion events were observed for all species in the Pleistocene ice ages. Because they are endangered species, this study recommends the "*in situ*" conservation as well as "*ex situ*" conservation for all species of clade, with special attention for two species of Espírito Santo: *C. wittigiana* and the species of DMES locality, in addition to the species of SJPSP location in São Paulo.

Keywords: Phylogeny; Species delimitation; Bayesian inference; Coalescent model; Phylogeography; *Cattleya*; *Sophronitis*; Pleistocene; Brazilian Atlantic Forest; Serra do Espinhaço; Conservation

1 INTRODUÇÃO

Delimitar espécies e reconstruir a história evolutiva em complexos de espécies pode demandar grandes esforços uma vez que grupos taxonomicamente problemáticos são muitas vezes consequência de eventos de especiação recente ou de rápida especiação (MADDISON, 1997; FELSENSTEIN, 2004; MADDISON; KNOWLES, 2006). A retenção de polimorfismos ancestrais pode resultar em árvores de genes que são discordantes da árvore das espécies (MADDISON, 1997; MADDISON; KNOWLES, 2006). Além disso, linhagens recentemente isoladas muitas vezes não apresentam ainda um completo isolamento reprodutivo, por exemplo, em eventos de introgressão. Sendo assim, a existência de fluxo gênico entre linhagens, ainda que pequeno, é outra fonte potencial de discordância entre árvores de genes e a árvore de espécies (FUNK; OMLAND, 2003).

Apesar dos desafios, complexos de espécies constituem verdadeiros laboratórios naturais para a compreensão da importância relativa de fatores históricos e geográficos na origem e manutenção da diversidade biológica. Considerando que espécies podem ser definidas como linhagens compostas por conjuntos de metapopulações (populações inclusivas constituídas de subpopulações) que evoluem separadamente, sendo resultantes da atuação de processos em escalas temporais e espaciais múltiplas que atuam em indivíduos (de QUEIROZ, 2007; HART, 2011), a filogenia e filogeografia são atualmente abordagens mais apropriadas para estudos sobre delimitação de espécies (TEMPLETON, 2001; MORANDO et al., 2003). Deste modo, abordagens filogenéticas e filogeográficas podem ser utilizadas não apenas como critérios operacionais para identificação de espécies, mas também na identificação de processos históricos que moldaram a estrutura de populações com eventos de hibridação históricos, zonas híbridas, eventos de introgressão e barreiras geográficas importantes para o isolamento (AVISE et al., 1987; HICKERSON et al., 2010).

De forma complementar, as análises de genética de populações são utilizadas para inferir como a variabilidade genética está distribuída entre e dentro de populações e assim entender a contribuição do fluxo gênico, deriva genética, sistema reprodutivo, taxas de mutação e seleção natural na arquitetura genética de populações (ALLENDORF; LUIKART, 2006). Sequências não-codificadoras do genoma de plastídios são uma importante fonte de dados para estudos de filogenia e filogeografia (SCHAAL et al., 1998; SHAW et al., 2007). Seu tamanho populacional efetivo reduzido, em comparação com marcadores nucleares, resultam em taxas mais rápidas de reposição de novos genótipos na população, indicando de

forma mais clara padrões de fluxo gênico histórico (HUDSON; COYNE, 2002; PLEINES et al., 2009). Já marcadores do tipo microssatélites não são particularmente úteis como sequências de DNA na inferência de eventos evolutivos históricos. Entretanto, suas relativas altas taxas de polimorfismo fizeram deste marcador o mais utilizado em estudos de genética de populações, ecologia molecular e genética da conservação, uma vez que são informativos mesmo em populações pequenas e com baixa variabilidade genética (FREELAND, 2005; ALLENDORF; LUIKART, 2006).

O complexo '*Cattleya coccinea*', da família Orchidaceae, é composto por orquídeas epifíticas e rupícolas de porte pequeno, com até aproximadamente 10 cm de altura, que apresentam pseudobulbos fusiformes a arredondados, tipicamente contendo uma folha carnosa-coriácea de formato elíptico a oblongo ou lanceolado (FOWLIE, 1987). Apresentam inflorescências reduzidas, com uma flor, raramente duas (WITHNER, 1993) de coloração tipicamente avermelhada, variando desde tons mais rosados até vermelho-alaranjados e amarelados. As sete espécies tradicionalmente reconhecidas para este grupo são encontradas ao longo da Mata Atlântica Brasileira, desde a fronteira do Rio Grande do Sul com Santa Catarina até o sul do Espírito Santo, em elevações geralmente acima de 1.000m na Serra do Mar, bem como na Serra da Mantiqueira e do sul da Serra do Espinhaço (FOWLIE, 1987; WITHNER, 1993).

Embora o complexo '*Cattleya coccinea*', apresente caracteres morfológicos diagnósticos claros que permitem sua identificação, a delimitação de suas espécies é problemática. Atualmente, são reconhecidas sete espécies para o grupo, separadas por caracteres morfológicos diagnósticos florais e vegetativos, além da distribuição geográfica. Entretanto, a observação de espécimes em campo, em cultivo e a análise de material de herbário demonstrou a comum ocorrência de indivíduos que apresentam um mosaico de caracteres diagnósticos referentes a duas ou mais espécies, ou ainda extremos de variação morfológica presentes em uma única população que caracterizam duas espécies distintas.

1.1 Objetivos gerais

Utilizar análises filogenéticas para a delimitação de espécies e entender as relações de ancestralidade entre as espécies. Através de análises filogeográficas avaliar níveis de diversidade, estruturação e eventos demográficos históricos que influenciaram a atual distribuição das espécies do clado *C. coccinea*.

1.1.1 Objetivos específicos

1. Rever a atual delimitação de espécies no complexo *Cattleya coccinea* e analisar as relações de ancestralidade entre as espécies
2. Descrever a diversidade e estrutura genética das espécies e populações
3. Detectar a proporção de dispersão de fluxo gênico via pólen x semente
4. Estimar o tempo de divergência das espécies do complexo *C. coccinea*
5. Analisar a ocorrência de expansão do tamanho efetivo populacional histórico

1.2 Revisão Bibliográfica

1.2.1 As espécies do clado *Cattleya coccinea*

Apesar de Orchidaceae ser uma das maiores famílias de plantas angiospermas, com 26.000 espécies aproximadamente (WORLD CHECKLIST OF MONOCOTYLEDONS, 2011; CHASE et al., 2015), a quantidade de estudos filogenéticos, ecológicos e genéticos ainda são insuficientes comparados a sua imensa diversidade (SWARTS; DIXON, 2009). Dentro desta família, a subtribo Laeliinae engloba espécies de alto valor ornamental e diferentemente da maioria dos outros grupos, foram alvo de diversos estudos filogenéticos nos últimos anos. Durante a década passada a circunscrição do gênero *Cattleya* sofreu mudanças significativas a partir dos trabalhos de van den Berg e Chase (2000), van den Berg et al.

(2000, 2009), van den Berg (2008), que transferiram o antigo gênero *Sophronitis* Lindl., para *Cattleya*. Anteriormente, o gênero *Sophronitis* compreendia nove espécies das quais sete formam um grupo monofilético, denominado atualmente de clado *Cattleya coccinea* Lindl. Essas plantas são caracterizadas pela presença de flores grandes e solitárias e pétalas maiores que sépalas (FOWLIE, 1987; VAN DEN BERG et al., 2009). *Cattleya cernua* (Lindl.) Van den Berg e *C. alagoensis* (VP Castro e Chiron) Van den Berg que compõe o restante do grupo são diferenciadas pela presença de flores pequenas em cachos vermelho-alaranjadas.

Para o clado *Cattleya coccinea* as primeiras três espécies descritas a partir de caracteres morfológicos foram *S. coccinea* (Lindl.) Rchb.f., *S. rossiteriana* Barb. Rodr. (agora *Cattleya coccinea* var. *rossiteriana* (Barb. Rodr.) VAN DEN BERG) e *S. wittigiana* Barb. Rodr. Cogniaux (1898). Posteriormente, houve modificações no clado e quatro espécies foram reconhecidas (*S. coccinea* e *S. wittigiana* se mantiveram, mas *S. brevipedunculata* (Cogn.) Fowlie e *S. mantiqueirae* (Fowlie) Fowlie foram incluídas (PABST; DUNGS 1975, 1977). Embora os autores não tenham citado caracteres diagnósticos, essas informações foram incluídas nos trabalhos de Fowlie (1968, 1972, 1975, 1987), que consideraram as mesmas quatro espécies, mas dessa vez com descrições morfológicas e distribuição geográfica, e descreveu *S. acuensis* Fowlie (FOWLIE, 1975). As duas espécies restantes foram incluídas a partir dos trabalhos de Miranda (1991), *Sophronitis bicolor* Miranda (agora *C. dichroma* Van den Berg), e Withner (1993), *S. pygmaea* (Pabst) Withner, agora *C. pygmaea* (Pabst) Van den Berg, originalmente descrita como uma variedade de *S. coccinea* (PABST, 1976).

A espécie que dá nome ao clado, *Cattleya coccinea* (Figura 1) foi descrita por Lindley em 1836 e possui a mais ampla distribuição geográfica dentre as espécies do complexo, ocorrendo desde a região Sul do Brasil até o Espírito Santo, na região Sudeste (FOWLIE, 1987). Seu habitat predominante é a Mata Atlântica costeira, também conhecida como Serra do Mar, em altitudes que variam de 650 a 1500 m. Possui pseudobulbos mais cilíndricos que esféricos, com folhas estreitas, eretas, que podem apresentar a nervura central avermelhada (FOWLIE, 1987). Primeiramente descrita como subespécie de *C. coccinea* em 1968, *C. mantiqueirae* (Figura 1) foi elevada a categoria de espécie por Fowlie (1972). Como características diagnósticas destacam-se os pseudobulbos esféricos com folhas ovais e curvadas e não apresentam a nervura central vermelha. As plantas desta espécie, incluindo as flores, são menores que as de *C. coccinea*, e florescem no verão entre os meses de janeiro e fevereiro. Indivíduos de *C. mantiqueirae* costumam habitar em montanhas com altitude acima de 1700 metros na Serra da Mantiqueira (FOWLIE, 1968, 1987).

A única espécie do grupo que habita os campos rupestres de Minas Gerais é *Cattleya brevipedunculata*. Nesse habitat também conhecido como Serra do Espinhaço, a espécie ocorre em altitudes que variam de 1500 a 2000 metros, crescendo sobre as rochas ou aderidas em *Vellozias*. Outra característica marcante da espécie é o crescimento vegetativo que forma uma fila dupla e regular de pseudobulbos semi-globosos. As folhas são ovais, planas e paralelas à superfície da haste. As flores podem apresentar a coloração de tom salmão avermelhada, as pétalas são repentinamente pontudas e o labelo possui forma elíptica estreita e listrada com algumas nervuras amarelas. Os pedúnculos são pequenos, fato que explica o nome da espécie, e a época de floração é entre os meses de abril e maio (FOWLIE, 1987; WITHNER, 1993). No estado do Espírito Santo ocorre a espécie que apresenta flores de cor rosa, única do clado, *Cattleya wittigiana*. A forma dos pseudobulbos são semi-globosos e também podem apresentar crescimento em fila, assim como *C. brevipedunculata*. As folhas são ovais e planas. Possui pedúnculo longo e florescem de abril a junho. Habitam as áreas úmidas das montanhas do Espírito Santo a altitudes de 700 a 1500 metros. As espécies *C. dichroma*, *C. acuensis* e *C. pygmaea* não foram amostradas devido ao fato de que os autores se basearam em um número limitado de indivíduos e populações, com distribuição geográfica restrita, para descrevê-las.

Figura 1 – Exemplos das espécies do clado *Cattleya coccinea* de acordo com Fowlie (1987) e seus respectivos locais de procedência. A: *C. coccinea* de Petrópolis/RJ. B: *C. coccinea* de Domingos Martins/ES. C: *C. coccinea* de Nova Friburgo/RJ. D: *C. mantiqueirae* de Campos do Jordão/SP. E: *C. coccinea* de Cambará do Sul/RS. F: *C. brevipedunculata* de Nova Friburgo/RJ. G: *C. brevipedunculata* de Ouro Branco/MG. H: Aspecto dos pseudobulbos esféricos e folhas curvadas dos indivíduos de Ouro Branco. I: *C. pygmaea* de Santa Teresa. J: *C. coccinea* de São José do Barreiro/Pico da Bacia/SP. L: *C. wittigiana* de Santa Teresa/ES

Com o intuito de esclarecer os limites e as relações entre as espécies desse grupo, recentemente dois trabalhos foram realizados com espécies pertencentes ao clado *C. coccinea*. Rodrigues et al. (2015) avaliaram por meio de sequências de cpDNA e ISSR, a delimitação entre as espécies *C. coccinea* e *C. mantiqueirae* tendo como propostas a ocorrência da espécie *C. coccinea* na Serra do Mar e *C. mantiqueirae* restrita à Serra da Mantiqueira. Os resultados mostraram que essa hipótese não é suportada pelos clados formados e que dois grupos emergiram a partir de amostras originadas mais ao nordeste e outro mais a sudoeste da região Sudeste do Brasil. E uma população coletada no limite entre a Serra da Mantiqueira e Serra do Espinhaço mostrou ser correlacionada com *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana*. Em outro trabalho sobre espécies do clado *C. coccinea* (LEAL, 2013), utilizando marcadores SSR e caracteres morfológicos, testou-se a hipótese da população de Lima Duarte ser resultado da hibridação entre as espécies *C. coccinea* e *C. brevipedunculata*. Os resultados mostraram que a população de Lima Duarte não apresenta evidências de hibridação e corrobora com os resultados de Rodrigues et al. (2015), que relaciona a população diretamente com a espécie *C. brevipedunculata*.

1.2.2 A Filogenia como ferramenta para a delimitação de espécies

A idéia de que as espécies estão relacionadas através de um história de descendência comum é antiga, antecedendo Darwin. No entanto, essa idéia fornece um princípio organizador da Biologia que tem como importante ferramenta a Filogenia (HUELSENBECK et al., 2001). Portanto, a função da Filogenia, além da classificação dos organismos, é reconstruir a história de vida dos organismos, tendo como produto final as hipóteses de parentesco entre diferentes táxons (FUTUYMA, 2013). Neste contexto, uma eficiente e precisa delimitação de espécies é um dos aspectos mais básicos e importantes da Biologia, pois as espécies são a unidade fundamental das pesquisas em ecologia, conservação e biogeografia (FUJITA, 2010). Assim, com o intuito de atingir esse propósito, a delimitação das espécies está sendo freqüentemente discutida e alterada para interagir com diversas áreas do conhecimento como a filogenia, genética de populações e filogeografia. Esta nova ênfase na delimitação das espécies surgiu, pelo menos em parte, por causa da crescente preocupação com as ameaças à biodiversidade e o desejo de descrever o maior número possível de espécies, com rapidez e precisão antes que eles desapareçam (WIENS, 2007). Os recentes estudos em biologia evolutiva revelaram que a especiação não é um fenômeno de um passo,

mas sim um processo contínuo onde caracteres morfológicos não são suficientes para descrever adequadamente os resultados desse processo (LEY; HARDY, 2010). Além disso, os caracteres morfológicos podem ser dependentes de fatores ambientais, sem estarem geneticamente fixados (MARTINEZ-MEIER et al., 2009), ou ainda, os processos de divergência genética entre populações pode ocorrer sem deixar vestígios em caracteres morfológicos (LADIZINSKY; ABBO, 1993; HEINRICHS et al., 2009).

Assim os dados obtidos a partir da abordagem molecular estão sendo cada vez mais utilizados para delimitar espécies, onde o status de espécies é determinado com base principalmente em um critério de exclusividade como a monofilia recíprova (KNOWLES; CARSTENS, 2007). Portanto, o rápido desenvolvimento de técnicas para obtenção de dados moleculares nas últimas décadas tem fornecido importantes informações que auxiliam em vários aspectos da biologia evolutiva, como: detecção dos níveis de fluxo gênico atuais e históricos, graus de hibridação e relações filogenéticas entre espécies potencias (YANG; RANALA, 2010). Nesse contexto, análises filogenéticas, com suas diferentes abordagens metodológicas representam a história evolutiva de espécies ao longo do tempo com relação ao seu ancestral comum mais recente (SWOFFORD et al., 1996; AVISE, 2000; CAMARGO; SITES, 2013).

Inferência Bayesiana

A inferência bayesiana, dentre os métodos utilizados na análise filogenética como Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança, pode ser considerado como o mais recente (HUELSENBECK et al., 2001). Inclusive, tem sido amplamente utilizado por sua estatística mais robusta, e também graças ao desenvolvimento tecnológico que permitem aos computadores suportar cálculos estatísticos dessa magnitude. A inferência bayesiana se baseia no Teorema de Bayes e realiza o cálculo em função dos dados observados da distribuição da probabilidade posterior, utilizando-se para isso a função de verossimilhança juntamente com a distribuição da probabilidade a priori (HUELSENBECK et al., 2001). A robustez da inferência bayesiana se deve principalmente ao fato de que essa análise considera todos os valores de parâmetros dentro do espaço amostral, ao invés de considerar somente um único valor específico como na análise de Máxima Verossimilhança. Além disso, a inferência bayesiana possibilita que modelos evolutivos mais complexos selecionados previamente possam ser utilizados nessa análise (RANNALA; YANG, 1996).

A utilização do método numérico estocástico Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) para estimar os valores de probabilidades posteriores revolucionou a análise

bayesiana. Isso porque sem esse método a análise seria impossível de ser calculada, uma vez que a probabilidade posterior envolve o somatório de todas as árvores e para cada árvore a integração sobre todas as combinações possíveis de comprimento de ramos e valores de parâmetros do modelo de substituição (HUELSENBECK; RONQUIST, 2005). Portanto, o MCMC gera amostras aleatórias de uma distribuição de interesse, representada na análise filogenética pela distribuição posterior. O algoritmo Metropolis-Hastings (METROPOLIS et al., 1953; HASTINGS, 1970) é o mais utilizado em programas de análise filogenética a partir da inferência bayesiana como o Mr. Bayes (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). A função desse algoritmo na análise é avaliar a distribuição posterior das árvores filogenéticas (HUELSENBECK; RONQUIST, 2005).

Portanto, a inferência bayesiana funciona da seguinte maneira: a ideia básica é construir uma Cadeia de Markov que tem como espaço os parâmetros do modelo estatístico e a distribuição de probabilidade posterior. Para uma dada árvore é proposta uma “perturbação” (modificação no comprimento de ramos ou posição dos ramos) sendo gerada, portanto, uma nova árvore estocasticamente, onde esta será aceita ou rejeitada a partir de uma probabilidade descrita por Metropolis-Hastings. Se a nova árvore for aceita então será sujeita a uma nova perturbação, sendo portanto, esse procedimento considerado uma geração da cadeia. Depois de milhões de gerações o processo converge (ou não) para um pequeno conjunto de árvores que apresentam probabilidade aceitável. Com o fim da análise é realizado o consenso das árvores resultantes, sendo portanto, a probabilidade posterior descrita como a frequência com que determinado clado emerge no conjunto de árvores visitadas na análise (RONQUIST; VAN DER MARK; HUELSENBECK, 2009).

Teoria coalescente para dados multilocus

A chamada árvore de gene, onde se utiliza apenas um loco para representar as relações de ancestralidade entre grupos de organismos, foi e continua sendo amplamente utilizada em análises filogenéticas (LIU et al., 2009). Porém, a definição dos limites entre espécies não deve se basear em um único gene, pelo fato de não representar fielmente as árvores de espécies. Isso se deve a diversas razões, incluindo duplicação de gene (resultando em genes parálogos), separação de linhagem incompleta e transferência horizontal (KNOWLES; CARSTENS, 2007). A utilização da teoria coalescente como um método mais eficiente para a delimitação de espécies possibilitou a interação entre os estudos de processos evolutivos, que são aspectos inferidos em análises de genética de populações com o das relações entre táxons que caracteriza a filogenia (HEY, 2010). As árvores de espécies surgem então como

consequência dessa interação e se tornam foco principal dessa abordagem, tomando lugar antes ocupado pelas árvores de genes (RANNALA, YANG, 2003; EDWARDS, 2009). Entretanto, árvores de genes individuais continuam sendo importantes ferramentas e contribuem para a compreensão de diversos fatores como estimativas de tempos de divergência e tamanho efetivo populacional em árvores de espécies (RANALA; YANG, 2003).

A aplicação de modelos coalescentes se tornou possível graças a facilidade de obtenção de dados de multilocos. Portanto, a delimitação de espécies baseada na teoria coalescente oferece uma oportunidade para o cálculo da probabilidade de especiação, tendo como objetivo central identificar divergências entre linhagens independentes, cada uma representando uma espécie (FUJITA et al., 2012). O modelo coalescente de multi-espécies analisa a história genealógica de amostras até o seu único ancestral comum que representa essas múltiplas espécies. Nesse contexto, a probabilidade bayesiana e máxima verossimilhança são exemplos de abordagens disponíveis para diversos métodos para esse modelo (FUJITA et al., 2012). A teoria coalescente foi originalmente desenvolvida por Kingman (1980, 2000), e complementada por Hudson (1983a e b) e Rosenberg e Nordborg (2002). Essa teoria se baseia em um modelo estocástico pelo qual se tem uma retrospectiva das genealogias de dois alelos por exemplo, até se unirem em um único ancestral comum. Ou seja, é um modelo do efeito da deriva genética, através do tempo, sobre a genealogia dos antecedentes. A idéia é considerar a história ancestral dos genes em uma amostra a partir do desenvolvimento de um modelo para os intervalos de tempo entre cada evento de coalescência (HARTL; CLARK, 2010).

A teoria coalescente é composta por uma avaliação probabilística de variação no tempo da ancestralidade comum de alelos em uma amostra relativamente pequena de indivíduos, a partir de uma população muito maior. Isso inclui a consideração de todas as vias de herança através do qual as cópias de amostras de DNA homólogo são rastreadas de volta para uma única cópia ancestral, conhecido como o ancestral comum mais recente (MRCA). As relações de herança entre os alelos são normalmente representadas como uma genealogia genética, ou árvore de gene, semelhantes na forma a uma árvore filogenética. A expectativa probabilística desta árvore genealógica de gene é conhecida como coalescente. Portanto, compreender as propriedades estatísticas do coalescente sob diferentes pressupostos forma a base da teoria coalescente (KINGMAN, 1980, 2000). Por causa da recombinação, diferentes locos de genes seguem diferentes caminhos de ascendência, resultando em diferentes genealogias de genes. No caso mais simples, a teoria coalescente não assume qualquer recombinação, nenhuma seleção natural, e sem fluxo do gene ou estrutura populacional. A árvore genealógica de gene

é independente do processo de mutação, de tal modo que alterações na sequência de DNA não afetam a herança e podem ser consideradas separadamente. Portanto, sob esse modelo o tempo esperado entre os eventos de coalescência sucessivas, pelo qual duas cópias do gene surgem de uma única cópia ancestral, aumenta de forma quase exponencial no tempo (HARTL; CLARK, 2010). Avanços na teoria coalescente, atualmente, conseguem calcular os efeitos de eventos como recombinação, seleção e praticamente qualquer modelo evolutivo ou demográfico nas análises filogenéticas e de genética de populações (DRUMMOND; RAMBAUD, 2007).

1.2.3 Implicações da genética de populações em estudos filogeográficos

É fato que processos evolutivos históricos influenciaram a distribuição da variação genética entre as populações de espécies atuais (AVISE, 2000). O principal foco de diversos estudos filogeográficos em plantas tem sido examinar a distribuição de linhagens genealógicas a fim de avaliar a importância relativa dos diferentes eventos históricos, como a área de expansão/contração, a fragmentação e migração de refúgios durante as flutuações climáticas do Quaternário (GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ; ORNELAS; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, 2011). A identificação de eventos demográficos históricos auxilia a inferência da dinâmica da população em tempos geológicos passados e são importantes para a compreensão da distribuição da diversidade de vida hoje, pois esses eventos são como assinaturas genéticas de retração e expansão da população (CARNAVAL et al., 2009). Assim, áreas de contrações e eventos de fragmentação deixaram assinaturas genéticas em populações de áreas de refúgios que são diferentes, por exemplo, das populações de áreas re-colonizadas (WIDMER; LEXER, 2001).

Embora vários estudos filogeográficos têm analisado a influência das glaciações do Pleistoceno sobre a estrutura genética de populações de espécies de plantas nas zonas temperadas, o mesmo não ocorre em áreas neotropicais, pois ainda são poucos os estudos que avaliaram os padrões filogeográficos de plantas dessa região (CAVERS et al., 2003; CAVANDER-BARES et al., 2011). A América do Sul é um subcontinente com altíssima riqueza de espécies, pois aqui estão localizados cinco dos principais “*hotspots*” de biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000). Estudos biogeográficos de espécies da Amazônia (ALEIXO, 2004), dos Andes (SPERANZA et al., 2007) e da Mata Atlântica brasileira (SILVA et al., 2004; GRAZZIOTIN et al., 2006; CARNAVAL; MORITZ, 2008;

CARNAVAL et al., 2009; RIBEIRO et al., 2011; BONATELLI et al., 2013) indicam uma complexa história evolutiva durante o Quaternário da América do Sul, onde se destaca o importante papel das contrações e expansões devido às mudanças climáticas do Pleistoceno (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). Estudos que abordam a história evolutiva das espécies de plantas na parte sul da Mata Atlântica a partir de uma perspectiva filogeográfica molecular vem aumentando ao longo dos anos (LORENZE-LEMKE et al., 2005; LEDRU et al., 2007; PALMA-SILVA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015). Como também sobre as plantas da Serra do Espinhaço (ANTONELLI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2014; LELES et al., 2015). Estes estudos proporcionam uma primeira visão sobre os efeitos das expansões e contrações históricas das florestas e restingas sobre o atual padrão de variação intra-específica, sugerindo respostas demográficas para o clima do Pleistoceno. Esse fato, por sua vez, induziu a mudanças na cobertura florestal com uma aparente divisão filogeográfica, para várias taxa, da região norte e da região sul da Mata Atlântica (PALMA-SILVA et al., 2009).

A fragmentação florestal provoca drásticas consequências nas populações naturais, pois diminui o tamanho da população reprodutiva, isola populações, e reduz a área disponível para a regeneração de espécies, especialmente em espécies que ocorrem naturalmente em baixa densidade (SEBBENN et al., 2010). Imediatamente após a fragmentação florestal, as populações sofrem com os efeitos de gargalos genéticos, incluindo a perda de alelos com baixa frequência (frequência < 0.05) e uma redução no tamanho efetivo da população (N_e) (YOUNG et al., 1996; HAMRICK, 2004). Nesse panorama, processos como a dispersão de pólen e sementes, também chamado de fluxo gênico, bem como sistemas de acasalamento são afetados (MANOEL et al., 2011). Outras consequências provocadas pela fragmentação, incluem aumentos na estruturação genética intra-populacional com consequente diferenciação genética entre populações, bem como a redução na diversidade genética, além disso, o acasalamento entre indivíduos parentais podem ser mais frequentes (YOUNG et al., 1996; LOWE et al., 2005; AGUILAR et al., 2008). Esse conjunto de efeitos negativos serão mais significativos, quando o tamanho efetivo da população for baixo (menos de 100 indivíduos) e se o grau de isolamento genético do fragmento florestal for alto (MANOEL et al., 2011). No caso de plantas arbóreas, a dispersão de pólen e de sementes são os principais determinantes da estrutura genética espacial e dos índices diversidade genética nas populações (DICK et al., 2008). As estimativas de fluxo gênico via pólen e semente em espécies de plantas têm sido intensamente estudados a partir da utilização de marcadores microssatélites, que são muito polimórficos e adequados para esse tipo de abordagem (SEBBENN, 2010). Além disso, esse

marcador pode também ser útil na análise de paternidade em sementes de polinização aberta, onde são colhidas sementes de cada amostra.

Adicionalmente, estimativas do fluxo gênico via pólen x sementes são necessários para prever os efeitos da fragmentação florestal sobre a estrutura genética de populações naturais. Portanto, a comparação com a herança biparental dos marcadores nucleares, enfatizou a importância do fluxo gênico mediado por pólen e sementes na estrutura das populações (PETIT et al., 2005; DUMINIL et al., 2007). Para essa abordagem, estudos com sequências de DNA citoplasmáticos são fundamentais. Além disso, a característica uniparental de sequências de cpDNA se torna interessante, por exemplo, nas espécies em que o fluxo de sementes é menor do que o fluxo de pólen, pois nesse caso é previsto que o genoma do cpDNA se mostre altamente estruturado quando comparado com o genoma nuclear (PETIT et al., 2005). Nesse contexto, nota-se que a análise da distribuição da diversidade e estrutura genética, provenientes tanto do genoma nuclear como de cpDNA, são ferramentas eficientes que auxiliam na inferência de processos demográficos em populações de plantas (PINHEIRO et al., 2011). Os estudos empíricos sobre a biologia reprodutiva de muitas espécies de plantas alógamas, indicam que o movimento do pólen é muitas vezes a forma predominante de fluxo gênico (DUMINIL et al., 2007), mas pouco se sabe sobre a habilidade de dispersão de espécies que ocupam habitats instáveis, por exemplo, a demografia que se assemelha a modelos de metapopulações. A utilização conjunta de marcadores de cpDNA e nucleares, em um contexto filogeográfico, pode se tornar um forte aliado para detectar a história demográfica, além de auxiliar a distinção dos efeitos do fluxo gênico via pólen versus fluxo gênico via sementes na formação da estrutura da população atual (PALMA-SILVA et al., 2009; PINHEIRO et al., 2011).

Neste contexto, com relação às metodologias, assim como são ferramentas úteis para a Filogenia, a inferência bayesiana e a teoria coalescente aplicadas em análises como: atribuição de indivíduos a grupos geneticamente distintos, estimativa de tempo de divergência, expansão populacionais históricas aliadas às estatísticas tradicionais para a avaliação da diversidade e estruturação são ferramentas imprescindíveis para estudos filogeográficos bem sucedidos.

Referências

- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Oxford, v.17, p. 5177-5188, 2008.
- ALEIXO, A. Historical diversification of a Terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. **Evolution**, Oxford, v.58, p.1303-1317, 2004.
- ALLENDORF, F.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Malden: Blackwell Publishing, 2007. 664 p.
- ANTONELLI, A.; VEROLA, C.F.; PARISOD, C.; GUSTAFSSON, A.L.S. Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae:Laeliinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 100, p. 596-606, 2010.
- AVISE, J.C. Phylogeography: **The history and formation of species**. Montpellier:Harvard University Press, 2000. 447p.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, JR.R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REED, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BONATELLI, I.A.S.; PEREZ, M.F. ; TOWNSEND, P.A.; TAYLOR, N.P.; ZAPPI, D.C.; MACHADO, M.C.; KOCH, I.; PIRES, A.H.C.; MORAES, E.M. Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, p. 3044-3063, 2014.
- CAMARGO, A.; SITES, J.W. Species delimitation: a decade after the Renaissance. In: Pavlinov, I. (Ed.). **The species problem-ongoing issues**. Rijeka, Croatia: InTech, 2013. p. 225-247
- CARNAVAL, A.C; MORITZ, C. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 35, p. 1187-1201, 2008.
- CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, New York, v.323, p. 785-789, 2009.
- CAVANDER-BARES, J.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; PAHLICH, A.; KOEHLER, K.; DEACON, N. Phylogeography and climatic niche evolution in live oaks (*Quercus* series *Virentes*) from the tropics to the temperate zone. **Journal of Biogeography**, Oxford, v.38, p.962-981, 2011.

CAVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A.J. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p. 1451-1460, 2003.

CHASE, M.W. ; CAMERON, K.M. ; FREUDENSTEIN, J.V. ; PRIDGEON, A.M. ; SALAZAR, G. ; VAN DEN BERG, C. ; SCHUITMAN, A. . An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 177, p. 151-174, 2015.

COGNIAUX, C.A. Orchidaceae. In: MARTIUS, C.F.P.; EICHLER, A.G.; URBAN, I. (Eds.). **Flora Brasiliensis 3**. Munich: Monachii typographia regia, 1898. part 5, p. 313-324.

DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, Oxford, v.56, p.879-886, 2007.

DICK, C.W.; HARDY, O.J.; JONES, F.A.; PETIT, R.J. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plant Biology**, New Jersey, v. 1, p.20-33, 2008.

DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A. Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p.214. 2007.

DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; JORDANO, P.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G.G.; PETIT, R.J. Can population genetic structure be predicted from life-history traits? **The American Naturalist**, Chicago, v.169, p.662-672, 2007.

EDWARDS, S.V. Is a new and general theory of molecular systematics emerging? **Evolution**, Oxford, v. 63, p.1-19, 2009.

FELSENSTEIN, J. **Inferring phylogenies**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 2004. 38p.

FOWLIE, J.A. *Sophranitis coccinea* Lindl. **Orchid Digest**, Santa Barbara, v. 32, n. 9, p. 272-273, 1968.

_____. A contribution to a further clarification of the genus *Sophranitis* Lindl., including the elevation to full specific status two previously described varieties. **Orchid Digest**, Santa Barbara, v. 36, n. 5, p. 181-194, 1972 .

_____. With Ghillany in Brazil. Part IX. A new *Sophranitis* from Pico do Açú, *Sophranitis acuensis*. **Orchid Digest**, Santa Barbara, v. 39, p.147-151, 1975.

_____. A contribution to a monographic revision of the genus *Sophranitis* Lindl. **Orchid Digest**, Santa Barbara, v. 51, p. 15-32, 1987.

FREELAND, J. **Molecular Ecology**. West Sussex: John Wiley; Sons Ltd, 2005. 507p.

FUJITA, M.K.; MCGUIRE, J.A.; DONNELLAN, S.C.; MORITZ, C. Diversification and persistence at the arid-monsoonal interface: Australia-wide biogeography of the Bynoe's gecko (*Heteronotia binoei*; Geckkonidae). **Evolution**, Oxford, v.64, 2293-2314, 2010.

FUJITA, M.K.; LEACHÉ, A.D.; BURBRINK, F.T.; MCGUIRE, J.A.; MORITZ, C. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, London, 27, 480-488, 2012.

FUNK, D. J.; OMLAND, K. E. Species-Level non-monophyly and polyphyly: frequency, causes, consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v.34, p.397-423, 2003.

FUTUYMA, D.J. **Evolution**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 2013. 656p.

GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, C.; ORNELAS, J.F.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F. Chloroplast DNA phylogeography of a distylous shrub (*Palicourea padifolia*, Rubiaceae) reveals past fragmentation and demographic expansion in Mexican cloud forests. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.61, p.603-615, 2011.

GRAZZIOTIN, F.G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S.L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 3969-3982, 2006.

HAMRICK, J.L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, p.323-335, 2004.

HART, M.W. The species concept as an emergent property of population biology. **Evolution**, Oxford, v.65, p.613-616, 2011.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 659p.

HASTINGS, W.K. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. **Biometrika**, Londres, v. 57, p. 97-109, 1970.

HEINRICHS, J.; KLUGMANN, F.; HENTSCHEL, J.; SCHNEIDER, H. DNA taxonomy, cryptic speciation and diversification of the Neotropical-African liverwort, *Marchesinia brachiata* (Lejeuneaceae, Porellales). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Oxford, v.53, p.113-121, 2009.

HEY, J. The divergence of chimpanzee species and subspecies as revealed in multipopulation isolation-with-migration analyses. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 27, p.921-933, 2010.

HICKERSON, M.J.; CARSTENS, B.C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K.A.; GRAHAM, C.H.; JOHNSON, J.B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P.F.; YODER, A.D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.54, p. 291-301, 2010.

HUDSON, R.R.; COYNE, J.A. Mathematical consequences of the genealogical species concept. **Evolution**. Oxford, v.56, p.1557-1565, 2002.

HUDSON, R.R. Testing the constant-rate neutral allele model with protein sequence data. **Evolution**, Oxford, v. 37, p. 203-207, 1983a.

HUDSON, R.R. Properties of a neutral allele model with intragenic recombination. **Theoretical Population Biology**, Amsterdam, v. 23, p.183-201, 1983b.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, p.754-755, 2001.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J.P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, New York, v. 294, p. 2310-2314, 2001.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. Bayesian Analysis of Molecular Evolution using MrBayes. In: NIELSEN, R. (Ed.). **Statistical Methods in Molecular Evolution**. New York: Springer, 2005. cap. 7, p.183-226

KINGMAN, J.F.C. On the Genealogy of Large Populations. **Journal of Applied Probability**, Durham, v.19, p. 27-43, 1982.

KINGMAN, J.F.C. Origins of the coalescent 1974-1982. **Genetics**, Bethesda, v. 156, p.1461-1463, 2000.

KNOWLES, L.L.; CARSTENS, B.C. Delimiting species without monophyletic trees. **Systematic Biology**, Oxford, v. 56, p. 887-895, 2007.

LADIZINSKY, G.; ABBO, S. Cryptic speciation in *Lens culinaris*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, New York, v. 40, p.1-5, 1993.

LEAL, B. **Detecção de zona híbrida entre *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* (Orchidaceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, utilizando microssatélites e análise morfométrica**. 2013. 83p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

LEDRU, M.P.; SALATINO, M.L.F.; CECCANTINI, G.; SALATINO, A.; PINHEIRO, F.; PINTAUD, J.C. Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. **Diversity and Distributions**, New Jersey, v.13, p.761-771, 2007.

LELES, B. P.; CHAVES, A. V.; RUSSO, P.; BATISTA, J. A. N.; LOVATO, M. B. Genetic Structure Is Associated with Phenotypic Divergence in Floral Traits and Reproductive Investment in a High-Altitude Orchid from the Iron Quadrangle, Southeastern Brazil. **Plos One**, San Francisco, 2015. No Prelo.

LEY, A.C.; HARDY, O.J. Species delimitation in the Central African herbs *Haumania* (Marantaceae) using georeferenced nuclear and chloroplastic DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 57, p. 859, 2010.

LORENZ-LEMKE, A.P.; MUSCHNER, V.C.; BONATTO, S.L.; CERVI, A.C.; SALZANO, F.M.; FREITAS, L.B. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. **Annals of Botany**, Oxford, v.95, p.799-806, 2005.

LOWE, A.J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C.F.E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, London, v. 95, p.255-273, 2005.

LIU, L., YU, L., KUBATKO, L., PEARL, D.K., EDWARDS, S.V., 2009. Coalescent methods for estimating phylogenetic trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.53, p.320-328, 2009.

MADDISON, W. P. Gene trees in species trees. **Systematic Biology**, Oxford, v. 46, p. 523-536, 1997.

MADDISON, W.P.; KNOWLES, L.L. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. **Systematic Biology**, Oxford, v.55, p. 21-30, 2006.

MANOEL, R.O.; ALVES, P.F.; DOURADO, C.L.; GAINO, A.P.S.C.; FREITAS, M.L. M.; MORAES, M.L.T.; SEBBENN, A.M. Contemporary pollen flow, mating patterns and effective population size inferred from paternity analysis in a small fragmented population of the Neotropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 13, p.613-623, 2012.

METROPOLIS, N.; ROSENBLUTH, A.W.; ROSENBLUTH, M.N.; TELLER, A.W.; TELLER, E. Equations of state calculations by fast computing machines. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 21, p.1087-1091, 1953.

MORANDO, M.; AVILA, L.J.; SITES, J.W. JR. Sampling strategies for delimiting species: Genes, individuals, and populations in the *Liolaemus elongatus-kriegi* complex (Squamata: Liolaemidae) in Andean-Patagonian South America. **Systematic Biology**, Oxford, v.52, p.159-185, 2003.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, Oxford, v.403, p. 853-858, 2000.

PABST, G.F.J. *Sophranitis coccinea* subsp. *pygmaea*. **Bradea**, Rio de Janeiro, 1976. v. 2, p.70.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae brasiliensis I**. Hildesheim: Brücke-Verlag, 1975. 408p.

_____. **Orchidaceae brasiliensis II**. Hildesheim: Brücke-Verlag, 1977. 418p.

PALMA-SILVA, C.; LEXER, C.; PAGGI, G.M.; BARBARA', T.; BERED, F.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. **Heredity**, London, v.103, p.503-512, 2009.

PETIT, R.J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G.G. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, p.689-701, 2005.

PINHEIRO, F.; DE BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; FAY, M.F. ; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 38, p. 1923-1935, 2011.

PLEINES, T.; JAKOB, S.S.; BLATTNER, F.R. Application of non-coding DNA regions in intraspecific analyses. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v.282, p.281-294, 2009.

RANALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, New Jersey, v.43, 304-311, 1996.

RIBEIRO, P.L.; RAPINI, A.; DAMASCENA, L.S.; VAN DEN BERG, C. Plant diversification in the Espinhaço Range: Insights from the biogeography of *Minaria* (Apocynaceae). **Taxon**, Bratislava, v. 63, p. 1253-1264, 2014.

RIBEIRO, R.A.; LEMOS-FILHO, J.P.; RAMOS, A.C.S.; LOVATO, M.B. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, London, v.106, p.46–57, 2011.

RODRIGUES, J.F.; VAN DEN BERG, C.; ABREU, A. G.; NOVELLO, M.; VEASEY E, A.; OLIVEIRA, G.C.X.; KOEHLER, S. Species delimitation of *Cattleya coccinea* and *C. mantiqueirae* (Orchidaceae): insights from phylogenetic and population genetics analyses. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 301, p. 1345-1359, 2015.

RONQUIST, F.; VAN DER MARK, P.; HUELSENBECK, J.P. Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.M. **The Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. New York: Cambridge University Press, 2009. cap. 7, p. 210-266,

ROSENBERG, N.A.; NORDBORG, M. Genealogical Trees, Coalescent Theory and the Analysis of Genetic Polymorphisms. **Nature Reviews Genetics**, Oxford, v. 3, p. 380-390, 2002.

SCHAAL, B.A.; HAYWORTH, D.A.; OLSEN, K.M.; RAUSCHER, J.T.; SMITH, W.A. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p. 465-474, 1998.

SHAW, J.; LICKEY, E.B.; SCHILLING, E.E.; SMALL, R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 94, p. 275-288, 2007.

- SEBBENN, A.M.; CARVALHO, A.C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, S.M.B.; GAINO, A.P.S.C.; J M DA SILVA, J.M.; JOLIVET, C.; MORAES, M.L.T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v. 106, p.134-145, 2010.
- SPERANZA, P.R.; SEIJO, J.G.; GRELA, I.A.; NEFFA, V.G.S. Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae): biogeographical implications., **Journal of Biogeography**, Oxford, v.34, p.427-436, 2007.
- SWARTS, N.D.; DIXON, K.W. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, p.543-556, 2009.
- SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.K.; WADDELL, P.J.; HILLIS, D.M. Phylogeny reconstruction. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Eds.). **Molecular systematics**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 1996. p. 407-514
- TEMPLETON, A.R. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p. 779-791, 2001.
- TURCHETTO-ZOLET, A.C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 22, p. 1193-1213, 2013.
- VAN DEN BERG, C. New combinations in the genus *Cattleya* (Orchidaceae). **Neodiversity**, Feira de Santana, v. 3, p. 3-12, 2008.
- VAN DEN BERG, C.; CHASE, M.W. Nomenclatural notes on Laeliinae - I. **Lindleyana**, Palm Beach, v.15, p.115-119, 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**, Oxford, v. 104, p. 417-430. 2009.
- VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W.E.; DRESSLER, R.L.; WHITTEN, W.M.; SOTO ARENAS, M.A.; 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**, Palm Beach, v. 15, p. 96-114. 2000.
- WIDMER, A.; LEXER, C. Glacial refugia: sanctuaries of allelic richness, but not for gene diversity. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v.16, p.267-269, 2001.
- WIENS, J.J. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. **Systematic Biology**, Oxford, v.56, p.875-878, 2007.
- WITHNER, C.L. **The *Cattleyas* and their relatives: *Schomburgkia*, *Sophranitis*, and other south American genera**. Portland: Timber Press, 1993. 154p.

WORLD CHECKLIST OF MONOCOTYLEDONS. **World Checklist of Monocotyledons. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew**, 2011. Disponível em: <<http://apps.kew.org/wcsp/wcsp/>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

YANG, Z.; RANALA, B. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 107, p. 9264-9269, 2010.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v.11, p.413-418, 1996.

2 RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES DO COMPLEXO '*Cattleya coccinea*' (ORCHIDACEAE)

Resumo

Pertencente à família Orchidaceae, subtribo Laeliinae, as orquídeas ameaçadas e de alto valor ornamental do complexo *Cattleya coccinea*, são encontradas ao longo da Mata Atlântica Brasileira, desde a fronteira do Rio Grande do Sul com Santa Catarina até o sul do Espírito Santo. Embora apresente caracteres morfológicos diagnósticos claros na literatura que permitem a identificação das sete espécies do complexo, a delimitação das espécies é problemática devido ao gradiente de variação dos caracteres morfológicos observados em campo, em cultivo e em herbário. Portanto, os objetivos desse estudo foram testar o monofiletismo do grupo, revisar a delimitação de espécies para o complexo '*Cattleya coccinea*', e avaliar as relações entre tais espécies, como também eventos de reticulação envolvendo outras espécies do gênero *Cattleya*. Para isso foram amostrados 165 indivíduos provenientes de 23 localidades abrangendo toda a distribuição geográfica das espécies do complexo. As espécies *C. coccinea*, *C. mantiqueirae*, *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana* foram amostradas. Seis diferentes regiões de cpDNA (3'*rpS16*-5'*trnK*; *rpL32-trnL*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *psbJ-petA* e *atpI-atpH*) e uma de nrDNA (ITS1-2) foram utilizadas. Nas análises filogenéticas a inferência bayesiana e o modelo coalescente foram as metodologias empregadas com as sequências de cpDNA concatenados e a região ITS. Além disso, 302 indivíduos provenientes de 12 populações de espécies do complexo foram utilizados para a análise de atribuição de indivíduos a grupos geneticamente distintos a partir da inferência bayesiana. Os resultados suportam o monofiletismo para o clado *C. coccinea* para as regiões de cpDNA concatenadas. Entretanto, o mesmo não ocorreu para a região ITS, sugerindo que eventos de hibridação históricos influenciaram esse resultado. A análise de rede mostrou quatro grandes eventos de reticulação envolvendo as espécies do complexo com as séries *Microlaelia*, *Lawrenceanae*, *Sophronitis* e *Parviflorae* do gênero *Cattleya*. Seis diferentes clados emergiram na análise filogenética a partir de regiões de cpDNA, enquanto que para a região ITS cinco diferentes clados emergiram. A análise de atribuição de indivíduos a grupos geneticamente distintos demonstrou a existência de oito grupos, enquanto que a árvore de espécies apresentou suporte para sete espécies do clado *C. coccinea*. Portanto, considerando todos os resultados somados às observações de campo, a distribuição geográfica das espécies e revisões da literatura, foram reconhecidas sete diferentes espécies. As espécies *C. coccinea*, *C. mantiqueirae*, *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana* foram recircunscritas com modificações na distribuição geográfica. E três novas espécies foram reconhecidas: uma relativa à população DMES do Espírito Santo, outra referente às populações coletadas na Serra do Mar da região Sul e a terceira referente à população de SJSP da Serra do Mar, de São Paulo. Análises moleculares adicionais, assim como análises sobre a morfologia e ecologia poderão auxiliar para a melhor compreensão das relações entre as espécies do clado *C. coccinea*.

Palavras-chave: Filogenia; *Cattleya coccinea*; Delimitação de espécies; *Sophronitis*, Serra do Mar; Serra da Mantiqueira; Serra do Espinhaço; Inferência bayesiana; Teoria coalescente; cpDNA; ITS; Microssatélites

Abstract

Belonging to the Orchidaceae family, subtribe Laeliinae, the endangered and of high ornamental value orchids of the '*Cattleya coccinea*' complex, are found along the Brazilian Atlantic Forest, from the border of Rio Grande do Sul and Santa Catarina to the south of Espírito Santo. Although it presents clear diagnostic morphological characters in the literature that allow the identification of seven species of the complex, the delimitation of their species is problematic due to the variation gradient of morphological characters observed in the field, under cultivation and in herbarium. Therefore, the objectives of this study were to test the monophyly of the group, reviewing the species delimitation for the '*Cattleya coccinea*' complex, and assess the relationship between these species, as well as reticulation events involving other species of the genus *Cattleya*. For this we sampled 165 individuals from 23 locations covering the entire geographic distribution of species of the complex. The species *C. coccinea*, *C. mantiqueirae*, *C. brevipedunculata* and *C. wittigiana* were sampled. Six different regions of cpDNA (3'*rpS16*-5'*trnK*; *rpL32-trnL*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *psbJ-petA* and *atpI-atpH*) and nrDNA (ITS1-2) were used. In the phylogenetic analysis bayesian inference and the coalescent model were the methodologies employed with the concatenated sequences of cpDNA and ITS region. Furthermore, 302 individuals from 12 populations from the species complex were used for the analysis of assigning individuals to genetically distinct groups from the bayesian inference. The results support the monophyly for the *C. coccinea* clade for cpDNA concatenated regions. However, the same was not supported for the ITS region, suggesting that historical hybridization events influenced this result. The network analysis showed four major reticulation events involving the species from *C. coccinea* complex with the series *Microlaelia*, *Lawrenceanae*, *Sophronitis* and *Parviflorae* of the genus *Cattleya*. Six different clades emerged in the phylogenetic analysis from cpDNA regions, while for the ITS region five different clades emerged. Assigning individuals analysis to genetically distinct groups demonstrated the existence of eight groups, while the species tree showed support for seven species for the *C. coccinea* clade. Therefore, considering all the results combined with field observations, the geographical distribution of species and literature reviews, seven different species were recognized. The species *C. coccinea*, *C. mantiqueirae*, *C. brevipedunculata* and *C. wittigiana* were *recircumscribed* with changes in geographical distribution. And three new species were recognized: one on DMES population of Espírito Santo, another related to populations collected in the southern region of Serra do Mar and the third related to population SJPSP from the Serra do Mar, in São Paulo. Additional molecular analyses and also morphological and ecological analyses will be able to help for a better understanding of the relationships among species of the *C. coccinea* clade.

Keywords: Phylogeny; *Cattleya coccinea*; Species delimitation; *Sophronitis*, Serra do Mar; Serra da Mantiqueira; Serra do Espinhaço; Bayesian inference; Coalescent model; cpDNA; ITS; Microsatellites

2.1 Introdução

A integração da filogenética com a genética de populações (AVISE et al., 1987), possibilitou a solução de questões relacionadas à delimitação de espécies, as quais ganharam progressivamente cada vez mais espaço. Este é um período fascinante para responder perguntas referentes à sistemática biológica, sobretudo em baixos níveis taxonômicos. Delimitar espécies demanda necessariamente a utilização de um conceito de espécie - um dos

temas mais debatidos na biologia. Ao resgatar o conceito evolutivo de espécies (SIMPSON, 1961; WILEY, 1978) em um conceito unificado de espécies, de Queiroz (1998, 2007) sedimentou a ideia que espécies correspondem a linhagens distintas que evoluem separadamente. O foco passa a ser, portanto, como identificar tais unidades evolutivas, e não mais qual o melhor conceito para defini-las. Neste contexto, a taxonomia integrativa surgiu como resposta para lidar com o efeito da complexidade biológica na delimitação de espécies (DAYRAT 2005; PADIAL et al., 2010). Espécies são hipóteses que devem ser testadas à luz de múltiplas fontes de evidência e métodos, e de maneira transparente e, preferencialmente, estável (FUJITA et al., 2012).

A delimitação de espécies do complexo '*Cattleya coccinea*' constitui um enorme desafio para taxonomistas. O monofiletismo do complexo '*C. coccinea*' foi sugerido em um estudo filogenético da subtribo Laelinae (VAN DEN BERG et al., 2009), mas apenas dois espécimes, representando duas espécies distintas, foram amostrados. Este grupo é composto por orquídeas epifíticas e rupícolas que se diversificaram nas florestas acima de 800 m e campos de altitude e rupestres do sul-sudeste do Brasil, localizados nas Serras do Mar, da Mantiqueira e na Serra do Espinhaço no estado de Minas Gerais (FOWLIE, 1987; WITHNER, 1993). São orquídeas severamente ameaçadas pois, além de seu alto valor ornamental, são restritas a áreas de enorme pressão antrópica (TABARELLI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009). Atualmente são reconhecidas sete espécies, mas três (*Cattleya acuensis*, *C. dichroma*, *C. pygmaea*) são raras e duvidosas, uma vez que apenas o material tipo está disponível. A delimitação das quatro espécies restantes (*C. brevipedunculata*, *C. coccinea*, *C. mantiqueirae* e *C. wittigiana*) é baseada exclusivamente em caracteres morfológicos vegetativos e florais (FOWLIE, 1987; WITHNER, 1993). A descrição dos caracteres morfológicos diagnósticos conforme os autores citados encontra-se na seção Materiais e Métodos. No entanto, sua identificação é dificultada pela sobreposição de caracteres morfológicos diagnósticos, sendo comum encontrar inconsistências na identificação de material herborizado e em lista de espécies (MILLER et al., 2006; MENINI NETO et al., 2007; FORSTER; SOUZA, 2013).

A revisão de limites entre espécies no clado '*C. coccinea*' teve início com o estudo de Rodrigues et al. (2015). Os autores analisaram sequências de plastídios e marcadores ISSR utilizando abordagens filogenéticas e de genética de populações com o intuito de testar a delimitação de duas espécies tradicionalmente reconhecidas para este grupo, *C. coccinea* e *C. mantiqueirae*. A separação tradicional destas duas espécies de acordo com a ocorrência, respectivamente, na Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira, não foi corroborada pelo estudo

de Rodrigues et al. (2015). Dois agrupamentos foram recuperados sendo um formado por populações ocorrentes ao noroeste e outro ao sudoeste da área amostrada ao longo da Floresta Atlântica do sudeste do Brasil. No entanto, dada a complexidade ecológica do sudeste brasileiro e a importância de gradientes altitudinais para especiação em orquídeas (PINHEIRO et al., 2014; LELES et al., 2015), faz-se necessário a amostragem de populações em regiões de baixa altitude na Serra da Bocaina antes de tomar qualquer decisão taxonômica. Isso porque, a localidade tipo de *C. coccinea* é provavelmente oriunda de porções baixas da Serra da Bocaina (DESCOURTILZ, 1768; LINDLEY, 1836), área não amostrada por Rodrigues et al. (2015).

Além disso, uma das populações amostradas na Serra da Mantiqueira, em Lima Duarte, emergiu como mais relacionada à espécie *C. brevipedunculata*, característica da Serra do Espinhaço (LEAL, 2013; RODRIGUES et al., 2015). Esta região apresenta um complexo de tipos vegetacionais típicos dos campos rupestres, formações herbáceo arbustivas associadas a solos litólicos, predominantemente quartzíticos (MENINI NETO et al., 2007; RAPINI et al., 2008). Os campos rupestres correspondem, portanto, a regiões mais interiores, com menor umidade em relação à Floresta Atlântica Brasileira (FAB). Os padrões de divergência encontrados no estudo de Rodrigues et al. (2015) são condizentes com outros estudos filogeográficos disponíveis para animais e plantas da FAB, que indicam padrões distintos em microescalas, sugerindo a ação de múltiplos mecanismos de divergência nesta região do Brasil (THOMÉ et al., 2010; MARTINS, 2011).

Adicionalmente, Rodrigues et al. (2015) também identificaram elevada diversidade genética entre as populações amostradas, sugerindo isolamento populacional. Tal fato pode indicar a ocorrência de espécies crípticas (revisado por BICKFORD et al., 2007), demandando, portanto, a investigação de padrões de variação molecular e ecológicos em toda a área de ocorrência do complexo '*C. coccinea*'. Uma vez que abrigam grande parte da diversidade biológica do planeta, regiões tropicais constituem áreas de extrema importância para a identificação de linhagens crípticas, onde processos de especiação ainda são relativamente mal compreendidos (CONDON et al., 2008). Dentro desse contexto, diversos estudos tem demonstrado a necessidade de utilizar múltiplas fontes de caracteres para delimitar espécies, especialmente nas etapas de identificação do número de espécies hipotéticas e de associação de indivíduos a essas espécies (OLAVE; SOLÀ; KNOWLES 2014; DERKARABETIAN et al., 2014; EDWARDS; KNOWLES, 2014).

2.1.2 Objetivos

Este estudo se propõe a revisar a delimitação de espécies para todo o clado '*Cattleya coccinea*', visando complementar o estudo de Rodrigues et al. (2015). Adotaremos o conceito unificado de espécies (DE QUEIROZ, 2007) para responder às seguintes questões:

- 1- As populações das Serras do Mar, da Mantiqueira e do Espinhaço de orquídeas morfológicamente caracterizadas por terem pequeno porte, presença de grandes flores solitárias e pétalas muito maiores do que as sépalas, denominadas aqui de complexo '*Cattleya coccinea*', correspondem a uma linhagem evolutiva única, conforme sugerido pela amostragem preliminar de van den Berg et al. (2009)?
- 2- Os dois conjuntos de populações referentes ao grupo de espécies *Cattleya coccinea* – *C. mantiqueirae* que emergiram no estudo de Rodrigues et al. (2015), sendo um à nordeste e outro à sudoeste localizados na Floresta Atlântica Brasileira correspondem a duas linhagens evolutivas, e portanto, espécies distintas?
- 3- A espécie *Cattleya brevipedunculata* pode ser definida com uma linhagem evolutiva restrita aos campos rupestres das Serras do Espinhaço e da Mantiqueira?
- 4- A espécie *Cattleya wittigiana* pode ser definida com uma linhagem evolutiva restrita à Floresta Atlântica do sul do Espírito Santo?
- 5- Há outras linhagens pertencentes ao complexo '*Cattleya coccinea*' que devem ser reconhecidas como espécies?

2.2 Materiais e Métodos

A descrição dos caracteres morfológicos diagnósticos de cada uma das sete espécies do complexo '*C. coccinea*' estão descritos na Tabela 2.1 de acordo com Fowlie (1987) e Withner (1993).

2.2.1 Coleta de indivíduos

Amostras de 165 indivíduos de populações de espécies do complexo '*Cattleya coccinea*' (Tabela 2.2) foram coletadas para sequenciamento de regiões de cpDNA e ITS 1-2, constituindo-se de partes de folhas ou flores, as quais foram armazenadas em gel CTAB (C.

VAN DEN BERG, comunicação pessoal). Essas amostras foram originárias de 23 localidades, coletadas em 20 municípios distintos (Figura 2.1), compreendendo toda a distribuição geográfica do complexo '*Cattleya coccinea*'. Os vouchers de cada população amostrada serão depositados no Herbário ESA da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Os grupos externos utilizados nas análises filogenéticas abaixo descritas foram definidos de acordo com van den Berg et al. (2009) e são apresentados na Tabela 2.3.

2.2.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA total foi utilizado o protocolo de Doyle e Doyle (1987) com modificações sendo que, posteriormente, todas as amostras foram purificadas utilizando-se o Kit de purificação da Promega (Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System). A quantificação foi realizada utilizando-se 1 µL de DNA total em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e com a escala correspondente a 10 e 50 ng/µL.

Tabela 2.1 - Caracteres diagnósticos considerados para cada uma das sete espécies descritas para o complexo '*Cattleya coccinea*' baseado em Fowlie (1987) e Withner (1993)

Espécies	Habitat	Folhas	Pseudobulbos	Florescimento	Cor das flores
<i>Cattleya acuiensis</i>	Pico de Açu - Serra dos Órgãos, RJ	Curvadas e ovais curto-pecioladas	Vermelhos, atarracados e sub-arredondados	Setembro-Novembro; Maio-junho	Vermelho pálido intenso
<i>Cattleya dichroma</i>	Sul do ES	Até 15cm, nervura central e margem vermelhas	Lisos, cilíndricos e avermelhados	Abril-Junho	Vermelho
<i>Cattleya brevipedunculata</i>	Serra do Espinhaço, leste do Caparaó, MG	Ovais, verdes, mais alongadas	Fila dupla	Abril-Maio	Salmão-avermelhada
<i>Cattleya coccinea</i>	RS, SC, PR, SP, RJ (Serra do Mar) e sul do ES	Estreitas e eretas; nervura central vermelhas	Cilíndricos	Março-Abril; Julho-Setembro	Vermelho
<i>Cattleya mantiqueirae</i>	Serra da Mantiqueira (RJ, SP, MG)	Ovais e curvadas, sem nervura central vermelha	Robustos e arredondados	Janeiro-fevereiro; Setembro-Outubro	Vermelho
<i>Cattleya pygmaea</i>	Montanhas costeiras do ES e RJ	Lanceoladas	Globulares	Abril-Julho	Vermelho forte
<i>Cattleya wittigiana</i>	Caparaó a leste da Pedra Azul, ES	Ovais	Fila dupla	Abril -Junho	Rosa

Tabela 2.2 - Populações do complexo *Cattleya coccinea* coletadas para sequenciamento em suas respectivas localidades e estados, com código e sigla de identificação, número de indivíduos coletados, altitude e coordenadas geográficas
(Continua)

Código	Sigla	Localidade	Número de indivíduos	Altitude (metros)	Latitude	Longitude
1	CSRS	Cambará do Sul, RS	10	1030	S 29° 04. 053	W 49° 57. 38
2	JOSC	Joinville, SC	5	1300	S 26° 02. 39	W 48° 57. 44
3	PMPR	Pico do Marumbi, PR	8	1400	S 25° 27. 03	W 48° 54. 99
4	CBSP	Cubatão, SP	1	700	S 23° 50. 10	W 46° 28. 19
5	SASP	Santo André, SP	2	760	S 23° 46. 44	W 46° 18. 05
6	SBSP	São Bernardo do Campo, SP	2	790	S 23° 53. 35	W 46° 34. 00
7	PASP	Parelheiro, SP	1	755	S 23° 51. 51	W 46° 44. 50
8	SLSP	Salesópolis, SP	1	850	S 23° 34. 02	W 46° 48. 47
9	CJSP	Campos do Jordão, SP	10	1874	S 22° 42. 27	W 45° 28. 4
10	SJTSP	S. J. do Barreiro/Tira chapéu, SP	10	2060	S 22° 46. 30	W 44° 39. 63
11	SJPSP	S. J. do Barreiro/Pico da Bacia, SP	10	1800	S 22° 42. 48	W 44° 5. 10
12	BASP	Bananal, SP	5	700	S 22° 45. 39	W 44° 23. 04
13	PERJ	Petrópolis, RJ	10	1100	S 22° 25. 58	W 43° 22. 42

Tabela 2.2 - Populações do complexo *Cattleya coccinea* coletadas para sequenciamento em suas respectivas localidades e estados, com código e sigla de identificação, número de indivíduos coletados, altitude e coordenadas geográficas (Conclusão)

Código	Sigla	Localidade	Número de indivíduos	Altitude (metros)	Latitude	Longitude
14	NFCRJ	Nova Friburgo/Cumieira, RJ	10	1300	S 22° 23. 19	W 42° 29. 06
15	NFPRJ	Nova Friburgo/Pirineus, RJ	10	1150	S 22° 26. 18	W 42° 30. 16
16	LDMG	Lima Duarte, MG	10	1375	S 21° 42. 50	W 43° 50. 50
17	OBMG	Ouro Branco, MG	10	1511	S 20° 29. 11	W 43° 34. 43
18	ACMG1	Alto Caparaó, MG	8	1862	S 20° 24. 23	W 41° 50. 19
19	ACMG2	Alto Caparaó, MG	2	1985	S 20° 24. 38	W 41° 50. 30
20	DMES	Domingos Martins, ES	10	1909	S 20° 23. 97	W 41° 01. 49
21	STES	Santa Teresa, ES	10	700	S 19° 58 11	W 40° 32. 11
22	ITMG	Itambé, MG	10	700	S 19° 25. 59	W 43° 27. 10
23	MPMG	Morro do Pilar, MG	10	1300	S 19° 14. 47	W 43° 30. 36

Figura 2.1 - Mapa de relevo mostrando os 23 locais de amostragem de indivíduos das espécies do clado *Cattleya coccinea* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil para sequenciamento de DNA. Os números correspondem às localidades de acordo com a Tabela 2.2

Tabela 2.3 - Nome e número de registro em herbários das espécies utilizadas para as análises filogenéticas com grupo externo
(Continua)

Nome da espécie	Voucher
<i>Cattleya alajorii</i> Brieger; Bicalho	C. van den Berg (dados não publicados)
<i>Cattleya alajorii</i> Brieger; Bicalho	(Brieger) (ESA) 19179
<i>Cattleya bicalhoi</i> Van den Berg	C. van den Berg (dados não publicados)
<i>Cattleya cernua</i> (Lindl.) Van den Berg	(Bicalho 31219) (ESA) 119236
<i>Cattleya cernua</i> (Lindl.) Van den Berg	Brieger Coll. 15737 (ESA)
<i>Cattleya cernua</i> (Lindl.) Van den Berg	C. van den Berg (dados não publicados)
<i>Cattleya crispa</i> Rchb.f.	C. van den Berg (dados não publicados) Brieger Coll. 3914 (ESA)
<i>Cattleya endsfeldzii</i> (Pabst) Van den Berg	(Col. Pess. s/n)
<i>Cattleya fidelensis</i> Pabst	C. van den Berg (dados não publicados) C225-Machado s.n. (ESA)
<i>Cattleya grandis</i> Lindl.; Paxton	C. van den Berg (dados não publicados) Brieger Coll. 19209 (ESA)
<i>Cattleya harpophylla</i> (Rchb.f.) Van den Berg	(Brieger) Coll. 6687 (ESA)
<i>Cattleya jongheana</i> Rchb.f.	C. van den Berg (dados não publicados) Brieger Coll. 31534 (ESA)
<i>Cattleya. jongheana</i> (Rchb. f.) Van den Berg	(J.F.Rodrigues 8244) ESA121859
<i>Cattleya labiata</i> (Lindl.) Veitch	C. van den Berg (dados não publicados)
<i>Cattleya labiata</i> Lindl.	(Brieger) ESA5487
<i>Cattleya lawrenceana</i> Rchb.f.	C. van den Berg (dados não publicados) Brieger Coll. 3802 (ESA)
<i>Cattleya lobata</i> (Lindl.) Veitch	C. van den Berg (dados não publicados) Brieger Coll. 3557 (ESA)
<i>Cattleya lueddemanniana</i> Rchb.f.	C. van den Berg (dados não publicados) Brieger Coll. 3759 (ESA)
<i>Cattleya lundii</i> (Rchb.f.) Withner	C. van den Berg (dados não publicados)
<i>Cattleya lundii</i> (Rchb.f.; Warm.) Van den Berg	(Brieger) ESA30692

Tabela 2.3 - Nome e número de registro em herbários das espécies utilizadas para as análises filogenéticas com grupo externo (Conclusão)

Nome da espécie	Voucher
<i>Cattleya luteola</i> Lindl.	C. van den Berg (dados não publicados)
<i>Cattleya perinii</i> (Lindl.) Van den Berg; M.W.Chase	(Brieger) ESA652
<i>Cattleya perrini</i> Batem.	C. van den Berg (dados não publicados)
<i>Cattleya pfisteri</i> Pabst; Senghas	C. van den Berg (dados não publicados) van den Berg C226 (ESA)
<i>Cattleya praestans</i> Linden; Rehb.f.	C. van den Berg (dados não publicados) C217-Machado s.n. (ESA)
<i>Cattleya pumila</i> (Hook.) Rehb.f.	C. van den Berg (dados não publicados) Van den Berg C226 (ESA)
<i>Cattleya purpurata</i> Lindl.; Paxton	C. van den Berg (dados não publicados)
<i>Cattleya purpurata</i> (Lindl.; Paxton)	(Van den Berg&Chase) O-997 (K)
<i>Cattleya rupestris</i> (Lindl.) Van den Berg	(Van den Berg) ESAC33
<i>Cattleya sincorana</i> Schltr	C. van den Berg (dados não publicados) van den Berg C263 (K spirit)
<i>Cattleya tenebrosa</i> (Rolfe) Rolfe	C. van den Berg (dados não publicados) van den Berg C279 (K spirit)
<i>Cattleya virens</i> Lindl	C. van den Berg (dados não publicados) van den Berg C18 (ESA)
<i>Cattleya xanthina</i> Lindl. ex Hook.	C. van den Berg (dados não publicados) Brieger Coll. 6662 (ESA)

2.2.3 Amplificação de sequências de DNA

Todas as amplificações foram realizadas no termociclador Bio-rad (T100™ Thermal Cycler). Para as reações de amplificação do DNA foram utilizados um coquetel contendo 10X buffer (Thermo Scientific, Burlington, Canadá) constituído de 100mM Tris-HCl (pH 8.8), 500mM KCL 0.8% (v/v) Nonidet P40; 4mM de MgCl₂; 3mM de dNTPs (Ludwig Biotec); 10 pmol dos iniciadores; 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific) e aproximadamente 5-30ng/μL do DNA molde. Com o objetivo de potencializar a reação de amplificação das regiões ITS1-2, foi adicionado 12 μL de uma solução saturada de Betaína 5M que tem a função de auxiliar a amplificação em reações com conteúdo de GC elevado. O volume final das reações foi de 50 μL. Os produtos de amplificação foram enviados para o sequenciamento na empresa MACROGEN (Macrogen Corporation, Coreia do Sul). Os programas para amplificação das regiões plastidiais e ITS1-2 estão descritos nas Tabelas 2.4, 2.5 e 2.6, respectivamente. As sequências de DNA de cada região serão depositadas no GenBank.

Tabela 2.4 - Protocolo da reação de amplificação para sequenciamento de DNA das regiões de cloroplasto *rpS16/trnK*; *trnF-c/trnF-f*; *psbJ/petA* e *atpL/atpH*. As etapas 3, 4 e 5 foram repetidas 35 vezes

1	95°C	5 min	Desnaturação inicial
2	80°C	adição da <i>taq</i>	
3	94°C	1 min	Desnaturação
4	50°C ou 52°C	30s	Anelamento
5	72°C	30s	Extensão
6	72°C	5 min	Extensão final

Tabela 2.5 - Protocolo da reação de amplificação para sequenciamento de DNA das regiões de cpDNA *rpL32/trnL* e *psbA-H-3/trnI*. As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas 35 vezes

1	80°C	5 min	Desnaturação inicial
2	94°C	1 min	Desnaturação
3	52°C	1 min	Anelamento
4	65°C	5 min	Extensão
5	65°C	5 min	Extensão final

Tabela 2.6 - Protocolo da reação de amplificação para sequenciamento de DNA da região nuclear *ITS1* e 2. As etapas 3, 4 e 5 foram repetidas 35 vezes

1	99°C	10 min	Desnaturação inicial
2	80°C	adição da <i>taq</i>	
3	94°C	45 s	Desnaturação
4	60°C	45 s	Anelamento
5	72°C	1 min	Extensão
6	72°C	3 min	Extensão final

2.2.4 Amplificação de marcadores microssatélites

Um total de 302 indivíduos provenientes de 12 distintas populações do complexo *C. coccinea* foram utilizados. A tabela de coleta dos indivíduos com as respectivas informações estão descritas no capítulo 3. Os dados de marcadores microssatélites foram obtidos a partir do teste de 18 iniciadores desenvolvidos por Novello et al. (2013), onde nove desses iniciadores foram escolhidos por apresentarem bons resultados de amplificação e polimorfismo (Cac01, Cac02, Cac05, Cac09, Cac10, Cac11, Cac13, Cac16 e Cac18). Além disso, mais dois iniciadores utilizados por Leal (2013) (Cac26 e Cac27) foram adicionados à análise resultando em um total de 11 marcadores (Tabela 2.7). A amplificação dos microssatélites seguiu o protocolo de Schuelke (2000), utilizando três tipos de iniciadores distintos: a cauda M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC) adicionada ao iniciador “forward” na sua extremidade 5’; o iniciador “reverse”; e a cauda universal M13 marcada com fluorocromo específico para leitura em sequenciador automático, sendo utilizadas duas caudas diferentes (FAM e Hex) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 30 µL de um coquetel contendo tampão 10X (Thermo Scientific, Burlington, Canadá) constituído de 100mM Tris-HCl (pH 8.8), 500mM KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40; 2mM de MgCl₂ (Thermo Scientific); 1,2mM de dNTPs (Ludwig Biotec, Alvorada, RS, Brasil); 10 pmol de cada iniciador (0,2 µL para o iniciador *forward* e 1µL para o iniciador *reverse*); 1 pmol calda universal M13, 1 U *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific) e 2 µL de DNA molde a 10-20 ng/µL. No processo de amplificação as amostras foram posteriormente analisadas em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo. Todas as amostras foram purificadas utilizando-se o Qiagen® QIA PCR Purification Kit (Thermo Scientific) e a concentração e qualidade do produto purificado

foi avaliado em gel de agarose (1%). Depois do processo de amplificação e purificação, as amostras foram enviadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo, São Paulo) onde foram genotipadas em sequenciador automático modelo ABI3730. Os eletroferogramas obtidos foram visualizados e analisados com auxílio do programa computacional *GeneMarker*® v. 1.95 (Softgenetics).

Tabela 2.7 - Iniciadores de microssatélites utilizados no estudo, contendo nome, sequência *forward* e *reverse*, tamanho esperado em pares de base (pb), temperatura de anelamento utilizada e concentração de $MgCl_2$

Nome do Iniciador	Sequência	Tamanho esperado (pb)	Ta	$MgCl_2$ (mM)
Cac01	F: TACAACGCCCAATTTGAATG R: CCATCATTTGCCTTTTCACA	108	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac02	F: CAGGATTTCTCCTCGTGCTC R: GCAGAGCGGAACAAGGATAG	173	52°C	2
Cac05	F: GTGCGTATTGTGAGTGGATGT R: TCACGCATGCATAAGTTCAA	278	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac09	F: GGGAGGGAGGAATAGGAAGA R: TGAGCTGCGATATCAAAGGA	179	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac10	F: GCATGAGTGCTTGTGTGAAG R: TAAGCATGCACTCACGATACA	184	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac11	F: TCAAGGCCTGCACATAGAGA R: AAGAGGAAGGCTTCGTTGC	167	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac13	F: ACAACCGTCGGCACCTTTA R: GCGGGATTAGTCAAGGTTCAAT	115	54°C	1,5
Cac16	F: AACAGGCATTTGGAGCTTTT R: CCTCATTTCTCTCACCCTCTTT	250	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac18	F: CTGGTGAGGGAGAAGAAAAACA R: CCCTCTCCCTCTCTTTTCCA	224	60°C	2
Cac26	F: TGGCTTGGTGTTGCATTTAT R: TGTGAGCCTCAATAAGCCAAT	167	60°C	2
Cac27	F: TGGATCTTACCTTGGGCTTCTA R: CCCTGCTCTCTTTCTCACTCAT	209	64°C	2

2.2.5 Análises de dados

Para a revisão dos limites entre espécies proposta neste estudo, foram considerados critérios operacionais filogenéticos (baseados em análises de rede, árvores individuais de genes e árvores de espécies) e de coesão genética (análises de atribuição de indivíduos a agrupamentos). A decisão sobre as espécies a serem reconhecidas foi baseada no consenso entre os métodos utilizados.

2.2.5.1 Monofiletismo do complexo '*Cattleya coccinea*'

Para corroborar o monofiletismo do complexo '*Cattleya coccinea*', conforme sugerido pelo estudo de van den Berg et al. (2009), foram estimadas árvores de genes baseadas em análises filogenéticas bayesianas considerando 25 espécies no grupo externo (Tabela 2.3) e oito indivíduos do grupo interno, representando a amplitude de distribuição geográfica e ecológica do grupo (Tabela 2.2). Foram amostradas as regiões plastidiais *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *rpL32-trnL*, e a região ITS 1-2 do DNA nuclear (Tabela 2.8), de acordo com iniciadores originalmente publicados por Aldrich et al. (1988), Taberlet et al. (1991), Shaw et al. (2007) e Sun et al. (1994) respectivamente. Essas regiões foram escolhidas a partir de testes preliminares realizados a partir de 14 sequências e descritas nos trabalhos acima citados. O critério de escolhas das sequências foi a facilidade de amplificação e o polimorfismo detectado para amostras do presente trabalho.

A edição das sequências foi realizada no programa Chromas Lite© (2005 Technelysium Pty Ltda) e posteriormente as sequências complementares foram combinadas em uma sequência consenso no software SeqMan 7.0 (DNASTAR Inc). As sequências consenso foram então alinhadas considerando parâmetros originais do programa MAFFT (KATO et al., 2002; KATO; TOH, 2008) implementado no programa Mesquite, v. 2.75 (MADDISON; MADDISON, 2011). A identificação das fases dos alelos com mais de uma posição heterozigótica nas sequências nucleares foi feita no programa PHASE (STEPHENS; DONNELLY, 2003) implementado no programa DNAsp v. 5.10.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Foram utilizadas 1000 repetições principais e de *burn-in*. Somente as sequências com resultados de probabilidade posterior acima de 0,9 foram consideradas. A seleção dos modelos evolutivos mais adequados para cada partição foi feita no programa jModelTest2 v.0.1.1 (GUINDON; GASCUEL, 2003; DARRIBA et al., 2012), utilizando o critério de informação bayesiana ("*bayesian information criterion*", BIC (SCHWARZ, 1974)). Esse critério foi escolhido por ser mais indicado para grandes tamanhos amostrais e também

porque o BIC realiza comparações par a par dos modelos, permitindo assim uma comparação de múltiplos modelos mais facilmente (BOS; POSADA, 2005).

Análises filogenéticas foram realizadas no programa MrBayes v.3.14 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Duas análises distintas foram realizadas, considerando a região nuclear e todas as regiões plastidiais concatenadas. Os parâmetros dos modelos de evolução implementados foram considerados independentes para cada partição. Em cada análise foram consideradas duas corridas simultâneas, levando-se em consideração quatro cadeias MCMC (três quentes e uma fria) e 10^6 gerações, sendo a frequência de amostragem de 1000 gerações. Apenas valores abaixo de 0,01 referentes à média dos desvios padrão da verossimilhança entre as duas cadeias MCMC foram considerados na convergência entre cadeias satisfatória. O programa Tracer v. 1.5.0 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2011) foi utilizado para verificar a convergência de todos os parâmetros amostrados nas duas cadeias de MCMC, sendo descartadas 25% das árvores iniciais (*burn-in*).

Considerando que eventos de hibridização natural são comuns entre espécies do gênero *Cattleya* (VAN DEN BERG, 2014a) e que análises filogenéticas prévias baseadas em dados nucleares e plastidiais indicaram discordância entre as relações filogenéticas de espécies de *Cattleya* (VAN DEN BERG, 2014b), nós adotamos adicionalmente uma abordagem de análise de redes. Redes permitem a investigação de relações evolutivas reticuladas, que não são adequadamente descritas em árvores filogenéticas (BAPTESTE et al., 2013). Redes mínimas de hibridização foram geradas de acordo com o algoritmo de ALBRECHT et al. (2011) implementado no programa Dendroscope 3 (HUSON; SCORNAVACCA, 2012) a partir das árvores filogenéticas obtidas de acordo com os procedimentos acima citados.

2.2.5.2 Delimitação de espécies

Nossa abordagem para delimitação de espécies consistiu de duas etapas. Na primeira, espécies hipotéticas foram estimadas através de árvores de genes plastidiais e baseadas na região nuclear ITS1/ITS2 bem como através de algoritmos de agrupamento que minimizam o desequilíbrio de Hardy-Weinberg, uma vez que há incerteza na atribuição de populações a espécies (CARTENS, 2013; OLAVE et al., 2014).

As análises filogenéticas consideraram três espécies como grupo externo (*Cattleya harpophylla*, *Cattleya endsfeldzii* e três indivíduos de *Cattleya cernua* (Tabela 2.3) e 23 localidades ao longo de toda amplitude de distribuição geográfica do grupo, sendo amostrados de 1 a 10 indivíduos em cada localidade (Tabela 2.2). Além da região do DNA nuclear ITS1-

2, foram sequenciadas as regiões 3'*rpS16*-5'*trnK*; *rpL32-trnL*; *psbJ-petA* e *atpI-atpH* do genoma plastidial (iniciadores originalmente publicados por Shaw et al., 2007) (Tabela 2.8).

Foram inferidos agrupamentos genéticos através da filiação de indivíduos por métodos bayesianos implementados no programas STRUCTURE versão 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2007). Nessa análise foram utilizados um total de 302 indivíduos provenientes de 12 localidades (CSRS, SJPSP, SJTSP, CJSP, PERJ, ACMG, LDMG, OBMG, ITMG, MPMG, DMES e STES), variando de 15 a 36 indivíduos por localidade dentre as 23 coletadas (Tabela 3.1) que encontra-se no cap.3. Foram realizadas dez simulações independentes para cada valor de número de agrupamento K, variando de 1 a 10. Este programa utiliza o método de agrupamento Bayesiano não-espacial através dos métodos de Monte Carlo via Cadeias de Markov (*Markov Chain Monte Carlo*, MCMC). Em cada simulação foram feitas 500.000 iterações com descarte inicial (*burn-in*) de 250.000 iterações. O número mais provável de agrupamentos foi estimado pelo método ΔK de Evanno et al. (2005).

Tabela 2.8 - Nome e sequência dos iniciadores de cpDNA utilizados neste estudo e a região de nrDNA ITS de acordo com, Shaw et al. (2007), Aldrich et al. (1988), Taberlet et al. (1991) e Sun et al. (1994), respectivamente

Nome do Iniciador	Sequência
<i>atpI</i>	TAT TTA CAA GYG GTA TTC AAG CT
<i>atpH</i>	CCA AYC CAG CAG CAA TAA C
<i>psbJ</i>	ATA GGT ACT GTA RCY GGT ATT
<i>petA</i>	AAC ART TYG ARA AGG TTC AAT T
<i>rpL32-F</i>	CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C
<i>trnL</i> (UAG)	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT
<i>rpS16x2F2</i>	AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC
<i>trnK</i> (UUU)x1	TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC
<i>psbA3'f</i>	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C
<i>trnHf</i>	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC
<i>trnL-Fc</i>	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG
<i>trnL-Ff</i>	ATT TG AAC TGG TGA CAC GAG
<i>ITS 1</i>	ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G
<i>ITS 2</i>	TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C

2.2.5.3 Árvore de espécies

Relações filogenéticas entre espécies hipotéticas definidas acima foram inferidas através de uma abordagem bayesiana de árvores de espécies baseadas no modelo coalescente multi-espécies do programa *BEAST v1.8.2 (HELED; DRUMMOND, 2010) implementado no programa BEAST versão 1.7.4 (DRUMMOND et al., 2012). As análises consideraram as sequências plastidiais e nucleares separadamente para que cada respectivo modelo evolutivo selecionado previamente pudesse ser aplicado. O programa BEAUti 1.7.4 (DRUMMOND et al., 2012) gerou o arquivo para a árvore de espécies, onde foi escolhido o processo de especiação “Yule”. Foram realizadas para cada hipótese de número de espécies duas corridas de 100 milhões de gerações cada, totalizando 200 milhões de gerações com *burn in* de 10%. Posteriormente, foi verificada a convergência dos dados no programa Tracer versão 1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2009) onde valores ESS acima de 200 foram verificados, sendo depois cada corrida transformada em um único arquivo pelo programa LogCombiner versão 1.7.4 (DRUMMOND et al., 2012). As árvores de espécies foram reconstruídas no programa TreeAnnotator (Drummond et al. 2012) considerando um *burnin* de 10%. Nessa análise foram considerados como hipóteses do número de espécies os resultados obtidos a partir das análises filogenéticas (cinco espécies para as regiões cpDNA e quatro para a região ITS). Além disso, os resultados da análise de atribuição de indivíduos também foram considerados com K=2 e K=8.

2.3 Resultados

2.3.1 Árvores de genes

O comprimento das sequências de cada uma das regiões consideradas nas análises filogenéticas para testar o monofiletismo do clado ‘*C. coccinea*’ variou de 659 a 991 pb, e para estimar as relações internas deste mesmo clado, variou de 658 a 988pb. Os modelos evolutivos selecionados foram F81+G, TPM1uf, TPM1uf+G e HKY+I+G no primeiro caso, e TPM2uf+G, TPM1uf+G, F81+G e TrN+G no segundo caso e os respectivos modelos de evolução selecionados são apresentados nas(Tabelas 2.9 e 2.10).

Tabela 2.9 – Modelos evolutivos selecionados para cada região, implementados na análise filogenética para testar o monofiletismo do clado '*C. coccinea*'. Para cada região foram consideradas 39 sequências. PB: Pares de base

Iniciadores	PB	Modelo Evolutivo
psbA/trnH	792	F81+G
rpL32/trnL	979	TPM1uf
trnL/trnF	991	TPM1uf+G
ITS1/ITS2	659	HKY+I+G

Tabela 2.10 – Modelos evolutivos selecionados para cada região, implementados na análise filogenética para estimar as relações internas no clado '*C. coccinea*'. PB: Pares de base; N: número de sequências

Iniciadores	PB	N	Modelo Evolutivo
atpI/apH	813	162	TPM2uf+G
psbJ/petA	988	162	TPM1uf+G
rpL32/trnL	963	162	TPM1uf+G
rpS16/trnK	658	162	F81+I+G
ITS1/ITS2	784	158	TrN+G

2.3.2 Monofiletismo de '*C. coccinea*'

As árvores resultantes das análises filogenéticas que tinham como objetivo corroborar o monofiletismo do complexo '*C. coccinea*' são apresentadas nas Figuras 2.3 e 2.4, representando, respectivamente as regiões plastidiais concatenadas e a árvore de ITS. A rede de hibridação mínima estimada para as árvores plastidiais e de ITS é ilustrada na Figura 2.5.

Na árvore baseada em sequências das quatro regiões plastidiais concatenadas, o monofiletismo do clado '*C. coccinea*' foi corroborado com probabilidade posterior (PP) de 91% (Figura 2.2). Já para a região nuclear (ITS), o monofiletismo do grupo não foi corroborado (Figura 2.3). Espécimes ocorrentes nas Serras do Mar e da Mantiqueira (com exceção de um indivíduo da localidade de Petrópolis/RJ) emergiram como um clado (PP 100%), enquanto que o espécime de Petrópolis/RJ e os dois espécimes da Serra do Espinhaço amostrados se mostraram filogeneticamente mais próximos das espécies de *C. rupestris*, *C. endsfeldzii*, *C. pfisteri* e de outro clado composto por *C. cernua*, *C. harpophylla*, *C. lundii*, *C. lueddemanniana* e *C. lawrenceana*, com suporte extremamente pequeno (PP 0,56; Figura 2.3).

A análise de redes mínimas de hibridização resultou em 756 redes consenso, sendo que o complexo '*Cattleya coccinea*' emergiu como monofilético em todas elas (Figura 2.4).

Também foi possível observar nas redes de consenso quatro eventos de reticulação principais que podem explicar as inconsistências entre as árvores plastidial e de ITS. O primeiro evento indica uma reticulação antiga, entre o ancestral do complexo '*Cattleya coccinea*' e de todas as outras espécies amostradas referentes às seções *Microlaelia*, *Hadrolaelia*, *Sophronitis* e *Parvilflorae*. Há também um evento de reticulação entre o ancestral do complexo '*Cattleya coccinea*' e *C. harpophylla*. O terceiro evento de reticulação sugerido é entre as espécies do complexo '*Cattleya coccinea*' provenientes da Serra do Espinhaço e aquelas das Serras do Mar e Mantiqueira. Há também um quarto evento de reticulação entre o espécime de Petrópolis/RJ e o ancestral do clado que contém espécies das seções *Cattleyodes* e *Hadrolaelia*. Nenhuma das análises realizadas sugere a proximidade filogenética entre *C. cernua* e o complexo '*Cattleya coccinea*', apesar dessas plantas serem morfológicamente muito semelhantes (FOWLIE, 1987; WITHNER, 1993; VAN DEN BERG, 2014b). A análise de redes mínimas de hibridização também sugere que o complexo '*Cattleya coccinea*' seja considerado irmão das espécies classificadas nas seções *Cattleyodes*, *Hadrolaelia* e *Lawrenceanae* de acordo com van den Berg (2014b).

Figura 2.2 - Árvore filogenética obtida a partir da inferência bayesiana de dados de sequências de três regiões de plastídios *rpL32/trnL*; *psba/trnH* e *trnI/trnF* concatenadas, indicando o monofiletismo do clado. Os números indicam os valores de probabilidade posterior. No clado *C. coccinea* as siglas das amostras indicam as localidades de onde os indivíduos são provenientes de acordo com a Tabela 2.2 das espécies do clado *Cattleya coccinea* e do grupo externo (Tabela 2.3)

Figura 2.4 - Análise de redes mínimas de hibridização a respeito das relações evolutivas reticuladas das espécies do clado *C. coccinea* com as espécies do gênero *Cattleya* de acordo com a Tabela 2.2 das espécies do clado *Cattleya coccinea* e do grupo externo (Tabela 2.3)

2.3.3 Relações filogenéticas em '*C. coccinea*'

O segundo conjunto de análises filogenéticas, com o objetivo de delimitar espécies hipotéticas para o complexo '*C. coccinea*', apresentou três clados principais concordantes entre as matrizes plastídias e de ITS (Figuras 2.5 e 2.6). O clado A (PP 100%) é composto pelos indivíduos coletados em ambientes mais secos das localidades da Serra do Espinhaço (ITMG, MPMG, OBMG), nos campos rupestres da Serra da Mantiqueira (LDMG) e também na Serra do Mar (NFPRJ e STES). O clado B (PP 100%) é composto por indivíduos das localidades de PERJ; NFCRJ; BASP; PASP, SLSP, SASP, SBSP, CBSP, todas localizadas na porção nordeste da área de ocorrência do grupo, sendo restritas à Serra do Mar, e também por indivíduos da localidade de ACMG, ao norte da Serra da Mantiqueira. Já o clado D (PP 100%) é formado por indivíduos da localidade de DMES, localizada ao sul do estado do Espírito Santo e representando o limite norte de distribuição do complexo '*C. coccinea*' na FAB.

Figura 2.5 - Árvore filogenética obtida a partir da inferência bayesiana de dados de sequências de quatro regiões de plastídios: *atpL/atpH*; *rpl32/trnL*; *psbJ/petA* e *rpS16/trnK* concatenados mostrando as relações filogenéticas entre as espécies do clado *C. coccinea*. Os números indicam os valores de probabilidade posterior. As letras e barras representam os clados obtidos e as siglas indicam as localidades de onde os indivíduos são provenientes de acordo com a Tabela 2.2

Figura 2.6- Árvore filogenética obtida a partir da inferência bayesiana de dados de sequências da região de nrDNA (ITS 1-2) mostrando as relações filogenéticas entre as espécies do clado *C. coccinea*. Os números indicam os valores de probabilidade posterior. As letras e barras representam os clados obtidos e as siglas indicam as localidades de onde os indivíduos são provenientes de acordo com a Tabela 2.2

Dois outros clados foram definidos na árvore plastidial: o clado C, que inclui as localidades da região sul do Brasil, ao longo da Serra do mar (CSRS; JOSCS; PMPR; PP 100%) e o clado E (PP 93%) composto por indivíduos coletados nas localidades de CJSP na Serra da Mantiqueira, além de SJTSP situada na Serra do Mar. O clado F contém as espécies coletadas na Serra do Mar na localidade de SJPSP (PP 100%) (Figura 2.5). Na árvore de ITS, os indivíduos distribuídos nos clados C, E e F da árvore plastidial emergem como um único clado C (100% PP) (Figura 2.6). Portanto, enquanto a árvore filogenética plastidial sugere o reconhecimento de seis espécies, a árvore nuclear da região ITS reconhece apenas quatro espécies.

As relações entre os clados descritos acima também é distinta entre as árvores plastidial e de ITS. Enquanto que na árvore plastidial o clado A emerge como irmão de todos os outros, sendo o clado B irmão dos clados (D(C+E+F)), na árvore de ITS os clados A+B são irmãos dos outros (PP 98-100%).

2.3.4 Análises de filiação de indivíduos

As análises foram consideradas em duas etapas. Primeiramente, foram considerados todos os indivíduos provenientes das 12 localidades amostradas (descritas no capítulo 3) para os marcadores microsatélites (Tabela 2.7). O valor de K mais provável foi igual a dois (Figura 2.7A). Essa atribuição considera um primeiro grupo (em vermelho) formado por indivíduos das localidades na Serra do Espinhaço (OBMG, ITMG, MPMG) e por LDMG, situada nos campos rupestres da Serra da Mantiqueira, além de STES, proveniente do sul do Espírito Santo (Figura 2.7B). Essas localidades referem-se ao clado A das análises filogenéticas. O segundo grupo (em verde) refere-se aos indivíduos das localidades ao longo de todo gradiente latitudinal da Serra do Mar (CSRS, SJPSP, SJTSP, PERJ, DMES) e da Serra da Mantiqueira (CJSP e ACMG), correspondentes aos clados B-F das análises filogenéticas (Figuras 2.5 e 2.6). Não houve indicação de fluxo gênico entre os dois grupos geneticamente distintos recuperados (Figura 2.7B).

Figura 2.7 - A: Gráfico obtido para verificar o número de grupos, pelo método de Evanno et al. (2005), sendo $K=2$; B: Agrupamento obtido pela análise bayesiana pelo programa Structure, sendo que o grupo em verde é composto pelas localidades ACMG; PERJ; DM/ES; CJSP; CSRS; SJTSP e SJPSP. O grupo em vermelho é formado pelas localidades LDMG; OBMG; ITMG; MPMG e STES, conforme descritas na Tabela 2.7

Adicionalmente, foram realizadas análises considerando-se os dois grupos definidos nesta primeira análise separadamente. Em uma primeira análise considerando-se as localidades LDMG, OBMG, ITMG, MPMG e STES, observou-se a formação de três grupos geneticamente distintos ($K=3$): OBMG e LDMG; ITMG e MPMG e STES (Figura 2.8). Nesta análise pode-se observar que alguns indivíduos apresentam diferentes graus de provável hibridização entre os diferentes grupos.

Na terceira e última análise foram consideradas as localidades de CSRS; SJPSP; SJTSP; CJSP; PERJ; DMES e ACMG. Os resultados indicaram $K=5$ como o valor mais provável (Figura 2.9A), sendo que os indivíduos de cada localidade foram atribuídos a grupos geneticamente distintos, com exceção de CJSP e SJTSP, e de ACMG e PERJ, que formaram um único grupo (Figura 2.9B). Os grupos mostram a probabilidade de atribuição de determinados indivíduos a níveis diferentes de hibridização.

A **B**

Figura 2.8 – A: Gráfico obtido para verificar o número de grupos, pelo método de Evanno et al. (2005), sendo $K=3$; B: Agrupamento obtido pela análise bayesiana pelo programa Structure, sendo que o grupo vermelho é composto pelas localidades de LDMG e OBMG; o verde é composto por: ITMG e MPMG; e o grupo azul: STES

A **B**

Figura 2.9 – A: Gráfico obtido para verificar o número de grupos, pelo método de Evanno et al. (2005), sendo $K=5$; B: Agrupamento obtido pela análise bayesiana pelo programa Structure, sendo que no grupo amarelo estão contidos os indivíduos das localidades de ACMG e PERJ; no grupo vermelho: DMES; azul: CJSP e SJTSP; rosa: CSRS e no grupo verde: SJPSP

2.3.5 Árvore de espécies

Foram realizadas quatro análises de árvores de espécies distintas, considerando as delimitações propostas pelos diferentes conjuntos de dados (árvores de plastídios, árvore nuclear e análise de atribuição de indivíduos a populações). Os resultados indicaram que a hipótese obtida a partir da análise de atribuição de indivíduos (programa STRUCTURE) com oito grupos geneticamente distintos apresentou os índices de probabilidade posterior maiores sendo, portanto, a árvore de espécie escolhida (Figura 2.10) mostrando oito distintas espécies para o clado *C. coccinea*.

Figura 2.10 – Árvore de espécie obtida a partir do modelo coalescente mostrando oito distintas espécies para o clado *C. coccinea*. Os números representam as probabilidades posteriores. As siglas representam as localidades amostradas de acordo com a Tabela 2.2

2.4 Discussão

2.4.1 Monofiletismo do complexo ‘*C. coccinea*’

O monofiletismo do complexo ‘*C. coccinea*’ foi corroborado pela árvore filogenética baseada em sequências plastidiais, bem como pela rede mínima de hibridação obtida a partir das árvores de genes plastidiais e da região ITS do genoma nuclear. No entanto, esse resultado não foi recuperado na árvore de gene correspondente à região ITS.

A discordância entre árvores plastidiais e nucleares tem sido frequentemente relatada em estudos que utilizam as duas regiões em análises filogenéticas (BALDWIN et al., 1995; YOO; LOWRY II; WEN, 2002; OKUYAMA et al., 2005; RAMIREZ, 2006; OLIVEIRA et al., 2014) e também em filogenias de espécies de orquídeas da FAB (VAN DEN BERG et al., 2005; KOEHLER et al., 2008; VAN DEN BERG et al., 2009). Essa incongruência pode estar relacionada a diversos fatores, tais como hibridação e introgressão ou ainda a retenção de polimorfismo ancestral (SOLTIS et al., 1991; SOLTIS; KUZOFF, 1995; DOYLE, 1997; MADDISON, 1997).

Eventos de hibridação e introgressão em espécies do gênero *Cattleya* têm sido frequentemente relatados (YAMAGUCHI-COSTA, FORNI-MARTINS, 2009; SANTOS, 2011). Segundo van den Berg (2014a), 125 híbridos naturais intragenéricos já foram identificados para *Cattleya*, além de eventos de hibridação com espécies de gêneros filogeneticamente próximos (VAN DEN BERG, 2010). Os resultados deste estudo reforçam hipóteses de ocorrência de múltiplos eventos de reticulação entre espécies das Séries *Cattleyodes*, *Hadrolaelia*, *Parviflorae* e *Sophronitis* (segundo classificação de VAN DEN BERG, 2014b). Particularmente para o complexo ‘*C. coccinea*’, identificamos quatro níveis de evolução reticulada com espécies de outras Séries do gênero *Cattleya* e dentro do próprio complexo ‘*C. coccinea*’ (Figura 2.4).

Um dos eventos que emergiram da árvore mínima de hibridação sugere uma história de reticulação entre o complexo ‘*C. coccinea*’ e o ancestral das Séries *Microlaelia*, *Lawrenceanae* e *Parviflorae* e o ancestral do complexo ‘*C. coccinea*’ (Figura 2.4). Dentre estas, a Série *Parviflorae* é, biogeograficamente, mais similar a plantas do complexo ‘*C. coccinea*’, sendo constituída por plantas restritas ao sudeste do Brasil e encontradas principalmente como rupícolas em campos rupestres, com apenas cinco espécies epifíticas e restritas a matas do Espírito Santo (VEROLA et al., 2007; VAN DEN BERG, 2014a). *Cattleya lundii*, a única espécie que compõe a Série *Microlaelia*, é epífita e apresenta uma

distribuição muito mais ampla e em ambientes mais quentes do que plantas da Série *Parviflorae* e do complexo '*C. coccinea*' (CHIRON; CASTRO NETO, 2002). As espécies da Série *Lawrenceanae* são restritas à região amazônica (VAN DEN BERG, 2014b).

O segundo evento de reticulação, envolvendo apenas *C. harpophylla* (Série *Parviflorae*) e o complexo '*C. coccinea*', reforça a hipótese de uma história de diversificação reticulada entre linhagens do complexo '*C. coccinea*' e da Série *Parviflorae* (Figura 2.4). De fato, 13 eventos de hibridação para as Séries *Parviflorae* e *Sophranitis* são relatados na revisão de Van den Berg (2014a). Curiosamente, a espécie *C. cernua*, tradicionalmente relacionada ao complexo '*C. coccinea*', não emergiu em nenhuma de nossas análises como filogeneticamente mais próxima de indivíduos do complexo '*C. coccinea*'. Embora morfológicamente similar a espécies do complexo '*C. coccinea*', *C. cernua* parece compartilhar uma história de diversificação com reticulação profunda com espécies de outros grupos de *Cattleya*, particularmente com a Série *Parviflorae* e, dentro desta, com a espécie *C. harpophylla*, que constitui uma das espécies epifíticas da Série *Parviflorae*. *C. cernua* é também epífita e ocorre em áreas mais baixas e apresenta distribuição geográfica mais ampla do que as espécies do complexo '*C. coccinea*', restritas a áreas elevadas da FAB (WHITNER, 1993).

Antonelli et al. (2010) sugerem que a diversificação de espécies da Série *Parviflorae* envolveu múltiplos eventos de expansão a partir dos campos rupestres do sul de Minas Gerais, principalmente para o norte de Minas Gerais e para florestas do Espírito Santo. Este cenário seria produto de flutuações climáticas globais a partir do Mioceno médio, há 15 milhões de anos (ZACHOS; DICKENS; ZEEBE, 2008), determinando a expansão da distribuição da vegetação de áreas mais secas em períodos mais quentes e sua retração em épocas mais úmidas (BEHLING, 2002). Segundo Antonelli et al. (2010), a expansão de campos rupestres em períodos mais secos estabeleceria áreas de contato entre linhagens anteriormente isoladas nos afloramentos rochosos. Este cenário é apoiado pelo estudo citogenético de Yamagishi-Costa; Forni-Martins (2009), que sustenta a ocorrência de múltiplos eventos de poliploidização e hibridação em espécies da Série *Parviflorae*. O mesmo cenário também é apoiado pelos resultados deste estudo, que identificou um terceiro nível de reticulação entre linhagens do complexo '*C. coccinea*' restritas a campos rupestres e matas do Espírito Santo e linhagens epifíticas ocorrentes na FAB das Serras do Mar e da Mantiqueira (Figura 2.4). A própria existência de uma linhagem única contendo plantas ocorrendo em campos rupestres e apenas em florestas restritas ao Espírito Santo reforça uma história de diversificação a partir

de áreas mais secas para as florestas úmidas do Espírito Santo seguida de eventos de expansão para florestas mais ao sul na Serra do Mar e da Mantiqueira.

O quarto evento de reticulação que emergiu da rede mínima de hibridação envolve um único indivíduo ocorrente na FAB da localidade de Petrópolis (Serra do Mar, RJ) e o ancestral da espécie das Séries *Cattleyodes* e *Hadrolaelia*, também encontradas em ambientes florestais das Serras do Mar e Mantiqueira. Apesar de pontual, este evento é emblemático pois apoia a ocorrência de eventos de hibridação esporádica entre linhagens distantes de *Cattleya*, conforme sugerido por Van den Berg (2014a). De acordo com Van den Berg (2014a) esses eventos seriam causados principalmente por polinizadores generalistas em áreas de co-ocorrência de espécies de *Cattleya* filogeneticamente distantes.

Se os cenários acima propostos estiverem corretos, esperamos encontrar evidências de diversificação a partir de áreas mais secas para florestas úmidas no sudeste do Brasil, promovida por múltiplos eventos de hibridação entre linhagens do complexo '*C. coccinea*' e entre essas e linhagens da Série *Parviflorae*, com eventuais eventos de hibridação entre linhagens de *Cattleya* filogeneticamente mais distantes, mas ecologicamente semelhantes. Estudos complementares estão em andamento para testar essas hipóteses de diversificação para o complexo '*C. coccinea*'.

2.4.2 Delimitação de espécies

Os resultados das análises filogenéticas e de coesão genética foram complementares, apesar de não inteiramente concordantes (Figuras 2.5 a 2.10). A discordância entre métodos e/ou conjuntos de dados em estudos de delimitação de espécies é esperada, uma vez que cada uma das análises empregadas assume premissas que podem ser violadas pelo sistema de estudo (CARTENS, 2013) e que diferentes genes geralmente apresentam histórias evolutivas distintas, sobretudo em linhagens com origem recente (NACIRI; LINDER, 2015). Neste estudo, a decisão sobre as espécies a serem reconhecidas foi baseada no maior número de evidências considerando as árvores de genes do genoma plastidial e da região nuclear ITS, a estimativa de atribuição de indivíduos a grupos baseadas em microsatélites e a árvore de espécies baseadas em sequências da região ITS e plastidiais.

As duas linhagens evolutivas identificadas no estudo de Rodrigues et al. (2015) foram corroboradas pelo presente estudo. Devido a maior amostragem que apresentamos aqui, foi possível definir com maior clareza as duas espécies, *C. coccinea* e *C. mantiqueirae*, hipotetizadas por Rodrigues et al. (2015). A primeira linhagem recuperada está representada

por localidades à nordeste das Serras do Mar e da Mantiqueira (Figura 2.1). Em Rodrigues et al. (2015) esta área incluiu as localidades de Nova Friburgo e Petrópolis, ambas no estado do Rio de Janeiro na Serra do Mar e Alto Caparaó, no estado de Minas Gerais, localizada na unidade geomorfológica do Maciço do Caparaó, na Serra da Mantiqueira Setentrional (COELHO et al., 2012). O presente estudo amostrou, além dessas três localidades, populações no estado de São Paulo restritas à Serra do Mar até o município de Bananal, localizado na Serra da Bocaina (Figura 2.1). Bananal é a área provável de coleta da planta que foi ilustrada por DESCOURTILZ (1768) e utilizada por LINDLEY (1836) para descrição da espécie *C. coccinea* (ver discussão em RODRIGUES et al., 2015). Portanto, nós propomos aqui que *C. coccinea* passe a abranger populações encontradas na Serra da Mantiqueira Setentrional, no Maciço do Caparaó, e na Serra do Mar, ao sul da falha filogeográfica do rio Doce até a Serra da Bocaina, na região do médio Paraíba do Sul, em altitudes limitadas a 750 m (Figura 2.1).

Inequivocamente, uma segunda espécie que foi recircunscrita aqui é *C. mantiqueirae*, que deve abranger populações ocorrentes na Serra da Mantiqueira Meridional, composta pelas unidades geomorfológicas dos Planaltos de Campos de Jordão e de Itatiaia (MACHADO-FILHO et al., 1983). Esta linhagem já havia sido identificada no estudo de Rodrigues et al. (2015) e foi corroborada por este estudo, que expandiu o conjunto de dados obtidos por Rodrigues et al. (2015) para plantas das localidades do Morro do Tira Chapéu em São José do Barreiro, também na Serra da Bocaina, e Campos do Jordão, na Serra da Mantiqueira (Figura 2.1). Esta última é a localidade tipo da espécies *C. mantiqueirae* (FOWLIE, 1982).

A Serra da Bocaina é formada por um conjunto de planaltos elevados, embora desnivelados entre si, que se situa entre o vale do rio Paraíba do Sul, a norte e nordeste, e o Planalto Paraitinga-Paraibuna, a oeste (ALMEIDA; CARNEIRO, 1998). A ocorrência de linhagens evolutivas distintas na Serra da Bocaina parece estar relacionada a gradientes altitudinais contrastantes, situados em terrenos tectônicos distintos da Faixa Ribeira, com características litológicas, de metamorfismo e estilos estruturais contrastantes (EIRADO et al., 2006). Enquanto o município de Bananal localiza-se no Terreno geológico denominado Paraíba do Sul, São José do Barreiro está localizado no Terreno Embu, no limite norte da Serra da Bocaina (EIRADO et al., 2006). Esta região está relacionada ao tectonismo por falhas do gráben do Paraíba (região do relevo que sofreu rebaixamento dando origem ao vale do rio Paraíba do Sul) e apresenta altitudes semelhantes à Serra da Mantiqueira, localizada do outro lado do vale. Já a região de Bananal está situada no médio vale do rio Paraíba do Sul, com altitudes médias de 500-750 m. Essa região é considerada uma superfície de erosão que estende-se até as escarpas da Serra do Mar (ALMEIDA; CARNEIRO, 1998).

Ainda na localidade de São José do Barreiro na Serra da Bocaina destaca-se uma terceira linhagem, constituída por uma única população do Pico da Bacia, há 1950 m de altitude. Esta população emergiu como uma linhagem distinta das outras nas árvores de plastídios e na árvore de espécies, assim como na análise de atribuição de indivíduos (Figuras 2.5, 2.9 e 2.10). Nós propomos aqui o reconhecimento desta linhagem como uma espécie nova, uma vez que é claramente geneticamente distinta das demais. Além disso, plantas do complexo '*C. coccinea*' estão ameaçadas devido ao seu grande valor ornamental. O reconhecimento da população do Pico da Bacia como espécie distinta é, portanto, de grande importância para sua conservação.

A população de Domingos Martins (Espírito Santo), localizada ao norte da falha do rio Doce, em uma região caracterizada por relevo formado tanto pelo Maciço do Caparaó, quanto pelos Patamares Elevados do Sul Capixaba na Serra na Mantiqueira Sentitritonal (COELHO et al., 2012), emergiu como uma quarta linhagem à parte em todos os conjuntos de dados e análises realizadas. Plantas desta população vem sendo classificadas como *C. coccinea* por causa da semelhança morfológica dos indivíduos encontrados em mata com caracteres considerados típicos para *C. coccinea*, tais como pseudobulbos cilíndricos e folhas alongadas e membranáceas. No entanto, é comum encontrar em áreas abertas, plantas com fenótipo típico daquele atribuído a *C. mantiqueirae*, com pseudobulbos roliços e folhas menores e crassas (J.F. Rodrigues, observação pessoal). Em seu estudo sobre espécies do complexo *C. coccinea*, Fowlie (1987) refere-se a populações do Espírito Santo como uma subespécie distinta da *C. coccinea* da Serra do Mar. A característica mais marcante dessa subespécie, segundo Fowlie (1987), seria o florescimento nos meses de setembro a novembro, que difere completamente da espécie tipo de *C. coccinea* que tem sua principal floração nos meses de julho a setembro, com uma segunda floração em março e abril. Devido à clara distinção filogenética/genética desta linhagem em relação à outras populações da Serra do Mar e da Mantiqueira, recomendamos aqui que esta linhagem seja reconhecida como uma nova espécie. Estudos complementares em filogeografia são necessários para testar rotas de diversificação dessas linhagens, de modo a contribuir para a compreensão de padrões de diversidade na FAB.

A quinta espécie proposta aqui compreende as localidades da Serra do Mar na região sul do Brasil, ao sul da falha geográfica São Paulo-Paraná (Figura 2.1). Essas populações, tradicionalmente identificadas como *C. coccinea*, emergiram como filogeneticamente/genética mais relacionadas a populações da Serra da Mantiqueira. Curiosamente, Fowlie (1987) considerou a ocorrência de uma subespécie de *C. mantiqueirae*,

não de *C. coccinea*, restrita ao cânions no Rio Grande do Sul (provável local de coleta dos indivíduos da localidade de CSRS). Esses indivíduos são descritos como estruturalmente pequenos, com pseudobulbos arredondados levemente clavados e com flores maiores que as *C. mantiqueirae* (FOWLIE, 1987). O autor relata também que muitos consideram esses indivíduos como uma nova espécie, mas que essas populações mereciam mais estudos para a constatação desse fato. Entretanto, o autor considera as populações encontradas nos estados de Santa Catarina e Paraná como sendo *C. coccinea* (FOWLIE, 1987). Estudos sobre filogeografia e genética de populações estão em andamento para avaliar a hipótese de uma expansão norte-sul, determinando menor variabilidade genética nas populações mais ao sul.

As cinco espécies acima propostas emergiram em todas as análises deste estudo como irmãs de duas espécies já descritas e tradicionalmente reconhecidas para o complexo '*C. coccinea*', *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana*. Embora as árvores de genes plastidiais e nuclear não distinguem essas duas espécies, a árvore de genes e a análise de atribuição de indivíduos são concordantes com a taxonomia tradicional. A análise de atribuição de indivíduos subdividiu ainda as populações da Serra do Espinhaço em dois grupos geneticamente distintos. A Serra do Espinhaço é composta por cadeias de montanhas e sua amplitude chega a 1000 km de comprimento, sendo ainda caracterizada pela alta taxa de endemismo de espécies de plantas, abrigando cerca de 10% de todas as angiospermas encontradas em território brasileiro (RIBEIRO et al., 2014). Esse conjunto de montanhas é formado por afloramentos de rocha desconectados e que são comparados a ilhas oceânicas por apresentarem isolamento ecológico com as áreas circundantes e potencialmente ausência de fluxo gênico ou níveis muito baixos (PINHEIRO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014; LELES et al., 2015). Apesar dessa diferença genética detectada entre as populações de *C. brevipedunculata* da Serra do Espinhaço, o reconhecimento de linhagens evolutivas distintas não se aplica, devido às características morfológicas e genéticas destes dois grupos genéticos apresentarem grande semelhança.

C. brevipedunculata deve ser reconhecida, portanto, não apenas como uma espécie restrita a campos rupestres da Serra do Espinhaço e da Serra de Ibitipoca na Serra da Mantiqueira, conforme já demonstrado por Leal (2013), mas também com exemplares na Serra do Mar. Do ponto de vista geológico-geomorfológico, a Serra de Ibitipoca, juntamente com a Serra Negra, compreende uma região quartzítica, situada nos limites entre os compartimentos meridional e setentrional da Serra da Mantiqueira (NETO et al., 2015). Os complexos rupestres de altitude em quartzito são regiões de grande similaridade pedológica e florística na Serra da Mantiqueira e na Serra do Espinhaço, embora sejam bem distintos de

suas áreas adjacentes (BENITES et al., 2007). Um fato interessante diz respeito aos indivíduos provenientes de Nova Friburgo/RJ que emergiram como *C. brevipedunculata*. Miller et al. (2006) já haviam relatado a ocorrência de indivíduos de *C. brevipedunculata* na localidade de NFPRJ da Serra do Mar, porém nessa obra os autores se basearam apenas em observações dos caracteres morfológicos. Portanto, esses resultados corroboram essa informação e sugerem uma possível expansão populacional originária da Serra do Espinhaço, considerada uma área continental para a região costeira, mais precisamente a Serra do Mar no estado do Rio de Janeiro. Antonelli et al., 2010 consideraram esse evento para outras espécies do gênero *Cattleya* série *Parviflorae*.

Com relação aos indivíduos emergirem como, A espécie *C. wittigiana* emergiu como distinta de *C. brevipedunculata* nas análises de atribuição de indivíduos e na árvore de espécies. Ela é epífita em florestas úmidas do Espírito Santo e ocorre em sympatria com a nova espécie a ser reconhecida para este estado (FOWLIE, 1987), acima descrita. A única população encontrada em campo está localizada no município de Santa Teresa, em uma área também caracterizada por relevo formado tanto pelo Maciço do Caparaó, quanto pelos Patamares Elevados do Sul Capixaba na Serra na Mantiqueira Sentitritonal (COELHO et al., 2012).

Portanto, apesar das espécies *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana* apresentarem semelhanças morfológicas marcantes, como os pseudobulbos globosos e com crescimento em linha, folhas coriáceas e curvadas, além da sobreposição no período de floração (FOWLIE, 1987), elas são encontradas em habitats e regiões geomorfológicas marcadamente distintas e devem ser reconhecidas como espécies distintas. O fato das duas espécies compartilharem uma história evolutiva próxima sugere uma conexão biogeográfica entre a Serra do Espinhaço e a FAB do Espírito Santo que deve ser testada em estudos futuros.

2.5 Conclusões

Sequências de DNA e marcadores microssatélites demonstraram ser eficientes ferramentas para delimitação de espécies, assim como avaliação de relações inter e intraespecíficas. Apesar do monofiletismo do clado *C. coccinea* não ser totalmente corroborado devido aos resultados obtidos a partir da região de nrDNA ITS, esses resultado entretanto pode ser explicado por múltiplos eventos de hibridação histórica entre espécie das Séries do gênero *Cattleya*. Os resultados suportam o reconhecimento de sete espécies distintas

para o clado *C. coccinea*. Sendo quatro delas recircunscritas com modificações em relação a distribuição das populações: *C. coccinea*, *C. mantiqueirae*, *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana*. Adicionalmente três novas espécies foram reconhecidas: uma nova espécie para a localidade de DMES, do Espírito Santo anteriormente descrita como *C. coccinea*. A segunda espécie referente à localidade de SJPSP na Serra da Bocaina em São Paulo. E a terceira espécie referente às localidades da Serra do Mar da região Sul do Brasil. Análises adicionais com marcadores moleculares de nova geração, assim como estudos sobre a morfologia das espécies do clado *C. coccinea* poderão auxiliar para a compreensão mais profunda das relações das espécies desse grupo.

Referências

- ALBRECHT, B.; SCORNAVACCA, C.; CENCI, A.; HUSON, D.H. Fast computation of minimum hybridization networks. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, p. 191-197, 2012.
- ALDRICH, J.B.W.; CHERNEY, E.; CHRISTOPHERSON, M.L. The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. **Current Genetics**, New York, v.14, p.137-146, 1988.
- ALMEIDA, F.F.M. de; CARNEIRO, C.D.R. Origem e Evolução da Serra do Mar. **Revista Brasileira de Geociências**, São Paulo, v. 28, p.135-150, 1998.
- ANTONELLI, A.; VEROLA, C.F.; PARISOD, C.; GUSTAFSSON, A.L.S. Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae: Laeliinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 100, p. 596-606, 2010.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, JR.R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REED, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BAPTESTE, E.; VAN IERSEL, L.; JANKE, A.; KELCHNER, S.; KELK, S.; MCINERNEY, J.O.; WHITFIELD, J. Networks: expanding evolutionary thinking. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 29, p. 439-441, 2013.
- BEHLING, H. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, Amsterdam, v. 177, p. 19-27, 2002.
- BENITES, V. M.; SCHAEFER, C.E.; SIMAS, F.N.B.; SANTOS, H. G. Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 30, n.4, p. 569-577, 2007.

BICKFORD, D.; LOHMAN, J.D.; SODHI, S.N.; NG, K.L.P.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 22, p.148-155, 2007.

BOS, D.H.; POSADA, D. Using statistical models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. **Developmental and Comparative Immunology**, Amsterdam. v. 29, p.211-227, 2005.

BALDWIN, B.G.; SANDERSON, M.J.; PORTER, J.M. ; WOJCIECHOWSKI, M.F.; CAMPBELL, C.S.; DONOGHUE, M.J. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. Washington, v. 82, n. 2, p. 247-277, 1995.

CARSTENS, B.C.; PELLETIER, T.A.; REID, N.M.; SATLER, J.D. How to fail at species delimitation. **Molecular ecology**, Oxford, v. 22, n.17, p. 4369–4383, 2013.

CHIRON , G.R.; CASTRO NETO, V. P. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. **Richardiana**. Voreppe, v. 2, p. 4-28, 2002.

COELHO, A.L.N.; DE OLIVEIRA, G.A.C.; BERGAMASCHI, R.B.; JUNIOR, F.J.T.; SARTORIO, J.L.; NASCIMENTO, T.M.; DOS SANTOS VIEIRA, R. **Mapeamento geomorfológico do estado do espírito santo**, Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2012. 21p. (Nota Técnica, 28)

CONDON, M.A.; SCHEFFER, S.J.; LEWIS M.L.; SWENSON S.M. Hidden neotropical diversity: greater than the sum of its parts. **Science**, New York, v. 320, p. 928-931, 2008.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 85, p .407- 415, 2005.

DARRIBA , D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, London, v. 9, p. 772-772, 2012.

DESCOURTILZ , J.T. **Epidendres des forêts vierges du Brésil**. Paris: Bibliothèque de l’Institut de France, 1768. Tome 1, p.10.

DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, Oxford, v. 56, p. 879-886, 2007.

DE QUEIROZ, K. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. In: HOWARD, D.J.; BERLOCHER, S.H. (Eds.). *Endless forms: Species and speciation*. **Oxford University Press**, New York, p. 57-75, 1998.

DO EIRADO, L.G.; HEILBRON, M.; ALMEIDA, J.C.H. Os terrenos tectônicos da Faixa Ribeira na Serra da Bocaina e na Baía da Ilha Grande, sudeste do Brasil. **Brazilian Journal of Geology**, São Paulo, v. 3, p. 426-436, 2006.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America**, Londres, v. 19, p. 11-15, 1987.

DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. BAYESIAN phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 29, p. 1969-1973, 2012.

EDWARDS, D.L.; KNOWLES, L.L. Species detection and individual assignment in species delimitation: can integrative data increase efficacy? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 281, p. 1-7, 2014.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v.14, p. 2611-2620, 2005.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null allele. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.7, p. 574 – 578, 2007.

FIELDING, A.H.; BELL, J.F. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. **Environmental Conservation**, Cambridge, v. 24, p. 38-49, 1997.

FOWLIE, J.A. A contribution to a monographic revision of the genus *Sophranitis* Lindl. **Orchid Digest**, Santa Barbara, v. 51, p. 15- 32, 1987.

FORSTER, W.; SOUZA, V.C. Laeliinae (Orchidaceae) do Parque Nacional do Caparaó - Espírito Santo/Minas Gerais, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 40, p. 701-726, 2013.

FUJITA, M.K.; LEACHÉ, A.D.; BURBRINK, F.T.; MCGUIRE, J.A.; MORITZ, C. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 27, p. 480-488, 2012.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systems Biology**, Los Angeles, v. 52, p. 696-704, 2003.

HELED, J.; DRUMMOND, A.J. Bayesian inference of species trees from multilocus data. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 27, p. 570-580, 2010.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 8, p.754–755, 2001.

HUSON, D. H.; SCORNAVACCA, C. DENDROSCOPE 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. **Systematic biology**, Oxford, v. 61, p. 1061-1067, 2012.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.30, p. 3059-3066, 2002.

KATOH, K.; TOH, H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. **Brief Bioinformatics**, Oxford, v.9, p.286-298 , 2008.

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**, Oxford, v. 102, p. 491-507, 2008.

LEAL, B. **Detecção de zona híbrida entre *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* (Orchidaceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, utilizando microssatélites e análise morfométrica**. 2013. 83p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

LELES, B. P.; CHAVES, A. V.; RUSSO, P.; BATISTA, J. A. N.; LOVATO, M. B. Genetic Structure Is Associated with Phenotypic Divergence in Floral Traits and Reproductive Investment in a High-Altitude Orchid from the Iron Quadrangle, Southeastern Brazil. **Plos One**, San Francisco, 2015. No Prelo.

LIBRADO, P.; ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, p.1451-1452, 2009.

LINDLEY, J. *Cattleya coccinea*. **Edwards's botanical register**, London, v. 22, p.1919, 1836.

MACHADO FILHO, L.; RIBEIRO, M.W.; GONZALEZ, S.R.; SCHENINI, C.A.; SANTOS-NETO, A.; PALMEIRA, R.C.B.; PIRES, J.L.; TEIXEIRA, W.; CASTRO, H.E.F. Geologia. **Projeto RADAMBRASIL**. Folhas SF:23/24 Rio de Janeiro/ Vitória; geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. MEE/SG, Rio de Janeiro, v. 32, p. 56-66, 1983.

MADDISON, W. P. Gene trees in species trees. **Systems Biology**, Los Angeles, v. 46, p. 523-536, 1997.

MARTINS, F.D.M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 104, p. 499-509, 2011.

MENINI NETO, L.; BARROS, F.; FORZZA , R.C. Orchidaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais - Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v.21, p. 687-696, 2007.

MILLER, D.; WARREN, R.; MILLER, I.; SEEHAWER, H. **Serra dos Órgãos, sua história, suas orquídeas**. Rio de Janeiro: Gráfica Stampipa, 2006. p. 236-239.

NACIRI, Y.; LINDER, H. P. Species delimitation and relationships: The dance of the seven veils. **Taxon**, Bratislava, v. 64, p. 3-16, 2015.

NETO, R. M.; TAVARES, R. Z.; MENOR JR, W. Mapeamento Geomorfológico do município de Lima Duarte, MG. **Revista Brasileira de Geomorfologia**, São Paulo, v. 16, 2015. No Prelo.

NOVELLO, M.; RODRIGUES, J.F.; PINHEIRO, F.; OLIVEIRA, G.C.X.; VEASEY, E.A.; KOEHLER, S. Simple-sequence repeat markers of *Cattleya coccinea* (Orchidaceae), an endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 3274-3278, 2013.

OKUYAMA, Y.; FUJII, N.; WAKABAYASHI, M.; KAWAKITA, A.; ITO, M.; WATANABE, M.; KATO MURAKAMI, N. Non uniform concerted evolution and chloroplast capture: heterogeneity of observed introgression patterns in three molecular data partition phylogenies of Asian *Mitella* (Saxifragaceae). **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 22, p. 285-296, 2005.

OLAVE, M.; SOLA, E.; KNOWLES, L.L. Upstream analyses create problems with DNA-based species delimitation. **Systematic Biology**, Oxford, v. 63, p. 263-271, 2014.

OLIVEIRA, R. P.; CLARK, L. G.; SCHNADELBACH, A. S.; MONTEIRO, S. H. N.; LONGHI-WAGNER, H. M.; VAN DEN BERG, C. A molecular phylogeny of *Raddia* and its allies within the tribe Olyreae (Poaceae, Bambusoideae) based on noncoding plastid and nuclear spacers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 78, p. 105-117, 2014.

PADIAL, J.M.; DE LA RIVA, I. A response to recent proposals for integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 101, p.747-756, 2010.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Bethesda, v. 155, p. 945-959, 2000.

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; MUNT, D. D.; BARROS, F.; FÉLIX, L. P.; FAY, M. F.; PALMA-SILVA, C. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, p. 49, 2014.

RAMBAUT, A. **Tree Figure Drawing Tool**. Version 1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2009. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/>>. Acesso em: 18 Dez. 2014.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. **MCMC Trace Analysis Tool** 1.5.0. 2011. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/>>. Acesso em: 17 dez. 2014.

RAPINI, A.; RIBEIRO, P.L.; LAMBERT, S.; PIRANI, J.R. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Rio de Janeiro, v. 4, p.16-24, 2008.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? implications for conservation. **Conservation Biology**, Boston, v. 142, p. 1144-1156, 2009.

RIBEIRO, P. L.; RAPINI, A.; DAMASCENA, L. S.; VAN DEN BERG, C. Plant diversification in the Espinhaço Range: Insights from the biogeography of *Minaria* (Apocynaceae). **Taxon**, Bratislava, v. 63, p. 1253-1264, 2014.

RODRIGUES, J.F.; VAN DEN BERG, C.; ABREU, A. G.; NOVELLO, M.; VEASEY E, A.; OLIVEIRA, G.C.X.; KOEHLER, S. Species delimitation of *Cattleya coccinea* and *C.*

mantiqueirae (Orchidaceae): insights from phylogenetic and population genetics analyses. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 301, p. 1345-1359, 2015.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

SANTOS, T.M. **Eventos antigos de especiação híbrida no grupo bifoliado do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) inferidos a partir de uma filogenia baseada em 16 regiões de DNA nuclear e plastidial.** 2011. 66p. (Mestrado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **Annals of Statistics**, Philadelphia, v. 6, p.461-464, 1974.

SHAHAN, D.; HEDIN, M. Integrative taxonomy and species delimitation in harvestmen: a revision of the western North American genus *Sclerobunus* (Opiliones: Laniatores: Travunioidea). **Plos one**, San Francisco. 2014. No Prelo.

SHAW, J.; LICKEY, E.B.; SCHILLING, E.E.; SMALL, R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 94, p. 275-288, 2007.

SIMPSON, G.G. **Principles of Animal Taxonomy**. New York: Columbia University Press, 1961. 87p.

SOLTIS, D. E.; KUZOFF, R.K. Discordance between molecular and chloroplast phylogenies in the *Heuchera* group (Saxifragaceae). **Evolution**, Oxford, v. 49, p. 727-742, 1995.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P.S.; COLLIER, T. G.; EDGERTON, M.L. Variation within and among genera of the *Heuchera* group: evidence of chloroplast capture and paraphyly. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 78, p. 1091-1112, 1991.

STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **American Journal of Human Genetics**, Houston, v. 73, p. 1162-9, 2003.

SUN, Y.; SKINNER, D. Z.; LIANG, G. H.; HULBERT, S. H. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 26-32, 1994.

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.M.; BEDE, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica Brasileira. **Megadiversidade**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 132-138, 2005.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 17, p. 1105-1109, 1991.

- THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, C. F. B.; BALDISSERA JR, F. A.; ALEXANDRINO, J. M. B. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 55, p. 1018-1031, 2010.
- 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**, Oxford, v. 104, p. 417-430, 2009.
- _____. Importance of hybridization for the evolution of *Cattleya*. **Renziana**, Basel, v. 4, p. 74-79, 2014.
- _____. New combinations in the genus *Cattleya* (Orchidaceae). II. Corrections and combinations for hybrid taxa. **Neodiversity**, Feira de Santana, v. 5, p. 13-17, 2010.
- _____. Reaching a compromise between conflicting nuclear and plastid phylogenetic trees: a new classification for the genus *Cattleya* (Epidendreae; Epidendroideae; Orchidaceae). **Phytotaxa**, Auckland, v. 186, p. 75-86, 2014.
- VEROLA, C.F.; SEMIR, J.; ANTONELLI, A.; KOCH, I. Biosystematic studies in the brazilian endemic genus *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae: Laeliinae): a multiple approach applied to conservation. **Lankesteriana**, Cartago, v. 7, p. 419-422, 2007.
- WILEY, E.O. The Evolutionary Species Concept Reconsidered. **Systematic Zoology**, Oxford, v. 27, p. 17-26, 1978.
- WITHNER, C.L. **The *Cattleyas* and their relatives: *Schomburgkia*, *Sophranitis*, and other south American genera**. Portland: Timber Press, 1993. 154 p.
- YAMAGISHI-COSTA, J.; FORNI-MARTINS, E.R. Hybridization and polyploidy: cytogenetic indications for *Hoffmannseggella* (Orchidaceae) species evolution. **International Journal of Botany**, Islamabad, v. 5, p. 93-99, 2009.
- YOO, K.; LOWRY II, P.P.; WEN, J. Discordance of chloroplast and nuclear ribosomal DNA in *Osmorhiza* (Apiaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 89, p. 966-971, 2002.
- ZACHOS, J.C.; DICKENS, G.R.; ZEEBE, R.E. An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics, **Nature**, London, v. 451, p. 279-283, 2008.

3 FILOGEOGRAFIA DE ORQUÍDEAS AMEAÇADAS DO COMPLEXO '*Cattleya coccinea*' DA FLORESTA ATLÂNTICA BRASILEIRA E SERRA DO ESPINHAÇO

Resumo

O clado *Cattleya coccinea*, composto por sete espécies, emerge como um importante modelo de estudo de padrões de diversificação em áreas de altitude ao longo das cadeias de montanhas como a Serra do Mar, Serra da Mantiqueira e Serra do Espinhaço do sul-sudeste do Brasil. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade e estrutura genética de populações de espécies do complexo '*Cattleya coccinea*', além de inferir os níveis de dispersão de fluxo gênico pólen x semente, estimar o tempo de divergência entre as espécies e analisar a ocorrência de expansão populacional do tamanho efetivo das populações. As análises foram realizadas por meio de 11 locos de microssatélites, considerando 12 diferentes populações das espécies do clado. Adicionalmente, 165 indivíduos de 23 localidades diferentes das espécies foram analisados. As análises de diversidade genética para microssatélites indicaram moderados a altos índices de diversidade considerando-se as sete espécies do clado ($A = 5,9$ a $13,45$; $H_e = 0,65$ a $0,72$; $H_o = 0,57$ a $0,74$; $f = 0,07$ a $0,12$). O índice de fixação (f) mostrou excesso de heterozigotos para três espécies. A taxa de cruzamento aparente teve média de $0,91$, variando de $0,65$ a $1,0$, indicando o sistema reprodutivo misto com predominância de alogamia. A estruturação genética mostrou-se moderada ($\theta = 0,17$) entre as 12 populações. Os valores da AMOVA variaram de baixo a moderados para as espécies: *C. coccinea* ($F_{ST} = 0,086$), *C. mantiqueirae* ($F_{ST} = 0,048$) e *C. brevipedunculata* ($F_{ST} = 0,090$). A análise bayesiana empregada para a atribuição de indivíduos indicou a formação de oito grupos geneticamente distintos. A análise de agrupamento utilizando distâncias genéticas de Nei e método UPGMA indicou seis grupos distintos, embora não totalmente coincidentes com a análise de atribuição de indivíduos. Para as sequências de DNA os índices de diversidade indicaram que o ITS é a região com maior diversidade. Os valores variaram de 0 a 85% para as sequências de cpDNA e de 47% a 82% para ITS. Os valores da AMOVA para as análises de cpDNA e ITS variaram de moderados a muito altos para as espécies: *C. coccinea* ($F_{ST} = 0,484$ e $0,327$), *C. mantiqueirae* ($F_{ST} = 0,141$ e $0,112$), *C. brevipedunculata* ($F_{ST} = 0,59$ e $-0,008$) e espécies das populações do Sul (CSRS/JOSC/PMPR) ($F_{ST} = 0,654$ e $0,073$). A rede de haplótipos mostrou para todas as regiões de cpDNA e ITS a formação de seis clados com seus haplótipos ancestrais e os respectivos haplótipos derivados. A dispersão de fluxo gênico via pólen é oito vezes mais eficiente para a espécie *C. coccinea*. A análise de estimativa de tempo de divergência mostrou que as espécies *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana* se originaram entre o Plioceno e o Pleistoceno e as outras espécies do clado no Pleistoceno. As análises de expansão do tamanho efetivo populacional mostrou que todas as espécies tiveram expansão populacional em eras glaciais do Pleistoceno. Todas essas análises são ferramentas para projetos de conservação das espécies ameaçadas do clado *C. coccinea*.

Palavras-chave: Filogeografia; *Cattleya*; Pleistoceno; microssatélites; cpDNA; ITS; Diversidade e Estrutura genética; Rede de haplótipos; Tempo de divergência; Expansão de tamanho efetivo

Abstract

The *Cattleya coccinea* clade, composed of seven species, emerges as an important study model of diversification patterns at altitude areas along the mountain ranges such as the Serra do Mar, Serra da Mantiqueira and Serra do Espinhaço in the south-southeast of Brazil. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity and structure of populations of species from the '*Cattleya coccinea*' complex, in addition to infer levels of pollen gene flow x seed dispersal, estimate the time of divergence between species and analyze the occurrence of population expansion events of the effective population size. Analyses were performed with 11 microsatellite loci, considering 12 different populations of the species clade. In addition, 165 individuals from 23 different species localities were analyzed. Genetic diversity analysis for microsatellites indicated moderate to high levels of diversity considering the seven species of the clade (A - 5.9 to 13.45, H_E - 0.65 to 0.72; H_O - 0.57 to 0.74, and f - 0.07 to 0.12). The fixation index (f) showed excess of heterozygotes for three species. The apparent outcrossing rate averaged 0.91, ranging from 0.65 to 1.0, indicating a mixed mating system with predominance of allogamy. The genetic structure was moderate ($\theta = 0.17$) among the 12 populations. The AMOVA values ranged from low to moderate for the species: *C. coccinea* (F_{ST} : 0.086), *C. mantiqueirae* (F_{ST} : 0.048) and *C. brevipedunculata* (F_{ST} : 0.090). Bayesian analysis employed for individuals assignment indicated the formation of eight genetically distinct groups. Cluster analysis using genetic distances of Nei and UPGMA method provided similar results with six distinct groups, although not fully consistent with the analysis of individuals assignment. For the DNA sequences, diversity indices indicated that the ITS region is the most diverse. The values were 0 to 85% for the cpDNA sequences and 47% to 82% for ITS. The AMOVA values for the cpDNA and ITS analysis ranged from moderate to high for the species: *C. coccinea* (F_{ST} : 0.484 and 0.327), *C. mantiqueirae* (F_{ST} : 0.141 and 0.112), *C. brevipedunculata* (F_{ST} : 0.59 and -0.008) and species of the South populations (CSRS/JOCS/PMPR) (F_{ST} : 0.654 and 0.073). The haplotype network showed for all cpDNA and ITS regions the formation of six clades with their ancestral haplotypes and their respective derived haplotypes. The dispersion of gene flow through pollen is eight times more efficient than through seeds for the species *C. coccinea*. The divergence time estimation analysis showed that *C. brevipedunculata* and *C. wittigiana* originated from the Pliocene to the Pleistocene and the other species of the clade in the Pleistocene. Analyses of expansion of effective population size showed that all species had population growth in the Pleistocene ice ages. All these analyses are tools for conservation projects for the endangered species of the *C. coccinea* clade.

Keywords: Phylogeography; *Cattleya*; Pleistocene; Microsatellite; cpDNA; ITS; Diversity and genetic structure; Haplotype network; Divergence time; Effective size expansion

3.1 Introdução

A Floresta Atlântica Brasileira (FAB) originalmente abrangia uma área correspondente a 150 milhões de hectares ao longo da costa brasileira, se estendendo desde o Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte e ao leste do Paraguai até o nordeste da Argentina

(OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000). Entretanto, por estar localizada em regiões com grandes aglomerados antrópicos, somente uma pequena parcela correspondente a aproximadamente de 11,7% da vegetação original persiste nos dias atuais sob a forma de pequenos fragmentos florestais (TABARELLI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009; PORTO; CARNAVAL; ROCHA, 2013). Apesar disso, é considerada a segunda maior floresta tropical da América do Sul e se destaca por ser um dos biomas que abriga grande diversidade de espécies no mundo, com aproximadamente 20.000 espécies de plantas sendo muitas dessas endêmicas e ameaçadas (MYERS et al., 2000; CARNAVAL et al., 2009). Grande parte dessa biodiversidade pode ser explicada pelo fato da FAB abrigar dois dos mais notáveis complexos de montanhas da região Sul e Sudeste do Brasil: a Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (MORITZ et al., 2000).

A Serra do Mar se destaca por ser uma proeminente cadeia de montanhas com cerca de 1000 km situada paralela à costa brasileira nas regiões Sul e Sudeste com altitudes que chegam a 2300 m (ALMEIDA; CARNEIRO, 1998). Já a Serra da Mantiqueira está restrita a três estados da região Sudeste: Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais e possui picos mais elevados que a Serra do Mar alcançando até 2800 m aproximadamente (ALMEIDA e CARNEIRO, 1998). Adicionalmente, em uma área de transição entre os biomas FAB e o Cerrado, se localiza um ecossistema com altas taxas de endemismo denominado de Serra do Espinhaço (LELES et al., 2015), com clima mais seco quando comparado com as florestas úmidas da Serra do Mar e da Mantiqueira. A cobertura vegetal da Serra do Espinhaço predominante é chamada de campos rupestres. Essa vegetação está associada com afloramentos de rochas compostas de quartzito e minérios de ferro com altitudes acima de 900 m e que formam mosaicos de comunidades biodiversas (CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005).

A filogeografia é uma ferramenta poderosa na obtenção de informações valiosas sobre processos evolutivos históricos que influenciaram na distribuição da variação genética entre as populações de espécies atuais (AVISE, 2000). Estudos filogeográficos podem proporcionar a melhor compreensão sobre a dispersão, diversificação e extinção de espécies (DINIZ-FILHO et al., 2008). Esses estudos se baseiam principalmente em análises estatísticas em nível populacional que são necessários para elucidar os processos microevolutivos (AVISE, 2009). Além disso, a filogeografia pode fornecer evidências de padrões regionais sobre a paisagem da biodiversidade que são necessários para a compreensão da macroecologia, assim como são importantes também em áreas de alta prioridade de conservação (MORITZ, 2002; TURCHETTO-ZOLET et al., 2013).

Estudos paleoclimáticos e paleopalinológicos demonstraram que no Plioceno, que teve início há aproximadamente 5,6 milhões de anos, o clima era mais seco e com temperaturas médias mais altas que as atuais (SIMPSON, 1979). Nesse contexto, a FAB sofreu alterações profundas com a transição do clima tropical úmido para o semi-árido ou árido devido a escassez de chuvas. Dentre essas alterações destaca-se a retração e fragmentação das florestas e a expansão de áreas de savana ou campos abertos (SIMPSON, 1979; VASCONCELOS et al., 1992). Apesar desse panorama desfavorável, essas mudanças tornaram o Plioceno o cenário da diversificação de várias espécies segundo estudo filogeográficos (COSTA, 2003; PELLEGRINO et al., 2005; GRAZZIOTIN et al., 2006). Essas condições climáticas persistiram até aproximadamente 3,6 milhões de anos, quando um aumento gradual da umidade começou a mudar a paisagem novamente (VASCONCELOS et al., 1992). Entretanto há 2,5 milhões de anos teve início o Pleistoceno, que é marcado por intensas oscilações climáticas, incluindo ciclos de glaciações intercaladas por períodos interglaciais. Durante as glaciações as florestas se retraíam e voltavam a se expandir nos períodos interglaciais (BEHLING 1995, 2002; BEHLING; NEGRELLE, 2001).

Atualmente a teoria dos refúgios (HAFFER, 1969; VANZOLINI; WILLIAMS, 1970; BROWN; AB'SÁBER, 1979) tem sido intensamente debatida como uma hipótese para explicar grande parte da diversificação de espécies observada no Pleistoceno. Isto porque muitos estudos detectaram descontinuidades filogeográficas em espécies animais e vegetais da FAB, sugerindo que ao se retraírem as florestas serviam como áreas de refúgio para populações de espécies. Assim, populações da uma mesma espécie que se refugiaram em diferentes áreas teriam se diversificado em linhagens independentes devido ao isolamento entre elas (BATALHA-FILHO; MIYAKI, 2011). Entre os principais estudos que identificaram descontinuidades filogeográficas na FAB destaca-se os trabalhos de Grazziotin et al. (2006), Cabanne et al. (2007, 2008), Carnaval et al. (2009), Palma-Silva et al. (2009), Martins et al. (2009), Batalha-Filho et al. (2010), Thomé et al. (2010), e Rodrigues et al. (2015) que observaram que as linhagens localizadas mais ao sul do estado de São Paulo divergiam daquelas localizadas mais ao norte do estado. Outra descontinuidade marcante foi observada no Vale do Rio Doce no Espírito Santo observada por Cabanne et al. (2007, 2008), Carnaval et al. (2009) e Thomé et al. (2010). A terceira grande descontinuidade foi detectada no nordeste do Brasil por Cabanne et al. (2008) e Carnaval et al. (2009).

Na Serra do Espinhaço as oscilações climáticas ocorridas no Pleistoceno também têm sido apontadas como fatores cruciais responsáveis pela grande diversidade de espécies de plantas nos campos rupestres (HARLEY, 1988, 1995; GIULIETTI et al., 1997; RAPINI et al.,

2008). Os refúgios de espécies de campos rupestres teriam sido formados durante os períodos interglaciais onde as florestas se expandiram e os campos se retraíram, favorecendo assim a divergência entre essas populações e, consequentemente, a origem de novas espécies (RIBEIRO et al., 2014). Todavia, nos períodos glaciais ocorreria a expansão dos campos rupestres dos topos de montanhas para as áreas de menor altitude com a retração das florestas. Esse mesmo processo de diversificação também foi observado em estudos na FAB com organismos que habitam áreas de altitude como espécies de *Podocarpus* (LEDRU et al., 2007) e de anfíbios (AMARO et al., 2011). Para o gênero *Cattleya*, também há evidências de diversificação de espécies de campos rupestres. Antonelli et al. (2010) sugeriram que as baixas temperaturas do Mioceno foram importantes para especiação na Série *Parviflorae*. Esse grupo, no entanto, não se diversificou na FAB ao longo das Serras do Mar e da Mantiqueira, ao contrário do clado *C. coccinea* (Figura 2.4 do capítulo 2).

O clado *C. coccinea* é composto por sete espécies divididas em duas linhagens principais. Uma delas é formada por *C. brevipedunculata*, concentrada nos campos rupestres, como a maioria das espécies de *Cattleya* da série *Parviflorae*, e por *C. wittigiana*, restrita à FAB do sul do Espírito Santo. A outra linhagem inclui cinco espécies distintas que habitam áreas de altitude nas Serra do Mar, Serra da Mantiqueira e Serra do Espinhaço. Duas dessas espécies são representadas por populações únicas, uma ao sul do Espírito Santo (DMES), em simpatria com *C. wittigiana*, e outra restrita ao Pico da Bacia na Serra da Bocaina (SJPS). As três espécies restantes representam regiões bem distintas ao longo das montanhas do sudeste do Brasil. *C. coccinea* está restrita ao nordeste das Serras do Mar e Mantiqueira, *C. mantiqueirae* é encontrada na porção sul da Serra da Mantiqueira e do Mar (região da Serra da Bocaina) e a espécie relativa às populações CSRS/JOIN/PMPR está restrita à região sul do Brasil (Figura 3.1).

3.1.2 Objetivos

O clado *Cattleya coccinea* emerge como um importante modelo de estudo de padrões de diversificação em áreas de altitude ao longo das cadeias de montanhas do sul-sudeste do Brasil. Portanto, este estudo tem como objetivo descrever padrões filogeográficos e de estrutura e diversidade genética dentro e entre populações e espécies do clado *C. coccinea*. Para isso, marcadores microsatélites foram desenvolvidos especificamente para o clado *C. coccinea*, além da obtenção de sequências de DNA de cloroplasto e uma região de DNA

nuclear ribossomal com intuito de respondermos às seguintes perguntas:

- 1 Qual é o grau de diversidade genética em cada espécie do clado *C. coccinea*?
- 2 Como a diversidade genética está estruturada no espaço, considerando marcadores nucleares e plastidiais?
- 3 Qual é a contribuição relativa do fluxo de pólen x semente para o fluxo gênico histórico e quais são suas implicações para a conectividade genética de populações?
- 4 Os padrões de estrutura e diversidade genética dentro e entre populações das espécies do clado *C. coccinea* de campos rupestres x florestas de altitude são concordantes com oscilações climáticas históricas? (há evidências de flutuações de tamanhos populacionais e qual é a idade estimada desses eventos?)
- 5 Como ocorreu a diversificação de espécies do clado *C. coccinea* ao longo das cadeias de montanhas do sul-sudeste brasileiro?
- 6 Quais são as implicações para a conservação?

3.2 Materiais e Métodos

Os procedimentos descritos a seguir já foram em grande parte detalhados no capítulo anterior, a decisão de repeti-los deve-se ao fato de tornar a leitura mais dinâmica e por acrescentar informações, tabelas e figuras inéditas.

3.2.1 Localidades de amostragem e extração de DNA

Para o estudo de marcadores microssatélites foram amostradas 12 localidades contendo populações naturais das espécies do complexo *C. coccinea* abrangendo toda a área de

ocorrência dessas espécies. Um total de 302 indivíduos foram amostrados, onde o número de indivíduos coletados variou de 14 a 36 em cada localidade (Tabela 3.1; Figura 3.1). Para as coletas, foram amostradas partes das folhas mais jovens ou flores, as quais foram acondicionadas imediatamente em microtubos contendo géis CTAB (C. VAN DEN BERG; comunicação pessoal), os quais foram mantidos por um período mínimo de sete dias em condições de geladeira (4 °C) antes da extração de DNA. A extração do DNA foi baseada no protocolo modificado de Doyle e Doyle (1987). A quantificação do DNA e de produtos amplificados foi realizada utilizando géis de agarose a 1% e corados com brometo de etídio (RODRIGUES et al., 2015).

3.2.2 Amplificação de DNA e escolha de iniciadores microssatélites

Para a obtenção de um número satisfatório de iniciadores microssatélite inicialmente foram testados 18 iniciadores desenvolvidos por Novello et al. (2013). Desses marcadores, nove mostraram bons resultados de amplificação e polimorfismo e foram utilizados nesse estudo. Adicionalmente mais dois iniciadores desenvolvidos por Leal (2013) foram utilizados no presente estudo, resultante em 11 iniciadores ao total (Tabela 3.2). Os iniciadores microssatélites foram então amplificados utilizando-se do protocolo de Schuelke (2000). Nesse protocolo são necessários três tipos de iniciadores distintos: a cauda M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC), que além de ser adicionada ao iniciador “forward” na sua extremidade 5' faz parte também da cauda universal M13 marcada com fluorocromo específico para leitura em seqüenciador automático (FAM ou HEX) (Applied Biosystems). O terceiro iniciador é o “reverse” sem a cauda M13. . Portanto, para as reações de amplificação do DNA com os iniciadores SSR um volume final de 30 µL foi utilizado contendo: um coquetel composto por tampão 10X (Thermo Scientific, Burlington) constituído de Tris-HCl

Tabela 3.1 - Populações do complexo *Catleya coccinea* coletadas para marcadores microsatélites em suas respectivas localidades e estados, com código e sigla de identificação, número de indivíduos coletados, altitude, número de registro em herbários e coordenadas geográficas

Código	Sigla	Número de Indivíduos	Localidade	Altitude (metros)	Número de Registro	Latitude	Longitude
1	CSRS	34	Cambará do Sul, RS	1030	ESA119234	S 29° 04. 05	W49° 57. 38
2	SJPSP	14	S. J. do Barreiro/Pico da Bacia, SP	1800	ESA118314	S 22° 42. 48	W 44° 50. 10
3	SJTSP	17	S. J. do Barreiro/Tira Chapéu, SP	2060	ESA118314	S 22° 46. 30	W 44° 39. 63
4	CJSP	15	Campos do Jordão, SP	1874	ESA120067	S 22° 42. 27	W 45° 28. 40
5	PERJ	33	Petrópolis, RJ	1100	ESA120066	S 22° 25. 58	W 43° 22. 42
6	ACMG	18	Alto Caparaó, MG	1862	ESA119237	S 20° 24. 23	W 41° 50.19
7	DMES	34	Domingos Martins, ES	1909	ESA127079	S 20° 23. 97	W 41° 01. 49
8	MPMG	26	Morro do Pilar, MG	1300	BHCB 151163	S 19° 25. 59	W 43° 27. 10
9	ITMG	20	Itambé, MG	700	BHCB 151162	S 19° 14. 47	W 43° 30. 36
10	OBMG	26	Ouro Branco, MG	1511	ESA119238	S 20° 29. 11	W 43° 34. 43
11	LDMG	29	Lima Duarte, MG	1375	ESA120068	S 21° 42. 50	W 43° 50. 50
12	STES	36	Santa Tereza, ES	700	ESA127078	S 19° 58. 11	W 40° 32. 11

Figura 3.1 - Mapa de relevo mostrando os 12 locais de amostragem de indivíduos das espécies do clado *Cattleya coccinea* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil para marcadores microssatélites. Os números correspondem as localidades de acordo com a Tabela 3.1

(pH 8.8) (100mM), KCl (500mM), Nonidet P40 (0.8% (v/v)), $MgCl_2$ (2mM), dNTPs (Ludwig Biotec) (1,2 mM), iniciador (10 pmol, sendo 0,2 uL para o iniciador *forward* e 1uL para o iniciador *reverse*); calda universal M13 (1 pmol), *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific) (1 U), e 2 uL de DNA molde (10-20 ng/uL). Depois do processo de amplificação as amostras foram posteriormente analisadas em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio.

Para a amplificação foram utilizadas diferentes temperaturas para cada iniciador e também a estratégia “*touchdown*” (Tabela 3.3 e 3.4). Na etapa seguinte todas as amostras foram purificadas utilizando-se o Qiagen® QIA PCR Purification Kit (Invitrogen, Life Technologies) com o objetivo de aumentar a qualidade dos picos de eletroferogramas gerados posteriormente. Em seguida, verificou-se novamente a concentração e qualidade do produto purificado em gel de agarose (1%). Passadas as etapas do processo de amplificação e purificação, as amostras foram enviadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano (Universidade de São Paulo, São Paulo). Nesse local as amostras foram então genotipadas em sequenciador automático modelo ABI3730. A leitura no sequenciador automático gerou arquivos contendo os picos de eletroferogramas, sendo os mesmos visualizados e analisados com auxílio do programa computacional GeneMarker® v. 1.95 (Softgenetics).

Tabela 3.2 - Iniciadores de microssatélites utilizados no estudo, contendo nome, sequência *forward* e *reverse*, tamanho esperado em pares de base (pb), temperatura de anelamento utilizada e concentração de MgCl₂

Nome do Iniciador	Sequência	Tamanho esperado (pb)	Ta (°C)	MgCl ₂ (mM)
Cac01	F: TACAACGCCCAATTTGAATG R: CCATCATTTGCCTTTTCACA	108	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac02	F: CAGGATTTCTCCTCGTGCTC R: GCAGAGCGGAACAAGGATAG	173	52	2
Cac05	F: GTGCGTATTGTGAGTGGATGT R: TCACGCATGCATAAGTTCAA	278	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac09	F: GGGAGGGAGGAATAGGAAGA R: TGAGCTGCGATATCAAAGGA	179	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac10	F: GCATGAGTGCTTGTGTGAAG R: TAAGCATGCACTCACGATACA	184	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac11	F: TCAAGGCCTGCACATAGAGA R: AAGAGGAAGGCTTCGTTGC	167	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac13	F: ACAACCGTCGGCACCTTTA R: GCGGGATTAGTCAAGGTTCAAT	115	54	1,5
Cac16	F: AACAGGCATTTGGAGCTTTT R: CCTCATTTCTCTCACCCTCTTT	250	estratégia 'touchdown' (58-48°C)	2
Cac18	F: CTGGTGAGGGAGAAGAAAAACA R: CCCTCTCCCTCTCTTTTCCA	224	60	2
Cac26	F: TGGCTTGGTGTTGCATTTAT R: TGTGAGCCTCAATAAGCCAAT	167	60	2
Cac27	F: TGGATCTTACCTTGGGCTTCTA R: CCCTGCTCTCTTTCTCACTCAT	209	64	2

Tabela 3.3 - Protocolo da reação de amplificação de DNA para os iniciadores microssatélites Cac02, Cac13, Cac18, Cac26 e Cac27. As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas 40 vezes

1	95°C	3 mim	Desnaturação inicial
2	94°C	30 s	Desnaturação
3	52 a 64°C	30 s	Anelamento
4	65°C	30 s	Extensão
5	65°C	10 mim	Extensão final

Tabela 3.4 - Protocolo da reação de amplificação de DNA para os iniciadores microssatélites Cac01, Cac05, Cac09, Cac10, Cac11 e Cac16 onde se utilizou a estratégia *touchdown*. As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas 10 vezes havendo decréscimo de 1°C por ciclo, ate atingir 48°C. As etapas 5, 6 e 7 foram repetidas 40 vezes

1	95°C	3 mim	Desnaturação inicial
2	94°C	30 s	Desnaturação
3	58°C	30 s	Anelamento
4	72°C	30 s	Extensão
5	94°C	30 s	Desnaturação
6	48°C	30 s	Anelamento
7	72°C	30 s	Extensão
8	72°C	10 min	Extensão final

3.2.3 Sequenciamento de regiões de cpDNA e rnDNA

Foram realizadas amplificações para sequenciamento de DNA para quatro distintas regiões de cpDNA e uma região de DNA nuclear ribossomal (*ITS* 1-2) (Tabela 3.5) para 23 diferentes localidades. As descrições detalhadas sobre as amostras utilizadas para as sequências e locais de coletas estão descritos no capítulo 2 (Tabela 2.2; Figura 2.2) com uma amostragem mais ampla que dos SSR, abrangendo toda a distribuição geográfica do complexo. Para a compreensão das relações filogenéticas dentro do complexo *C. coccinea* foram utilizados de 1 a 10 indivíduos de cada uma das 23 localidades amostradas. Nessas análises foram utilizadas as seguintes sequências de cpDNA: *rpS16/trnk*; *rpL32/trnL*; *psbJ/petA* e *atpL/atpH* e a região de rnDNA *ITS* 1-2. Para as reações de amplificação de cpDNA e nrDNA foram utilizados um coquetel contendo 10X buffer (Thermo Scientific)

constituído de 100mM Tris-HCl (pH 8.8), 500mM KCL 0.8% (v/v) Nonidet P40; 4mM de MgCl₂; 3mM de dNTPs (Ludwig Biotec); 10 pmol dos iniciadores *Forward* e *Reverse* (1uL de cada); 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific) e aproximadamente 2 uL de DNA molde (5-30ng/uL).

Tabela 3.5 - Nome e sequência dos iniciadores de cpDNA selecionados a partir de Shaw et al. (2007) utilizados neste estudo e a região de nrDNA ITS para o complexo de espécie em estudo

Nome do Iniciador	Sequência
<i>atpI</i>	TAT TTA CAA GYG GTA TTC AAG CT
<i>atpH</i>	CCA AYC CAG CAG CAA TAA C
<i>psbJ</i>	ATA GGT ACT GTA RCY GGT ATT
<i>petA</i>	AAC ART TYG ARA AGG TTC AAT T
<i>rpL32-F</i>	CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C
<i>trnL(UAG)</i>	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT
<i>rpS16x2F2</i>	AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC
<i>trnK(UUU)x1</i>	TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC
<i>ITS 1</i>	ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G
<i>ITS 2</i>	TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C

As regiões de nrDNA costumam ter um conteúdo elevado das bases nitrogenadas Citosina e Guanina, portanto para as reações de amplificação das regiões ITS1-2 foi adicionada ao coquetel de PCR 12uL de uma solução saturada de Betaína 5M. O volume final das reações de amplificação de cpDNA e nrDNA foi 50 uL. Os produtos de amplificação foram enviados para o sequenciamento na empresa MACROGEN (Macrogen Corporation, Coréia do Sul). No protocolo de amplificação para as regiões de cpDNA *rpS16x2F2/trnK*, *psbJ/petA*, *atpL/atpH* e para as regiões *ITS1-2*, foi utilizada a estratégia “*hot start*” exceto para a região de *rpL32-F/trnL* (Tabela 2.4, 2.5 e 2.6 capítulo 2). As amplificações foram realizadas no termociclador Bio-rad (T100™ Thermal Cycler).

3.2.4 Análises dos dados de microsatélites

Análises de diversidade genética

Para a análise estatística descritiva, utilizando os softwares GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001) e GenAlEx v.6.41 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), foram estimados os seguintes parâmetros genéticos: número médio de alelos por loco (*A*), número de alelos privados (*Ap*), proporção de locos polimórficos (*P*), heterozigosidade esperada (*H_E*), heterozigosidade observada (*H_O*) sob Equilíbrio de Hardy- Weinberg (EHW), índice de fixação de Wright (*f*)

(NEI, 1978), e com esses parâmetros foi possível calcular a taxa de cruzamento aparente (ta) a partir da seguinte fórmula: form (1)

$$ta = (1 - f)/(1 + f) \quad (1)$$

Análises de estruturação genética

A estrutura genética de populações foi analisada a partir da atribuição de indivíduos a grupos geneticamente distintos com utilização do programa STRUCTURE 2.3X (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2007). Essa análise foi descrita e apresentada no capítulo 2, portanto para o presente estudo trata-se da mesma abordagem com os mesmos resultados do capítulo anterior.

O programa FSTAT 1.2 (GOUDET, 1995) foi utilizado para a análise das estatísticas F calculadas para quantificar níveis de variabilidade genética entre e dentro de populações e para inferir o grau de subdivisão das populações de acordo com Weir e Cockerham (1984). Foram, portanto, estimados os parâmetros de índice médio de fixação dentro das populações ($\hat{f}$), índice de fixação total das populações ($\hat{F}$) e divergência genética entre populações ($\hat{\theta}$). Esta análise foi realizada inicialmente considerando as 12 localidades amostradas no estudo e, em seguida, a análise foi realizada para os grupos definidos pela análise bayesiana para atribuição de indivíduos e para os respectivos sub-grupos dentro dos grupos. Análises de variância molecular (AMOVA) visando detectar o nível de variabilidade tanto entre como dentro de populações e/ou grupos, foram também realizadas para as 12 localidades amostradas no estudo, e para os grupos definidos pela análise bayesiana de atribuição de indivíduos e para os respectivos sub-grupos dentro dos grupos. Para complementar e comparar com o resultado obtido pela análise bayesiana, foi também realizada uma análise de agrupamento, obtendo-se um dendrograma pelo software DARwin v.5.0 (PERRIER et al., 2003), utilizando distâncias genéticas de Nei (1972), obtidas pelo software TFPGA (MILLER, 1997), e o método aglomerativo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Para avaliação do suporte dos ramos foi utilizada reamostragem de 1000 réplicas de bootstrap.

3.2.5 Análises da sequências de DNA

Análises de diversidade genética

As sequências de DNA foram editadas com o auxílio do programa Chromas Lite© (2005 Technelysium Pty Ltda) sendo em seguida as sequências complementares pareadas utilizando-se o programa SeqMan 7.0 (DNASTAR Inc). O alinhamento das sequências foi realizado a partir do programa MAFFT (KATO et al., 2002; KATO; TOH, 2008) implementado no programa Mesquite, v. 2.75 (MADDISON; MADDISON, 2011). Para as análises de diversidade genética foi utilizado o programa DNAsp v. 5.10.1 (Librado e Rozas 2009). Nesse programa foi analisado o polimorfismo das sequências em relação aos seguintes parâmetros: número de posições polimórficas (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π).

Análises de estruturação genética

O programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER 2010) foi utilizado para estimar a estrutura hierárquica da variação nas sequências de DNA através da Análise de Variância Molecular (AMOVA, EXCOFFIER et al.; 1992) com valores de significância gerados a partir de 10.000 permutações. Portanto, os valores da AMOVA foram calculados para os resultados obtidos a partir da análise de atribuição de indivíduos (K=2 e K=8), como também se considerou as sete espécies reconhecidas para o complexo *C. coccinea*. Adicionalmente análises das espécies que apresentaram mais de um local de coleta foram analisadas para se testar a estruturação de populações dentro de espécies. A fim de analisar a distribuição espacial das genealogias gênicas foram utilizados os programas DNAsp e o programa Network 4.5.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) para a obtenção das redes de haplótipos. No programa Network foi utilizado o método de Median-joining (BANDELT et al., 1999) que se baseia no critério de Máxima Parcimônia.

Dispersão de fluxo gênico via pólen x semente

Com o intuito avaliar os níveis de dispersão do fluxo gênico via pólen e semente foi realizada uma análise utilizando-se os índices de análise de variância molecular (AMOVA) obtidos pelo programa Arlequin. Foram considerados os valores para os dados de microssatélites que tem origem nuclear e os dados das regiões de cpDNA de origem citoplasmática. Os cálculos foram realizados considerando-se os valores para as sete espécies e também para as populações dentro das espécies onde foi possível amostrar mais de uma população. A seguinte fórmula de acordo com Ennos (1994) foi utilizada nessa análise: form. (2).

$$(2) \quad [(1/F_{ST(B)} - 1) (1+F_{IS}) - 2 (1/F_{ST(M)} - 1)] / (1/F_{ST(M)} - 1)$$

Sendo $F_{ST(B)}$ o valor da análise de variância molecular para o marcador de herança biparental e $F_{ST(M)}$ o valor para o marcador de herança maternal.

Análises de estimativa de tempo de divergência e expansão populacional

Na análise de estimativa de tempo de divergência para o ancestral comum (tMRCA) uma abordagem coalescente foi utilizada implementada no programa BEAST. A partir dos trabalhos de Gustafsson; Verola e Antonelli (2010) e Antonelli et al. (2010) foram estimados tempos de divergência para 40 espécies do gênero *Cattleya* série *Parviflorae*, sendo portanto considerados esses resultados (2.76 milhões de anos para o clado correspondente a espécie *C. endsfeldzii*, utilizada para enraizamento da árvore). Foram também realizadas análises com diferente estimativa de tempo de divergência, adotando a idade de 4 milhões de anos para a raiz da árvore (C. van den Berg, comunicação pessoal). Como essa análise foi realizada simultaneamente com a análise de árvore de espécie utilizando o programa *BEAST foram realizadas corridas para quatro diferentes hipóteses de número de espécies considerando-se os resultados obtidos a partir da análise de atribuição de indivíduos e também os resultados das árvores filogenéticas. Portanto duas corridas de 100 milhões de gerações foram realizadas para cada hipótese totalizando 200 milhões de gerações com *burnin* de 10%. Nessas corridas foram utilizados a opção “*lognormal relaxed clock*” e o processo de especiação “*Speciation: Yule process*”. A convergência dos resultados foi visualizada no programa Tracer versão 1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2009), sendo os arquivos das duas corridas convertidas no programa LogCombiner versão 1.7.4 (DRUMMOND et al. 2012) e a árvore final obtida a partir do programa TreeAnnotator versão 1.7.4 (DRUMMOND et al. 2012) como *burnin* de 10%.

Foi realizada também a análise *Bayesian Skyline Plot* (DRUMMOND et al., 2005) a partir da utilização do programa BEAST v. 1.7.2 (DRUMMOND; RAMBAUD, 2007; DRUMMOND et al., 2012). Essa análise tem como objetivo a avaliação dos padrões históricos de tamanho da população a partir de uma genealogia. Ou seja, essa análise estima as mudanças no tamanho efetivo de populações ao longo do tempo levando-se em consideração o número de gerações. Nessas análises foram utilizados somente as regiões de cpDNA concatenados. Como modelo foi adotado o “*strict molecular clock*” e o parâmetro “*uniform priors*” com uma taxa de substituição lenta de 0.0011 substituições/sítio/milhões de anos e outra rápida de 0.0029 substituições/sítio/milhões de anos com base nas taxas de

divergência de regiões que não estão sob pressão seletiva para cpDNA em angiospermas de acordo com Wolfe et al. (1987). Os gráficos foram obtidos com o auxílio do programa Tracer versão 1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND 2009), onde foram observados anteriormente os valores de ESS (*effective sample sizes*).

3.3 Resultados

3.3.1 Marcadores microssatélites

Análises de diversidade genética

Primeiramente a análise de diversidade genética foi realizada levando-se em consideração cada uma das 12 localidades amostradas sendo, portanto, chamadas de populações independentemente da espécie. Adicionalmente foram realizadas as mesmas análises considerando-se as sete diferentes espécies reconhecidas a partir das análises filogenéticas do capítulo 2. Portanto para as análises referentes às 12 populações os resultados indicaram a presença de altos índices de diversidade dentro das populações, com o número de alelos por loco (A) variando de 5,3 a 9,4, com média de 7,7; a porcentagem de locos polimórficos (P) variando de 90% a 100%, com média de 97%; a heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (H_E) variou de 0,60 a 0,72, com média de 0,67; os valores de heterozigosidade observada (H_O) foram de 0,57 a 0,74, com média de 0,66; e o índice de fixação de Wright (f) variou de -0,07 a 0,12, com média de 0,005 (Tabela 3.6). A taxa de cruzamento aparente (t_a) indica que somente as populações SJPB, PERJ, ITMG e SJTSP não apresentam sistema reprodutivo por alogamia, sendo caracterizadas como sistema reprodutivo misto, todas as demais mostraram valores de 100% de taxa de cruzamento. No entanto, pelo valor médio apresentado 92%, este percentual indica que estas 12 populações apresentam um sistema reprodutivo misto, com predominância de alogamia.

Com relação às sete espécies reconhecidas o número de alelos por loco (A) foi de 5,90 a 13,45, com média de 8,87; a porcentagem de locos polimórficos (P) variou de 90% a 100%, com média de 97%; a H_E ficou entre 0,65 e 0,72, com média de 0,68; a H_O variou de 0,58 a 0,72, com média de 0,66; e o f ficou entre -0,22 a 0,21, com média de 0,02 (Tabela 3.7). A t_a variou entre 78% e 100% entre as sete espécies com média de 91%, indicando que as espécies apresentam um sistema de reprodução misto, com predominância de alogamia.

Tabela 3.6 - Parâmetros de diversidade genética para 12 populações de espécies do complexo *Cattleya coccinea*, tais como: N – número de indivíduos avaliados; A – número médio de alelos por loco; P – frequência de locos polimórficos; H_e – heterozigosidade esperada ou diversidade gênica; H_o – heterozigosidade observada; f – índice de fixação de Wright; e t_a – taxa de cruzamento aparente

População	N	A	P	H_E	H_O	f	t_a
Cambará do Sul/RS	33,5	8,00	0,90	0,66	0,66	-0,01	1,00
S.J. do Barreiro/PB/SP	14,0	5,90	0,90	0,66	0,58	0,12	0,78
Petrópolis/RJ	33,0	8,80	1,00	0,68	0,61	0,10	0,81
Alto Caparaó/MG	18,0	7,10	1,00	0,71	0,73	-0,02	1,00
Domingos Martins/ES	33,3	7,70	1,00	0,68	0,72	-0,07	1,00
Morro do Pilar/MG	25,4	7,60	1,00	0,63	0,63	-0,01	1,00
Itambé/MG	19,5	7,60	1,00	0,70	0,65	0,07	0,86
Ouro Branco/MG	25,8	9,40	1,00	0,69	0,71	-0,03	1,00
Lima Duarte/MG	28,8	8,60	1,00	0,66	0,68	-0,02	1,00
Campos do Jordão/SP	14,9	5,30	0,90	0,60	0,74	-0,22	1,00
S. J. do Barreiro/TC/SP	16,8	8,00	1,00	0,72	0,57	0,21	0,65
Santa Teresa/ES	35,5	8,10	1,00	0,67	0,71	-0,06	1,00
Média	-	7,67	0,97	0,67	0,66	0,005	0,92

Tabela 3.7 - Parâmetros de diversidade genética para as sete espécies do complexo *Cattleya coccinea*, tais como: N – número de indivíduos avaliados; A – número médio de alelos por loco; P – frequência de locos polimórficos; H_e – heterozigosidade esperada ou diversidade gênica; H_o – heterozigosidade observada; f – índice de fixação de Wright; e t_a – taxa de cruzamento aparente

Espécies	N	A	P	H_E	H_O	f	t_a
LDMG/OBMG/ITMG/MPMG	99,72	13,45	1,00	0,71	0,67	0,06	0,88
CSRS	33,54	8,00	0,90	0,65	0,66	-0,01	1,00
PERJ/ACMG	51,00	9,90	1,00	0,72	0,65	0,09	0,83
SJPSP	14,00	5,90	0,90	0,66	0,58	0,12	0,78
CJSP/SJTSP	31,72	8,90	1,00	0,68	0,65	0,04	0,92
STES	35,54	8,18	1,00	0,66	0,71	-0,06	1,00
DMES	33,36	7,72	1,00	0,67	0,72	-0,07	1,00
Média		8,87	0,97	0,68	0,66	0,02	0,91

Análises de atribuição de indivíduos e estruturação genética das populações

Os resultados das análises bayesianas de atribuição de indivíduos, pelo programa Structure, encontram-se descritos no capítulo 2 (Figuras 2.7, 2.8, 2.9). As 12 populações foram classificadas inicialmente em dois grupos ($K=2$) (Figura 2.7). Essa atribuição considera um primeiro grupo (grupo I, em vermelho) formado por indivíduos das localidades na Serra do Espinhaço (OBMG, ITMG, MPMG) e por LDMG, situada nos campos rupestres da Serra da Mantiqueira, além de STES, proveniente do sul do Espírito Santo. O segundo grupo (em verde) refere-se aos indivíduos das localidades ao longo de todo gradiente latitudinal da Serra do Mar (CSRS, SJTSP, PERJ, DMES) e da Serra da Mantiqueira (CJSP e ACMG).

Adicionalmente, foram realizadas análises considerando-se os dois grupos separadamente. Considerando-se as localidades do grupo I, OBMG, ITMG, MPMG, LDMG e STES, observou-se a formação de três sub-grupos geneticamente distintos ($K=3$): OBMG e LDMG; ITMG e MPMG e STES (Figura 2.8). Nesta análise pode-se observar que alguns indivíduos apresentam diferentes graus de provável hibridização entre os diferentes grupos. Na terceira e última análise foram consideradas as localidades do grupo II, de CSRS, SJPS, SJTSP, CJSP, PERJ, DMES e ACMG, indicando a separação dessas populações em cinco sub-grupos ($K=5$) (Figura 2.9). As populações de CJSP e SJTSP formaram um único grupo, ocorrendo o mesmo com ACMG e PERJ, enquanto que os indivíduos das populações de SJPS, CSRS e DMES formaram grupos distintos (Figura 2.9B).

Na análise da estatística F , considerando os parâmetros estabelecidos por Weir e Cocherham (1984) (Tabela 3.8), o valor obtido para $\hat{\theta}$ indica um alto nível de estruturação entre as 12 populações, com média de 0,17, sendo este valor condizente com plantas que possuem o sistema reprodutivo predominantemente por alogamia e também pelo fato de que teoricamente se tratam de quatro espécies distintas. O valor do $\hat{f}$ foi baixo (0,001), indicando que praticamente não está ocorrendo cruzamento entre parentes próximos. Já o valor de $\hat{F}$ (0,17) representa a soma dos dois valores anteriores, indicando que a variação total é principalmente devida à subdivisão entre populações. Ao considerarmos os dois grupos estabelecidos pela análise de atribuição de indivíduos, verificamos que o valor de $\hat{\theta}$ foi menor, 0,07. No entanto, considerando apenas os sub-grupos dentro do grupo I da análise bayesiana, verifica-se um valor menor que para as 12 populações juntas entre os cinco sub-grupos formados ($\hat{\theta}= 0,11$), indicando no entanto que ainda há divergência entre as populações dessas localidades (entre os sub-grupos). A análise entre e dentro dos sub-grupos para o grupo II da análise bayesiana de atribuição de indivíduos indicou um alto valor de

estruturação com $\hat{\theta} = 0,18$. Verifica-se que este valor foi maior que o valor considerando-se as 12 populações juntas, o que mostra a maior divergência entre esses cinco sub-grupos.

Na análise de variância molecular (AMOVA) foram consideradas diferentes hipóteses quanto ao número de populações, onde os resultados obtidos com a análise de atribuição de indivíduos foram analisados com relação a $K=2$ e $K=8$ (considerando os oito sub-grupos). Adicionalmente, também se considerou as sete espécies reconhecidas para o complexo *C. coccinea* (Tabela 3.9). Nas três hipóteses testadas a maior parte da variação genética foi observada dentro das populações com valores variando de 81,3% a 82,5%. A variação genética entre os grupos variou de 3,9% ($K=2$), 7,2% ($K=8$), e 10,6% (para as sete espécies). Enquanto que a variação entre populações dentro de grupos ficou entre 7,5% (para as sete espécies), 10,2% ($K=8$) e 14,8% ($K=2$). Para as análises de variação molecular das três espécies que apresentavam mais de uma população amostrada, os resultados variaram de 4,8% a 9,0% para a variação entre populações e de 90,0% a 95,1% para a variação dentro das populações (Tabela 3.10).

Para a análise de agrupamento, as 12 populações emergiram como seis grupos principais, com as populações de PERJ da Serra do Mar e ACMG, localizada na Serra da Mantiqueira formando um agrupamento (Figura 3.2). As populações LDMG, OBMG, ITMG e MPMG, sendo a primeira localizada na transição da Serra da Mantiqueira e Serra do Espinhaço e as três últimas da Serra do Espinhaço, emergiram com outro agrupamento. A população de CSRS no Sul da Serra do Mar emergiu com um ramo único, enquanto que as populações de CJSP (Serra da Mantiqueira e SJTSP na Serra do Mar formaram o quarto grupo. A população de SJPSP localizada na Serra do Mar emergiu como um ramo único. O sexto e último grupo foi formado com as populações do estado do Espírito Santo, DMES e STES.

Tabela 3.8 - Estatísticas F de Weir e Cockerham (1984) considerando: todas as 12 localidades avaliadas do complexo *Cattleya coccinea*; grupos (I e II) definidos na análise bayesiana de atribuição de indivíduos; sub-grupos dentro do grupo I definidos na análise bayesiana; sub-grupos gerados considerando o grupo II na análise bayesiana

Análise considerando-se as 12 populações			
	$\hat{F}$	$\hat{\theta}$	$\hat{f}$
Estimativa	0,172	0,172	0,001
Limite inferior	0,047	0,123	-0,166
Limite superior	0,302	0,241	0,154
Grupos (I e II) definidos na análise de atribuição de indivíduos			
	$\hat{F}$	$\hat{\theta}$	$\hat{f}$
Estimativa	0,187	0,066	0,130
Limite inferior	0,062	0,044	0,001
Limite superior	0,317	0,090	0,262
Sub-grupos dentro grupo I definidos na análise de filiação de indivíduos			
	$\hat{F}$	$\hat{\theta}$	$\hat{f}$
Estimativa	0,094	0,114	-0,019
Limite inferior	-0,075	0,068	-0,124
Limite superior	0,261	0,157	0,170
Sub-grupos dentro grupo II definidos na análise de filiação de indivíduos			
	$\hat{F}$	$\hat{\theta}$	$\hat{f}$
Estimativa	0,198	0,184	0,018
Limite inferior	0,086	0,113	-0,133
Limite superior	0,321	0,290	0,148

Sendo: $\hat{f}$ - índice médio de fixação dentro das populações; $\hat{F}$ - índice de fixação total das populações; e $\hat{\theta}$ - divergência genética entre populações

Tabela 3.9 - Análise de variância molecular (AMOVA) a partir de marcadores SSR realizada para as 12 populações amostradas de acordo com os resultados da análise de atribuição de indivíduos com K=2; reconhecimento de sete distintas espécies e K=8

Análise de atribuição de indivíduos para dois grupos (K=2)				
Fonte de variação	GL	Percentagem da variação total	Índices de fixação	Valor de P1
Entre grupos	1	3,91%	F_{SC} : 0,153	0,000
Entre populações dentro de grupos	10	14,76%	F_{ST} : 0,186	0,000
Dentro de populações	592	81,34%	F_{CT} : 0,039	0,001
Total	603			
Análise filogenética com o reconhecimento de sete espécies				
Entre espécies	6	10,65%	F_{SC} : 0,084	0,000
Entre populações dentro de espécies	5	7,53%	F_{ST} : 0,181	0,000
Dentro de populações	592	81,82%	F_{CT} : 0,106	0,000
Total	603			
Análise de atribuição de indivíduos para oito grupos (K=8)				
Entre grupos	7	7,22%	F_{SC} : 0,110	0,000
Entre populações dentro de grupos	4	10,27%	F_{ST} : 0,174	0,000
Dentro de populações	592	82,51%	F_{CT} : 0,72	0,007
Total	603			

Tabela 3.10 - Análise de variância molecular (AMOVA) realizada com marcadores SSR para as populações amostradas de três espécies reconhecidas para o clado *C. coccinea*

<i>Cattleya coccinea</i>				
Fonte de variação	GL	Percentagem da variação total	Índices de fixação	Valor de <i>P</i> 1
Entre populações	1	8,66%	F_{ST} : 0,086	0,000
Dentro de populações	100	91,34%		
Total	101			
<i>Cattleya mantiqueirae</i>				
Entre populações	1	4,85%	F_{ST} : 0,048	0,000
Dentro de populações	62	95,15%		
Total	63			
<i>Cattleya brevipedunculata</i>				
Entre populações	3	9,01%	F_{ST} : 0,090	0,000
Dentro de populações	198	90,99%		
Total	201			

O dendrograma obtido a partir do método aglomerativo UPGMA mostrou a formação de seis grupos: grupo 1 formado pelas populações da espécie *C. brevipedunculata*: LDMG, OBMG, ITMG e MPMG da Serra do Espinhaço e Serra da Mantiqueira; grupo 2 com populações da espécie *C. coccinea*: PERJ e ACMG da Serra do Mar e Mantiqueira; grupo 3 composto pelas populações da espécie *C. mantiqueirae*: CJSP e SJTSP da Serra do Mar e Mantiqueira; grupo 4 DMES e *C. wittigiana* representada pela população STES da Serra do Mar. As populações de CSRS da Serra do Mar da região Sul e SJSP da Serra do Mar emergiram como ramos solitários respectivamente.

Figura 3.2 - Dendrograma utilizando distância de Nei e método aglomerativo UPGMA para as 12 populações do complexo *Cattleya coccinea*. O grupo em amarelo é formado pelas populações: ACMG e PERJ. Em verde a população de SJPSP emergindo como um ramo solitário, assim como CSRS em rosa. Um outro grupo formado por DMES em vermelho e STES em lilás. O grupo em azul emerge com CJSP e SJTSP (*C. coccinea*). E último grupo em lilás formado pelas populações de MPMG, ITMG, OBMG e LDMG

3.3.2 Análises das sequências de DNA

Análises de diversidade genética

Para as sequências de cpDNA e da região de rDNA (ITS) foram calculados os índices de diversidade para as 23 localidades amostradas, sendo que o número de posições polimórficas entre as sequências (S) variaram de 16 a 35 para as regiões de cpDNA e 72 para o ITS; o número de haplótipos (h) variou de 11 a 24 para os cpDNA e 39 para o ITS; enquanto que a diversidade haplotípica (Hd) para os cpDNA ficou entre 79% e 85% e 88% para o ITS e a diversidade nucleotídica variou de 0,7% a 0,11% para os cpDNA e para o ITS ficou em 1,5% (Tabela 3.11).

Tabela 3.11 – Análise de diversidade genética para cada região de sequências de cpDNA e ITS do clado *C. coccinea*. Tamanho em pares de base (pb); número de sequências (N); número de posições polimórficas (S); número de haplótipos (h); percentagem da diversidade haplotípica (% Hd) e percentagem da diversidade nucleotídica (% π)

Sequência	PB	N	S	h	% Hd	% π
<i>atpL/atpH</i>	759	104	26	13	85	0,7
<i>psbJ/petA</i>	997	135	20	16	82	0,7
<i>rpL32/trnL</i>	918	157	35	24	83	1,1
<i>rpS16/trnK</i>	682	157	16	11	79	0,7
<i>ITS1/ITS2</i>	809	154	72	39	88	1,5

As análises de diversidade genética para as sete espécies foram realizadas separadamente para cada região de cpDNA e ITS. Para a região *atpL/atpH*, o número de posições polimórficas entre as sequências (S) variou de 0 (DMES) a 16 (SJPS), o número de haplótipos (h) variou de 1 (DMES) a 6 (*C. coccinea*), a %Hd variou de 0 (DMES) a 69 (*C. brevipedunculata*), e a % π variou de 0,0 (DMES e *C. wittigiana*) a 0,9 (SJPS). Para a região *psbJ/petA*, o S variou de 0 (*C. wittigiana* e DMES) a 8 (*C. mantiqueirae*), o h variou de 1 (*C. wittigiana* e DMES) a 9 (CSRS/JOIN/PMPR), o Hd variou de 0 (*C. wittigiana* e DMES) a 85 (CSRS/JOIN/PMPR) e a % π variou de 0,0 (*C. wittigiana* e DMES) a 0,3 (CSRS/JOIN/PMPR). Já a região *rpL32/trnL* teve uma variação de 1 (*C. wittigiana*) a 13 (*C. mantiqueirae* e DMES) para o S, de 2 (*C. wittigiana*) a 7 (*C. coccinea*) para o h, de 27 (*C. brevipedunculata*) a 80 (DMES) para o Hd, e de 0,0 (*C. wittigiana*) a 0,4 (DMES) para o % π . Para a região *rpS16/trnK*, os valores de S variaram de 2 (*C. mantiqueirae*) a 12 (*C. wittigiana*), os de h variaram de 2 *C. mantiqueirae* a 6 (*C. coccinea*), os de Hd de 12 (*C.*

brevipedunculata) a 64 (*C. wittigiana*) e a $\% \pi$ variou de 0.0 (*C. brevipedunculata*) a 0.4 (*C. wittigiana*). Por último, para região do ITS o S variou de 5 (*C. wittigiana*) a 51 (*C. coccinea*), o h variou de 3 (DMES) a 16 (*C. coccinea*), o Hd variou de 47 (*C. mantiqueirae*) a 82 (*C. coccinea*), e o $\% \pi$ de 0,1 (*C. brevipedunculata* e *C. mantiqueirae*) a 0,8 (*C. coccinea*).

Análises de estruturação genética

Os valores da AMOVA foram calculados para os resultados obtidos com a análise de atribuição de indivíduos (K=2 e K=8), como também se considerou as sete espécies reconhecidas para o complexo *C. coccinea*. O percentual de variação genética dentro dos grupos ou espécies para as regiões de cpDNA variou de -4,25% a 2,57% (Tabelas 3.13 e 3.14) e de 41,70% a 51,27% para a região ITS (Tabelas 3.15 e 3.16). A variação genética entre as populações dentro de grupos ou espécies variou de 28,59% a 34,22% (cpDNA) e 9,79% a 25,09% (ITS). Enquanto que a variação genética dentro das populações ficou entre 68,84% e 70,11% (cpDNA) e 33,20% a 40,08% (ITS). Ou seja, para a região de ITS, a variação genética atribuída entre grupos ou espécies é maior que para as regiões de cpDNA, sendo que a maior percentagem foi observada para a hipótese entre espécies (52,3%), seguida de entre K=8 grupos (48,7%) e entre K=2 grupos (41,7%) para ITS. O contrário observa-se para a variação observada dentro de populações para ambos os tipos de marcadores. Para as sequências de DNA, diferentemente dos microssatélites, quatro espécies possuíam mais de uma população coletada. Para os dados de cpDNA, verificou-se que para as espécies *C. mantiqueirae* e *C. brevipedunculata*, a maior parte da variação foi observada dentro de populações, variando de 93% (*C. mantiqueirae*) a 94,1% (*C. brevipedunculata*), com apenas 7% e 5,9% da variação total observada dentro de populações, respectivamente (Tabela 3.14). Já para a espécie *C. coccinea*, 48,5% da variação total foi devida à variação entre as populações. E para a espécie da região Sul da Serra do Mar (CSRS/JOIN/PMPR), a maior parte da variação total foi devida à variação entre populações (65,5%), em comparação com a variação dentro de populações (34,5%). Já para os dados de ITS, foi observada maior variação dentro de populações para as quatro espécies, mas variando de 100,8% para *C. brevipedunculata*, 92,6% para a espécie da região Sul da Serra do Mar (CSRS/JOIN/PMPR), 88,8% para *C. mantiqueirae*, e 67,3% para *C. coccinea* (Tabela 3.16). Ou seja, verifica-se mais uma vez uma expressiva variação entre populações para *C. coccinea* (32,7%), e também para *C. mantiqueirae* (11,2%), seguida da espécie da região Sul da Serra do Mar (CSRS/JOIN/PMPR) (7,4%).

Tabela 3.12 – Análise de diversidade genética para as sete espécies do clado *C. coccinea*. Tamanho em pares de base (pb); número de sequências (N); número de posições polimórficas (S); número de haplótipos (h); percentagem da diversidade haplotípica (% Hd) e (DP); percentagem da diversidade nucleotídica (% π)

<i>atpI/atpL</i>						
Espécies	PB	N	S	h	% Hd	% π
<i>Cattleya brevipedunculata</i>	737	31	5	5	69	0,2
CSRS/JOIN/PMPR	757	15	3	4	46	0,0
<i>Cattleya coccinea</i>	771	21	11	6	42	0,2
SJPSP	804	6	16	3	60	0,9
<i>Cattleya mantiqueirae</i>	805	12	4	3	32	0,1
<i>Cattleya wittigiana</i>	688	10	1	2	35	0,0
DMES	723	9	0	1	0	0,0
<i>psbJ/petA</i>						
<i>Cattleya brevipedunculata</i>	994	37	4	5	50	0,0
CSRS/JOIN/PMPR	988	20	4	9	85	0,3
<i>Cattleya coccinea</i>	978	32	7	6	52	0,1
SJPSP	969	14	6	5	59	0,1
<i>Cattleya mantiqueirae</i>	990	13	8	5	75	0,2
<i>Cattleya wittigiana</i>	978	10	0	1	0	0,0
DMES	1025	9	0	1	0	0,0
<i>rpL32/trnL</i>						
<i>Cattleya brevipedunculata</i>	861	47	5	5	27	0,0
CSRS/JOIN/PMPR	829	23	5	6	67	0,1
<i>Cattleya coccinea</i>	876	37	11	7	46	0,1
SJPSP	894	15	12	5	56	0,2
<i>Cattleya mantiqueirae</i>	909	15	13	5	56	0,3
<i>Cattleya wittigiana</i>	857	10	1	2	20	0,0
DMES	904	10	13	5	80	0,4
<i>rpS16/trnK</i>						
<i>Cattleya brevipedunculata</i>	664	47	10	4	12	0,0
CSRS/JOIN/PMPR	661	23	9	3	17	0,1
<i>Cattleya coccinea</i>	686	37	7	6	42	0,1
SJPSP	671	15	6	3	26	0,1
<i>Cattleya mantiqueirae</i>	668	15	2	2	13	0,0
<i>Cattleya wittigiana</i>	665	10	12	4	64	0,4
DMES	670	10	6	4	53	0,2
<i>ITS1/ITS2</i>						
<i>Cattleya brevipedunculata</i>	831	47	12	12	53	0,1
CSRS/JOIN/PMPR	850	23	13	7	68	0,2
<i>Cattleya coccinea</i>	835	43	51	16	82	0,8
SJPSP	830	13	9	6	72	0,2
<i>Cattleya mantiqueirae</i>	812	15	6	5	47	0,1
<i>Cattleya wittigiana</i>	806	10	5	5	75	0,2
DMES	816	10	18	3	51	0,5

Tabela 3.13 - Análise de variância molecular (AMOVA) a partir de regiões de cpDNA concatenadas realizada para as 12 populações amostradas de acordo os resultados da análise de atribuição de indivíduos com K=2; reconhecimento de sete distintas espécies e K=8

Análise de atribuição de indivíduos para dois grupos (K=2)				
Fonte de variação	GL	Percentagem da variação total	Índices de fixação	Valor de P1
Entre grupos	1	2,57%	F_{SC} : 0,293	0,000
Entre populações dentro de grupos	16	28,59%	F_{ST} : 0,311	0,000
Dentro de populações	139	68,84%	F_{CT} : 0,025	0,180
Total	156			
Análises filogenéticas com o reconhecimento de sete espécies				
Entre espécies	6	-3,65%	F_{SC} : 0,322	0,000
Entre populações dentro de espécies	11	33,53%	F_{ST} : 0,298	0,000
Dentro de populações	139	70,11%	F_{CT} : -0,036	0,650
Total	156			
Análise de atribuição de indivíduos para oito grupos (K=8)				
Entre grupos	7	-4,25%	F_{SC} : 0,328	0,000
Entre populações dentro de grupos	10	34,22%	F_{ST} : 0,299	0,000
Dentro de populações	139	70,03%	F_{CT} : -0,042	0,656
Total	156			

Tabela 3.14 - Análise de variância molecular (AMOVA) realizada a partir das regiões de cpDNA concatenadas para as populações amostradas de quatro espécies reconhecidas para o clado *C. coccinea*

<i>Cattleya coccinea</i>				
Fonte de variação	GL	Percentagem da variação total	Índices de fixação	Valor de <i>P</i> 1
Entre populações	4	48,47%	F_{ST} : 0,484	0,000
Dentro de populações	32	51,53%		
Total	36			
<i>Cattleya mantiqueirae</i>				
Entre populações	1	7%	F_{ST} : 0,070	0,141
Dentro de populações	13	93%		
Total	14			
<i>Cattleya brevipedunculata</i>				
Entre populações	4	5,93%	F_{ST} : 0,059	0,112
Dentro de populações	42	94,07%		
Total	46			
Espécie da região Sul da Serra do Mar (CSRS/JOIN/PMPR)				
Entre populações	2	65,49%	F_{ST} : 0,654	0,000
Dentro de populações	20	34,51%		
Total	22			

Tabela 3.15 - Análise de variância molecular (AMOVA) a partir da região ITS realizada para as 12 populações amostradas de acordo os resultados da análise de atribuição de indivíduos com K=2; reconhecimento de sete distintas espécies e K=8

Análise de atribuição de indivíduos para dois grupos (K=2)				
Fonte de variação	GL	Percentagem da variação total	Índices de fixação	Valor de P1
Entre grupos	1	41,70%	F_{SC} : 0,430	0,000
Entre populações dentro de grupos	16	25,09%	F_{ST} : 0,667	0,000
Dentro de populações	136	33,20%	F_{CT} : 0,417	0,000
Total	153			
Análises filogenéticas com reconhecimento de sete espécies				
Entre espécies	6	51,27%	F_{SC} : 0,201	0,000
Entre populações dentro de espécies	11	9,79%	F_{ST} : 0,610	0,000
Dentro de populações	136	38,94%	F_{CT} : 0,512	0,000
Total	153			
Análise de atribuição de indivíduos para oito grupos (K=8)				
Entre grupos	7	48,74%	F_{SC} : 0,217	0,000
Entre populações dentro de grupos	10	11,17%	F_{ST} : 0,599	0,000
Dentro de populações	136	40,08%	F_{CT} : 0,487	0,000
Total	153			

Tabela 3.16 - Análise de variância molecular (AMOVA) realizada a partir da região ITS para as populações amostradas de quatro espécies reconhecidas para o clado *C. coccinea*

<i>Cattleya coccinea</i>				
Fonte de variação	GL	Porcentagem da variação total	Índices de fixação	Valor de P_1
Entre populações	4	32,72%	F_{ST} : 0,327	0,000
Dentro de populações	31	67,28%		
Total	35			
<i>Cattleya mantiqueirae</i>				
Entre populações	1	11,21%	F_{ST} : 0,112	0,074
Dentro de populações	13	88,79%		
Total	14			
<i>Cattleya brevipedunculata</i>				
Entre populações	4	-0,82%	F_{ST} : -0,008	0,112
Dentro de populações	42	100,82%		
Total	46			
Espécie da região Sul da Serra do Mar (CSRS/JOIN/PMPR)				
Entre populações	2	7,38%	F_{ST} : 0,073	0,082
Dentro de populações	20	92,62%		
Total	22			

As redes de haplótipos das regiões de cpDNA mostraram estruturação genética entre as populações amostradas com a presença de seis diferentes haplótipos ancestrais e seus respectivos haplótipos derivados (Figura 3.3 a 3.6). Esses resultados são muito semelhantes aos obtidos a partir da análise filogenética das regiões de cpDNA concatenados (Figura 2.5, capítulo 2). A população LDMG da transição entre Serra da Mantiqueira e Serra do Espinhaço compartilha os mesmos haplótipos com as populações OBMG, ITMG e MPMG, e também com a população STES no Espírito Santo. Além disso, indivíduos da população NFPRJ na Serra do Mar também compartilham os mesmos haplótipos com as populações anteriores. As populações PERJ, NFCRJ, ACMG, BASP, SASP, PASP, SLSP, SBSP e CBSP, todas localizadas na Serra do Mar, e ACMG da Serra da Mantiqueira compartilham um mesmo

haplótipo ancestral como também os haplótipos derivados. Para a rede de haplótipos da região *atpI/atpH* (Figura 3.3) as populações CJSP, localizada na Serra do Mar, e SJTSP, na Serra da Mantiqueira, compartilham o mesmo haplótipo com DMES do norte da Serra do Mar (H 6). Entretanto, esse fato não foi observado para as outras regiões de cpDNA onde somente as populações CJSP e SJTSP compartilharam os mesmos haplótipos, enquanto a população DMES possui haplótipos exclusivos. As populações do Sul (CSRS/JOSC/PMPR) compartilham os mesmos haplótipos. Já a população SJPSP possui um haplótipo ancestral exclusivo, entretanto, compartilha alguns haplótipos com as população CJSP e SJTSP, com exceção da região *psbJ/petA*. Na rede de haplótipos da região ITS também emergem seis principais haplótipos ancestrais com seus haplótipos derivados mostrando estruturação semelhante à encontrada para as regiões de cpDNA (Figura 3.7). Em todas as análises, com exceção dos haplótipos formados pelas populações LDMG/OBMG/ITMG/MPMG/NFPRJ/STES que possuem a cor marrom, as cores dos haplótipos correspondem aos mesmos grupos geneticamente distintos obtidos na análise bayesiana de atribuição de indivíduos apresentada no capítulo 2 (Figura 2.9).

Fluxo gênico via pólen x sementes

Os valores da proporção do fluxo gênico de pólen x semente calculados a partir os resultados de F_{ST} foram: ~0,08 para todas as sete espécies; ~7,96 para a espécie *C. coccinea*; ~0,50 para *C. mantiqueirae* e ~1,36 para *C. brevipedunculata*. Indicando que o fluxo gênico via pólen é mais eficiente para a espécie *C. coccinea*, sendo aproximadamente oito vezes maior.

Figura 3.3 - Rede de haplótipos obtida através do método Median-joining para a região de cpDNA *atpL/atpH*. Os círculos cheios indicam os haplótipos, o tamanho de cada círculo é proporcional à frequência observada de cada um. Os círculos pequenos em vermelho representam o ancestral comum não amostrado. O número de mutações necessárias para explicar as transições entre haplótipos é indicado ao longo das linhas que ligam os haplótipos. A cor marrom representa as populações: LDMG/OBMG/ITMG/MPMG/NFPRJ/STES; em amarelo as populações: PERJ/NFCRJ/ACMG/BASP/SASP/PASP/SLSP/SBSP/CBSP; em azul as populações de: CJSP/SJTSP. Em verde a população SJPSP, em vermelho os indivíduos de DMES e em rosa as populações CSRS/JOSC/PMPR. Os haplótipos em pizza indicam que indivíduos provenientes de diferentes populações compartilham haplótipos

Figura 3.4 - Rede de haplótipos obtida através do método Median-joining para a região de cpDNA *psbJ/petA*. Os círculos cheios indicam os haplótipos, o tamanho de cada círculo é proporcional à frequência observada de cada um. O número de mutações necessárias para explicar as transições entre haplótipos é indicado ao longo das linhas que ligam os haplótipos. A cor marron representa as populações: LDMG/OBMG/ITMG/MPMG/NFPRJ/STES; em amarelo as populações: PERJ/NFCRJ/ACMG/BASP/SASP/PASP/SLSP/SBSP/CBSP; em azul as populações de: CJSP/SJTSP. Em verde a população SJPSP, em vermelho os indivíduos de DMES e em rosa as populações CSRS/JOSC/PMPR

Figura 3.5 - Redes de haplótipos obtida através do método Median-joining para a região de cpDNA *rpL32/trnL*. Os círculos cheios indicam os haplótipos, o tamanho de cada círculo é proporcional à frequência observada de cada um. Os círculos pequenos em vermelho representam o ancestral comum não amostrado. O número de mutações necessárias para explicar as transições entre haplótipos é indicado ao longo das linhas que ligam os haplótipos. A cor marron representa as populações: LDMG/OBMG/ITMG/MPMG/NFPRJ/STES; em amarelo as populações: PERJ/NFCRJ/ACMG/BASP/SASP/PASP/SLSP/SBSP/CBSP; em azul as populações de: CJSP/SJTSP. Em verde a população SJPSP, em vermelho os indivíduos DMES e em rosa as populações CSRS/JOSC/PMPR. Os haplótipos em pizza indicam que indivíduos provenientes de diferentes populações compartilham haplótipos

Figura 3.6 - Redes de haplótipos obtida através do método Median-joining para a região de cpDNA *rpS16/trnK*. Os círculos cheios indicam os haplótipos, o tamanho de cada círculo é proporcional à frequência observada de cada um. Os círculos pequenos em vermelho representam o ancestral comum não amostrado. O número de mutações necessárias para explicar as transições entre haplótipos é indicado ao longo das linhas que ligam os haplótipos. A cor marrom representa as populações: LDMG/OBMG/ITMG/MPMG/NFPRJ/STES; em amarelo as populações: PERJ/NFCRJ/ACMG/BASP/SASP/PASP/SLSP/SBSP/CBSP; em azul as populações de: CJSP/SJTSP. Em verde a população SJPSP, em vermelho os indivíduos de DMES e em rosa as populações CSRS/JOSC/PMPR. Os haplótipos em pizza indicam que indivíduos provenientes de diferentes populações compartilham haplótipos

Figura 3.7 - Rede de haplótipos obtida através do método Median-joining para a região nrDNA *ITS*. Os círculos cheios indicam os haplótipos, o tamanho de cada círculo é proporcional à frequência observada de cada um. Os círculos pequenos em vermelho representam o ancestral comum não amostrado. O número de mutações necessárias para explicar as transições entre haplótipos é indicado ao longo das linhas que ligam os haplótipos. A cor marrom representa as populações: LDMG/OBMG/ITMG/MPMG/NFPRJ/STES; em amarelo as populações: PERJ/NFCRJ/ACMG/BASP/SASP/PASP/SLSP/SBSP/CBSP; em azul as populações de: CJSP/SJTSP. Em verde a população SJPSP, em vermelho os indivíduos DMES e em rosa as populações CSRS/JOSC/PMPR. Os haplótipos em pizza indicam que indivíduos provenientes de diferentes populações compartilham haplótipos

A árvore com a estimativa de tempo de divergência (tMRCA) apresentada a seguir é a mesma apresentada no capítulo 2 (Figura 2.10), entretanto, agora mostrando os respectivos valores do tempo de divergência estimado para as espécies juntamente com a probabilidade posterior para cada ramo (Figura 3.8). Essa árvore foi a escolhida dentre todas as hipóteses analisadas por apresentar resultados mais plausíveis tanto com relação aos valores de probabilidade posterior, quanto à estimativa de tempo de divergência. Os resultados indicam que provavelmente as espécies relativas às populações LDMG/OBMG/ITMG/MPMG/NFRJ (*C. brevipedunculata*) e STES (*C. wittigiana*) tiveram origem entre o Plioceno e Pleistoceno (entre 3.8 a 1 milhão de anos) apresentando o maior intervalo de tempo de estimativa de divergência, podendo contudo ser consideradas as primeiras espécies do clado *C. coccinea*. Entretanto, todas as outras espécies possivelmente tiveram origem no Pleistoceno (2.5 milhões de anos a 11 mil anos) (Figura 3.8). Na análise *Bayesian Skyline plot* todas as corridas realizadas separadamente para as sete espécies reconhecidas apresentaram valores de ESS (*effective sample sizes*) superiores a 200, com exceção da análise relativa à espécie da localidade de SJPSP (Figura 3.9). Os resultados demonstram que todas as sete espécies tiveram episódios de expansão populacional. Entretanto, essa expansão foi mais pronunciada para a espécie *C. coccinea*, referente às populações PERJ/NFCRJ/ACMG/BASP/SASP/PASP/SLSP/CBSP e a espécie referente à população DMES, que tiveram um aumento significativo do tamanho efetivo populacional. Adicionalmente, os resultados indicam que todas as expansões populacionais ocorreram no Pleistoceno Médio que foi datado de 780 mil anos a 126 mil anos.

Figura 3.8 – Árvore de estimativa de tempo de divergência (tMRCA) e de espécies obtida a partir do modelo coalescente. Os números próximos aos nós representam as probabilidades posteriores. As barras sobre os nós representam o intervalo de tempo estimado para a divergência das espécies. As siglas representam as localidades amostradas de acordo com a tabela 2.2. A escala abaixo da árvore representa o tempo geológico em milhões de anos com as respectivas épocas do período Terciário e Quaternário

Figura 3.9- Gráficos da análise *Bayesian Skyline Plot* para cada uma das sete espécies reconhecidas para o complexo *C. coccinea*. A linha sólida representa a média e a área cinza representa a mediana das estimativas de tamanho efetivo populacional com intervalos de confiança de 95%. O gráfico A é referente às populações LDMG/OBMG/ITMG/MPMG/NFPRJ; B: PERJ/NFCRJ/ACMG/BASP/SASP/PASP/SLSP/ SBSP/CBSP, C: CJSP/SJTSP; D: STES; E: DMES; F: CSRS/JOSC/PMPR e o gráfico G: SJPSP. O eixo x representa a escala de tempo geológico em milhões de anos e o eixo y o tamanho efetivo populacional

3.4 Discussão

3.4.1 Diversidade genética

Para os marcadores microssatélites, os moderados e altos índices de diversidade genética (H_E e H_O) encontrados na análise realizada para as sete espécies do clado *C. coccinea* (Tabela 3.6) estão de acordo com os relatos de Hamrick et al. (1991), que a partir da observação de 449 espécies de plantas concluíram que espécies perenes, com ciclo de vida longo, reprodução predominante por cruzamento, e distribuição geográfica ampla, conseguem acumular maior diversidade genética dentro das populações. Além disso, esses valores são próximos aos valores encontrados para algumas espécies do complexo *C. coccinea* no trabalho de Leal (2013). Outros estudos com espécies do gênero *Cattleya*, como o de Almeida (2013) que estudou as espécies *C. labiata* Lindl. e *C. warneri* T. Moore que ocorrem na FAB e Leles et al. (2015) que estudaram *C. liliputana* (Pabst) van den Berg, que habita a Serra do Espinhaço, obtiveram resultados parecidos, entretanto com valores ligeiramente menores. Para outras espécies de orquídeas como as do gênero *Epidendrum*, de acordo com os trabalhos de Pinheiro et al. (2011) que estudaram *E. fulgens*, os valores de H_E e H_O foram similares. Adicionalmente, em Pinheiro et al. (2014) os valores foram mais baixos para *E. secundum*. Contudo, para plantas com sistema de reprodução com predominância de alogamia como é o caso das espécies do clado *C. coccinea*, esses resultados são esperados (HAMRICK; GODT, 1996).

Pode-se observar ainda que as espécies que apresentaram os maiores índices de diversidade como relação a H_E foram: a espécie *C. coccinea* correspondente às populações de PERJ/ACMG e a espécie *C. brevipedunculata* representada pelas populações de LDMG/OBMG/ITMG/MPMG. Esses resultados sugerem que possivelmente essas populações possam ser mais antigas que as demais. A espécie relativa à localidade de SJPSP foi dentro todas a que apresentou os menores índices de diversidade genética. Trata-se porém, de uma pequena população, considerada a menor dentre todas as populações amostradas. Além de ser de difícil acesso, houve grande esforço para conseguir o número de indivíduos suficientes para a amostragem (S. Koehler, comunicação pessoal). O tamanho amostral interfere diretamente nos índices de diversidade detectados, pois segundo Khanlou et al. (2011) quando o número amostral é menor que 15 a diversidade pode ser subestimada. A espécie *C. wittigiana* aqui representada pela população STES e a espécie relativa a população de DMES apresentaram valores de H_O mais elevados que as demais. Esse resultado sugere um excesso

de heterozigotos em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (MOURA et al., 2009). Além disso quando os valores de H_O são maiores que H_E , consequentemente geram valores negativos para o índice fixação f indicando que para essas espécies (STES e DMES), juntamente com a espécie relativa a população CSRS, não sofre endogamia. Porém, para as demais espécies os valores de f indicam que ocorrem cruzamentos entre parentes próximos, sugerindo para essas espécies excesso de homozigotos, sendo essa mesma característica observada para os três trabalhos com espécies do gênero *Cattleya* (LEAL, 2013; ALMEIDA, 2013; LELES et al., 2015). De acordo com a Weir (1996) e Vencovsky (1994) a média de 0.91 para a taxa de cruzamento aparente confere às espécies do clado *C. coccinea* a categoria de sistema reprodutivo misto com predominância de alogamia.

Com relação à diversidade genética obtida com as sequências de cpDNA e ITS observa-se claramente que a região de nrDNA é a mais polimórfica devida a sua herança biparental. Portanto para o presente estudo a região ITS se mostrou eficiente para a detecção de polimorfismo, além disso os valores de diversidade estão de acordo com os estudo de Li; Liu; Li (2012) e Wang et al. (2015) para espécies de plantas. Entretanto, entre as regiões de cpDNA os índices foram parecidos mas ligeiramente maiores para *rpL32/trnL* e *rpS16/trnK*. Esses valores maiores podem ser explicados pelo fato de que essas são as regiões que apresentam o maior número de indivíduos amostrados, uma vez que o nível de diversidade pode ser influenciado pelo tamanho amostral (KHANLOU et al., 2011). Os resultados de diversidade para cada uma das sete espécies estão de acordo com outros estudos com espécies de bromélias (PALMA-SILVA et al., 2009) e com espécies de orquídeas do gênero *Epidendrum* (KARTZINEL et al., 2013; PINHEIRO et al., 2014) e valores maiores que os observados por Pinheiro et al. (2011). Portanto pode-se considerar as regiões de cpDNA utilizadas no presente estudo como eficientes para estudos de diversidade por conter satisfatórios níveis de polimorfismo.

Tanto os resultados dos marcadores microssatélites quanto os de sequência são bem discordantes dos observados por Rodrigues et al. (2015). Esse fato pode ser explicado pela diferença de marcador, pois os marcadores ISSR utilizados por Rodrigues et al. (2015) são dominantes. Uma das razões para que os microssatélites sejam um dos marcadores mais utilizados é devido às altas taxas de polimorfismo que podem ser detectadas (ELLEGRÉN, 2004). Adicionalmente as regiões de cpDNA demonstraram ser eficientes para a detecção de polimorfismo e estudos de diversidade genética.

3.4.2 Estruturação genética

As análises de atribuição de indivíduos mostraram que das 12 populações amostradas, oito grupos geneticamente distintos foram observados. Os resultados mostram também forte estruturação genética entre populações sugerindo níveis baixos de fluxo gênico entre os grupos. Esses resultados foram amplamente discutidos no capítulo anterior, entretanto para o presente estudo os resultados concordam com os índices de estruturação descritos abaixo para as 12 populações e concorda parcialmente com o dendrograma e com a rede de haplótipos .

Para a família Orchidaceae, o fator principal que explicaria imensa diversidade de espécies seria a atuação da deriva genética e da seleção natural em populações desconectas gerando ao longo do tempo a diferenciação (GENTRY, DODSON 1987; TREMBLAY et al., 2005; OTERO; FLANAGAN, 2006; WATERMAN; BIDARTONDO, 2008; GIVNISH, 2010). Essa teoria “Deriva-Seleção” tem sido intensamente debatida nas últimas décadas e tem como uma das previsões uma elevada estrutura genética de populações. Entretanto essa característica não foi observada por Phillips; Dixon e Peakall (2012), que detectaram que as orquídeas, quando comparadas com outras famílias de plantas, apresentam níveis médios de estrutura genética mais baixos ($F_{ST}=0.146$ para aloenzimas). Entretanto para o presente estudo, quando se observa os resultados das Estatísticas F (WEIR; COCKERHAM, 1984) considerando-se todas as 12 populações os valores são mais altos, exceto quando testados para os grupos I e II (hipóteses testadas de acordo com o resultado da análise de atribuição de indivíduos) que apresentou valor moderado de estruturação (Tabela 3.8). Adicionalmente a análise de variância molecular (AMOVA) realizada tanto para as 12 populações amostradas, testando os resultados da análise de atribuição de indivíduos (com $K=2$ e $K=8$) e para as sete espécies reconhecidas mostram também altos valores de estruturação (F_{ST}) (Tabela 3.9). Entretanto esses valores são esperados por se tratar de diferentes espécies, apesar do fato já discutido no capítulo anterior de que para as espécies do gênero *Cattleya* a hibridização não é um fato raro (VAN DEN BERG, 2014a).

Entretanto, os valores da AMOVA entre populações dentro das espécies (*C. coccinea*, *C. mantiqueirae* e *C. brevipedunculata*) demonstram que a estruturação é moderada para *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* e baixa para *C. mantiqueirae* (Tabela 3.9). Portanto, os valores de baixa e intermediária diferenciação entre populações concordam com a hipótese de Phillips; Dixon, Peakall (2012) de que outros fatores podem contribuir para a diversificação de espécies de orquídeas. Como no caso da seleção diferenciada que sofrem populações resultantes do efeito do fundador causada pela dispersão em longa distância de sementes, uma

vez que a especiação é mais provável de surgir através de seleção divergente em alopatria pelo aumento da força seletiva divergente (COYNE, ORR, 2004). Porém, até o momento nenhum estudo foi realizado com espécies do clado *C. coccinea* a respeito da amplitude de dispersão de sementes. Já com relação a alta diversidade dentro das populações, as orquídeas são caracterizadas por possuir uma das menores sementes que são dispersas pelo vento, com potencial de alcançar longas distâncias (ARDITTI; GHANI, 2000). O fato dessas plantas apresentarem reprodução predominante por alogamia e possuírem ampla distribuição geográfica faz com que a maior diversidade seja encontrada dentro das populações (HAMRICK et al., 1991).

Os valores da análise de variância molecular para as sequências de cpDNA foram parcialmente concordantes com os valores para a região ITS, sendo que essa observação está relacionada ao fato da herança ser uniparental para o cpDNA e biparental para ITS. Os valores muito altos de F_{ST} para as regiões dos cpDNA e para os ITS nas hipóteses testadas com relação as análises de atribuição de indivíduos e as análises filogenéticas em relação ao número de espécies (Tabelas 3.13 a 3.16), indicam forte estruturação genética entre as espécies. Entretanto, os valores foram intermediários para cpDNA e intermediário e baixo (para ITS) quando realizados para as populações dentro das espécies *C. mantiqueirae* e *C. brevipedunculata*, enquanto que para *C. coccinea* e a espécie da região Sul da Serra do Mar foram muito altos, exceto para o ITS para esta última espécie. A forte estruturação entre populações pode estar relacionada ao fato de que segundo Hamrick e Nason (1996), o fluxo gênico é o fator que diminui a estrutura genética enquanto que a colonização por efeito do fundador causa o aumento da estrutura. Portanto, a colonização de outras áreas de montanhas pode ter sido responsável pela alta estruturação para as espécies *C. coccinea* e a do Sul da Serra do Mar, potencializada pela ampla distribuição geográfica das mesmas. O dendrograma obtido concorda parcialmente com os resultados das análises filogenéticas do capítulo 2 e com a rede de haplótipos discutida a seguir. Isso provavelmente pode estar relacionado às diferentes abordagens utilizadas em cada uma das análises. Um fato interessante a ser destacado foi que as populações do Espírito Santo (*C. wittigiana* e DMES) emergiram como um grupo diferente dos demais. Isso pode ter relação ao fato de que se trata de espécies simpátricas (FOWLIE, 1987). Entretanto, em nenhuma das outras análises essas populações demonstraram estar proximamente relacionadas. O fato dos marcadores microssatélites serem altamente polimórficos pode ter colaborado para detectar certa semelhança entre as espécies.

3.4.3 Fluxo gênico via pólen x via sementes

O fluxo gênico em plantas é caracterizado pela dispersão de genes via pólen e sementes, que são altamente dependentes de agentes polinizadores e da época do ano, respectivamente (PETIT et al., 2005). Portanto, tanto as sementes quanto o pólen desempenham papéis fundamentais na dinâmica e manutenção das populações, pois as sementes contribuem tanto para a colonização de novas populações quanto para o fluxo gênico, enquanto que o pólen contribui para o fluxo gênico (KARTZINEL et al., 2013). A proporção de dispersão de pólen x sementes foi muito baixa quando se considera todas as populações amostradas. Entretanto, ela foi significativamente maior para a espécie *C. coccinea* (na análise entre populações dentro de espécies) comparada com as espécies *C. mantiqueirae* e *C. brevipedunculata*. Entretanto, em estudos semelhantes com espécies de orquídeas foram encontrados valores consideravelmente maiores, podendo ser >100 a eficiência do fluxo gênico via pólen x sementes (PINHEIRO et al., 2011; KARTZINEL et al., 2013). Para orquídeas são esperados níveis baixos dessa proporção fluxo gênico via pólen x semente devido ao fato de que os agentes polinizadores geralmente limitam sua área de forrageamento à pequenas distâncias, comparadas às longas distâncias que as sementes de orquídeas podem alcançar pela ação do vento (TREMBLAY et al., 2005; PHILLIPS et al., 2012). Portanto, isso seria uma forte evidência para o fato pelo qual os níveis de F_{ST} das regiões dos cpDNA dessas espécies foram mais baixos, sendo que uma das populações de *C. mantiqueirae* se encontra na Serra do Mar e a outra na Serra da Mantiqueira, enquanto que as populações de *C. brevipedunculata* são encontradas em afloramento de rochas desconectos entre si. Além disso, a baixa diferenciação genética entre populações de uma mesma espécie, no caso do cpDNA, pode ser resultado da retenção de polimorfismo ancestral e não de fluxo gênico (MADDISON; KNOWLES, 2006). Para a espécie *C. coccinea* a proporção de oito vezes maior eficiência do fluxo de pólen x semente pode estar relacionada ao grande número de populações amostradas para essa espécie em comparação com as outras espécies. Uma porção significativa das populações amostradas, localizadas na Serra do Mar em São Paulo apresentam curtas distâncias entre si, indicando um importante papel do agente polinizador, na conectividade dessas populações.

3.4.4 Diversificação do clado *C. coccinea* em Paleocenários

O fato das redes de haplótipos mostrarem resultados muito semelhantes entre si, apesar de se tratarem de diferentes regiões, incluindo a região *ITS*, corrobora com a alta estruturação

encontrada entre espécies (Figura 3.3 a 3.7). As diferentes espécies raramente compartilham os mesmos haplótipos, exceto pela região *atpI/atpH* onde a espécie *C. mantiqueirae* compartilha o mesmo haplótipo ancestral com a espécie referente à espécie da população DMES. A topologia da árvore filogenética das regiões de cpDNA já haviam sugerido uma relação mais próxima entre as duas espécies. A proximidade entre essas espécies pode ser observada também para a rede de haplótipos da região *rpL32/trnL* e *ITS*. Esses resultados podem sugerir uma expansão de populações do Norte, representada pela espécie do Espírito Santo (DMES) para o Sul, em locais onde se encontram a espécie *C. mantiqueirae*. Essa observação, portanto, corrobora em parte com a hipótese de Carnaval e Moritz (2008) e Carnaval et al. (2009) de que refúgios em áreas mais ao norte da FAB se expandiram para o Sul assim que as condições se tornaram mais favoráveis. Além disso, os índices de diversidade genética mais altos relatados para as espécies *C. coccinea* e *C. brevipedunculata*, sugerindo que possam se tratar de espécies mais antigas que as demais, foi corroborado pela rede de haplótipos uma vez que o padrão de expansão pode ser observado para os haplótipos ancestrais das duas espécies rodeado pelos haplótipos derivados, sendo essa característica mais evidente para a região ITS (Figura 3.7).

Entretanto, a análise de estimativa de tempo de divergência sugere que *C. brevipedunculata*, restrita ao campo rupestre da Serra do Espinhaço, e *C. wittigiana* da FAB do Espírito Santo, podem ter se originado entre o Plioceno e o Pleistoceno (Figura 3.8). O fato da espécie da Serra do Espinhaço ter se originado há mais tempo tem relação aos estudos anteriores com espécies do gênero *Cattleya* série *Parviflorae*, endêmicas dos campos rupestres da Serra do Espinhaço (GUSTAFSSON; VEROLA; ANTONELLI, 2010; ANTONELLI et al., 2010). Esses autores estimaram que o início da diversificação dessas espécies ocorreu no Mioceno Médio ao Superior (por volta de 14 e 11 milhões de anos). O Mioceno Médio (15 milhões de anos) foi marcado por profundas modificações com o resfriamento global e a formação das geleiras até 11 milhões de anos (ZACHOS; DICKENS; ZEEBE, 2008). Portanto, nesse período as alterações na paisagem se caracterizaram pela expansão das áreas de savana e campos abertos e a subsequente retração em períodos mais úmidos (PIRANI et al., 1994). Adicionalmente, os estudos detectaram que os outros clados das espécies da série *Parviflorae* surgiram no Plioceno e Pleistoceno, corroborando, portanto, com o resultado obtido para *C. brevipedunculata*.

Para as demais espécies do clado, a diversificação provavelmente ocorreu durante o Pleistoceno, sendo que o ramo onde emerge a espécie *C. coccinea* e a espécie “DMES” do Espírito Santo surge como o segundo mais antigo. O Espírito Santo é considerado o estado

com a maior diversidade de orquídeas do Brasil (RUSCHI, 1996; PEREIRA; RIBEIRO, 2004). Uma área de refúgio localizada mais ao norte do estado do Espírito Santo junto com a região Sul da Bahia fazem parte do refúgio reconhecido por Carnaval et al. (2009). Apesar de habitarem regiões mais ao sul desse local, as espécies *C. wittigiana* e a espécie “DMES” ainda assim se encontram em um cenário que sofreu profundas modificações no Plioceno e Pleistoceno e que moldaram a atual diversidade encontrada na região como as observadas nos estudos de Grazziotin et al. (2006), Cabanne et al. (2008) e Thomé et al. (2010).

As oscilações climáticas ocorridas no Pleistoceno influenciaram também grande parte da diversidade encontrada atualmente em estudos de espécies animais e vegetais na América do Sul, de acordo com o levantamento de Turchetto-Zolet et al. (2013). Com isso, o resultado para as outras espécies do clado *C. coccinea* concorda com estudos de espécies de plantas que se diversificaram no Pleistoceno devido aos ciclos de expansão e contração de florestas, permitindo assim a ocorrência de eventos vicariantes como: Lorenz-Lemke et al. (2010); Ribeiro et al. (2011) ambos da FAB; do Bioma Cerrado Collevatti et al. (2012) e Bonatelli et al. (2014).

Apesar da carência de estudos mais detalhados para esclarecer os impactos da dinâmica das flutuações climáticas do Pleistoceno na FAB e na Serra do Espinhaço, sabe-se porém da natureza cíclica das flutuações climáticas do Pleistoceno, alternando períodos mais secos e frios com a retração das florestas e expansão nos períodos mais quentes e úmidos (BEHLING 1995, 2002; BEHLING; NEGRELLE, 2001). A ocorrência do aumento do tamanho efetivo populacional foi para todas as espécies do clado *C. coccinea* sendo relacionadas ao Pleistoceno, entretanto, essa expansão é mais acentuada para a espécie *C. coccinea* (Figura 3.9). As datas aproximadas para os eventos de expansão populacional das espécies: espécie “DMES” ~450 mil anos; *C. coccinea* e *C. mantiqueirae* ~350 mil anos; *C. brevipedunculata*, a espécie do Sul e a espécie “SJSP” ~250 mil anos e *C. wittigiana* ~150 mil anos coincide com períodos glaciais e não interglaciais do estágio Ioniano (ou Pleistoceno Médio ~781 a 126 mil anos) (GIBBARD; VAN KOLFSCHOTEN, 2004; HEAD; GIBBARD, 2005). Esse fato sugere que provavelmente essas espécies estão sujeitas aos mesmos mecanismos de expansão observados para espécies da Serra do Espinhaço (RIBEIRO et al., 2014) e para espécies da FAB (LEDRU et al., 2007; LORENZ-LEMKE et al. (2010); AMARO et al., 2011) que ocorrem em altitude. Nesse cenário as florestas se retraíram e os campos abertos predominavam durante as eras do gelo do Pleistoceno. Entretanto, essa informação deve ser vista com cautela uma vez que para a análise utilizou-se apenas regiões de cpDNA. De acordo

com Eytan e Hellberg (2010) e Amaral et al. (2013), ao se utilizar marcadores citoplasmáticos e nucleares separadamente acontecimentos demográficos específicos podem ser perdidos.

3.4.5 Implicações para a conservação

Todas as informações levantadas nesse capítulo e no capítulo 2 são importantes ferramentas para auxiliar em programas de conservação das espécies do ameaçado clado *C. coccinea*. Pelo fato de apresentarem alto valor ornamental e de que a área de ocorrência das espécies coincide com áreas de elevada concentração antrópica, recomenda-se, portanto, a conservação “in situ” e “ex situ” para todas as sete espécies do clado *C. coccinea*. Adicionalmente, devido ao alto grau de endemismo, as espécies *C. wittigiana*, a espécie referente às populações DMES e SJPS que ocorrem nos estados do Espírito Santo e São Paulo, respectivamente, devem ter prioridade de conservação. Outra razão para a conservação além do endemismo está relacionada à observação de que são populações pequenas comparadas às outras espécies do clado, demandando portanto, grande esforço de amostragem das espécies devido aos locais de ocorrência de difícil acesso. As espécies do Espírito Santo são as que mais sofrem a ação predatória humana devido à grande ocorrência de coletas indiscriminadas diminuindo o tamanho das populações naturais. Coletas dessa natureza geram prejuízos irreparáveis quanto a diversidade genética, uma vez que a diversidade é a ferramenta básica para garantir a sobrevivência de espécies a longo prazo.

As populações das espécies *C. brevipedunculata* e *C. coccinea* também têm prioridade de conservação devido ao alto índice de diversidade genética que apresentaram. Apesar de possuir ampla distribuição geográfica, a espécie *C. coccinea* ocorre próxima às duas maiores metrópoles do país: São Paulo e Rio de Janeiro. Portanto, essas populações sofrem constantemente as consequências das ações antrópicas. Para a conservação “ex situ” recomenda-se estratégias e manutenção dos bancos de germoplasma. Isso porque as espécies do clado ocorrem em áreas de altitude caracterizadas pela alta umidade relativa do ar e clima temperado, requerendo, portanto, condições especiais de microclima nos bancos de germoplasma onde essas espécies forem inseridas.

3.5 Conclusões

As espécies do clado *C. coccinea* apresentam moderados e altos níveis de diversidade genética dentro das populações, com destaque para *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* que apresentaram os maiores níveis e moderada estruturação entre populações da mesma espécie. O fluxo gênico via pólen demonstrou ser mais eficiente para a espécie *C. coccinea*. Eventos de expansão populacional foram observados para as espécies *C. mantiqueirae* proveniente da espécie “DMES” indicando expansão Norte-Sul. O outro evento foi observado para a espécie *C. brevipedunculata* que se expandiu de uma área continental para uma área costeira, como no caso da espécie NFPRJ. As oscilações do Pleistoceno serviram de cenário para a diversificação de grande parte das espécies do clado. Sendo o tamanho efetivo populacional de cada espécie também influenciado pelas condições do Pleistoceno. Sugerindo inclusive que tais expansões populacionais tenham ocorrido em períodos glaciais e não interglaciais. Todos esses resultados servem como importantes ferramentas para estratégias de conservação das espécies ameaçadas do clado *C. coccinea*.

Referências

- ALMEIDA, F.F.; CARNEIRO, C.D.R. Origem e evolução da Serra do Mar. **Revista Brasileira de Geociências**, São Paulo, v. 28, n.2, p. 135-150, 1998.
- ALMEIDA, P.R.M. **Genética da conservação e associação micorrízica em populações de *Cattleya labiata* Lindl. e *C. warneri* T. Moore (Orchidaceae)**. 2013. 190p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2013.
- AMARAL, F.S.R.; ALBERS, P.K.; EDWARDS, S V.; MIYAKI, C Y. Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic Forest antbirds (*Myrmeciza*). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 22, p. 3996-4013, 2013.
- AMARO, R.C.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; CARNAVAL, A.C. Demographic processes in the montane Atlantic rainforest: Molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 62, p. 880-888, 2012.
- ANTONELLI, A.; VEROLA, C.F.; PARISOD, C.; GUSTAFSSON, A.L.S. Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae:Laeliinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 100, p. 596-606, 2010.
- ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. Tansley review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, New Jersey, v. 145, p. 367-421, 2000.

AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 36, p 3-15, 2009.

AVISE, J.C. Phylogeography: **The History and Formation of Species**. Cambridge: Cambridge Harvard University Press. 2000. 447p.

BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A. M. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 16, p. 37, 1999.

BATALHA-FILHO, H.; MIYAKI, C.Y. Filogeografia da Mata Atlântica. **Revista da Biologia**, São Paulo, v.7, p. 31-34 , 2011.

BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A. M.; CAMPOS, L.A.O.; TAVARES, M.G.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. **Apidologie**, New York, p. 534-547, 2010.

BEHLING, H. Carbon storage increases by major forest ecosystems in tropical South America since the Last Glacial Maximum and the early Holocene. **Global and Planetary Change**, Amsterdam, v. 33, p. 107-116, 2002.

BEHLING, H.; NEGRELLE, R.R.B. Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, Southern Brazil, during the Late Quaternary. **Quaternary Research**, Amsterdam, v. 56, p. 383-389, 2001.

BONATELLI, I.A.S.; PEREZ, M.F. ; TOWNSEND, P.A.; TAYLOR, N.P.; ZAPPI, D. C.; MACHADO, M.C.; KOCH, I.; PIRES, A.H.C.; MORAES, E. M. Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, p. 3044-3063, 2014.

BROWN, K.S.; AB'SÁBER, A. N. Ice - ages forest refuges and evolution in the neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological, and pedological data with modern biological endemism. **Paleoclimas**, São Paulo, v. 5, p. 1-30, 1979.

CABANNE, G.S.; SANTOS, F.R.; MIYAKI, C.Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 91, p. 73-84, 2007.

CABANNE, G.S.; D'HORTA, F.M.; SARI, E.H.R.; SANTOS, F.R.; MIYAKI, C.Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematic implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 49, p. 760-773, 2008.

CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 35, p. 1187-1201, 2008.

CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES,

M.T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. **Science**, New York, v. 323, p. 785-789, 2009.

CONCEIÇÃO, A.A.; PIRANI, J.R. Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: Substrato, composição florística e aspectos estruturais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 23, p. 85-111, 2005.

COSTA, L.P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 30, p. 71-86, 2003.

COYNE, J.A, ORR, H.A. **Speciation**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 2004. 545p.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; TELLES, M.P.C, BONATTO, S.; EIZIRIK, E.; FREITAS, T.R.O.; DE MARCO, P.; SANTOS, F.R.; SOLE-CAVA, A .; SOARES, T.N. Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 35, p. 753-763, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. **Phytochemical Bulletin**, London, v. 19, p. 11-15, 1987.

DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS. O.G . Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 22, p. 1185-1192, 2005.

DRUMMOND , A. J.; RAMBAUT , A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 214, 2007.

DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 29, p.1969-1973, 2012.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, London, v.5, p. 435-445, 2004.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.10, p. 564-7, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Bethesda, v. 131, p. 479-91, 1992.

EYTAN, R.I.; HELLBERG, M.E. Nuclear and mitochondrial sequence data reveal and conceal different demographic histories and population genetic processes in Caribbean reef fishes. **Evolution**, Oxford, v.64, p. 3380-3397, 2010.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null allele. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.7, p. 574-578, 2007.

FOWLIE, J.A. A contribution to a monographic revision of the genus *Sophranitis* Lindl. **Orchid Digest**, Santa Barbara, v. 51, p. 15- 32, 1987.

GENTRY, A.H.; DODSON, C.H. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Washington, v. 74, p. 205-233, 1987.

GIBBARD, P.; VAN KOLFSCHOTEN, T. The Pleistocene and Holocene epochs. In: GRADSTEIN, F.M.; OGG, J.G.; SMITH, A.G. (Eds.) **A Geologic Time Scale**. Cambridge University Press, 2004. p. 441-452

GIULIETTI, A.M.; PIRANI, J.R.; HARLEY, R.M. Espinhaço range region, eastern Brazil. In: DAVIS, S.D.; HEYWOOD, V.H.; HERRERA-MACBRYDE, O.; VILLA-LOBOS, J.; HAMILTON, A.C. (Eds.). **Centres of plant diversity: A guide and strategies for the conservation**. Cambridge: IUCN Publication Unity, 1997. v. 3, p. 397-404.

GIVNISH, T.J. Ecology of plant speciation. **Taxon**, Bratislava, v. 59, p. 1326-1366, 2010.

GOUDET, J. FSTAT: A computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 86, p. 485-486, 1995.

GRAZZIOTIN, F.G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S.L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 3969-3982, 2006.

GUSTAFSSON, A.L.S.; VEROLA, C.F.; ANTONELLI, A. Reassessing the temporal evolution of orchids with new fossils and a Bayesian relaxed clock, with implications for the diversification of the rare South American genus *Hoffmannseggella* (Orchidaceae: Epidendroideae). **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 10, p. 177, 2010.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, New York, v. 165, p. 131-137, 1969.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. (Eds.). **Conservation genetics: case histories from nature**. Chapman and Hall, New York, 1996. p. 281-304.

HAMRICK, J.L., NASON, J.D. Consequences of dispersal in plants. In: RHODES JR, O.E.; CHESSER, R.K.; SMITH, M.H. (Eds.). **Population dynamics in ecological space and time**. Chicago: Chicago University Press, 1996. p. 203-236

HAMRICK, J.L., GODT, M.J.W.; MURAWSKI, D.A.; LOVELESS, M.D. Correlations between species traits and allozyme diversity: in implications for conservation biology. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (Eds.). **Genetic and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 75-86,

HARLEY, R.M. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae), and its relatives, in Brazil. In: VANZOLINI, P.E.; HEYER, W.R. (Eds.). **Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p. 71-120

HARLEY, R.M. Introduction. In: STANNARD, B.L. (Ed.). **Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia**. London: Royal Botanic Gardens, 1995. p. 1-40.

HEAD, M.J.; GIBBARD, P.L. Early-Middle Pleistocene transitions: an overview and recommendation for the defining boundary. In: HEAD, M.J.; GIBBARD P.L. (Eds.). **Early-Middle Pleistocene transitions: the land-ocean evidence**. Geological Society of London, London: Special Publication, 2005. v. 247, p. 1-18,

KARTZINEL, T. R.; SHEFFERSON, R.P.; TRAPNELL, D.W. Relative importance of pollen and seed dispersal across a Neotropical mountain landscape for an epiphytic orchid. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 22, p. 6084-6059, 2013.

KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.30, p. 3059-3066, 2002.

KATOH, K.; TOH, H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 9, p. 286-298, 2008.

KHANLOU, K.M.; VANDEPITTE, K.; ASL, L.K.; BOCKSTAELE, E.V. Towards an optimal sampling strategy for assessing genetic variation within and among white clover (*Trifolium repens* L.) cultivars using AFLP. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 252-258, 2013.

LEAL, B. **Detecção de zona híbrida entre *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* (Orchidaceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, utilizando microssatélites e análise morfométrica**. 2013. 83p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

LEDRU, M.P.; SALATINO, M.L.F.; CECCANTINI, G.; SALATINO, A.; PINHEIRO, F.; PINTAUD, J.C. Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. **Diversity and Distributions**, New Jersey, v. 13, p. 761-771, 2007.

LELES, B. P.; CHAVES, A. V.; RUSSO, P.; BATISTA, J. A. N.; LOVATO, M. B. Genetic Structure Is Associated with Phenotypic Divergence in Floral Traits and Reproductive Investment in a High-Altitude Orchid from the Iron Quadrangle, Southeastern Brazil. **Plos One**, San Francisco, 2015. No Prelo.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0, 2001. Disponível em: <<http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda>> Acesso em: 29 jun. 2012.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LI, Y.; LIU, P.; Y, L.I. Intraspecific variation of *Achyranthes bidentata* (Amaranthaceae) in the geo-authentic product area based on internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA. **Australian Journal of Crop Science**, Southern Cross, v. 6, p. 1655-1660, 2012.

LORENZ-LEMKE, A. P.; TOGNI, P. D.; MÄDER, G.; KRIEDT, R. A.; STEHMANN, J. R.; SALZANO, F. M.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 5240-5251, 2010.

MADDISON, W.P.; MADDISON, D. R. **Mesquite, D.R. A modular system for evolutionary analysis**. Version 2.75. 2011. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>>. Acesso em: 5 out. 2013.

MADDISON, W.P.; KNOWLES, L.L. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. **Systematic Biology**, Oxford, v. 55, p. 21-30, 2006.

MARTINS, F.M.; TEMPLETON, A.R.; PAVAN, A.C.O.; KOHLBACH, B.C.; MORGANTE, J.S. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 9, p. 294, 2009.

MILLER, M.P. TFGPA Version 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. **Department of Biological Sciences**, Northern Arizona University, p. 30, 1997.

MORITZ, C.J.L.; PATTON, C.J.; SCHNEIDER, T.; SMITH, B. Diversification of rainforests faunas: an integrated molecular approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 31, p.533-563, 2000.

MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. **Systematic Biology**, Oxford, v.51, p. 238-254, 2002.

MOURA, T.M.; SEBBENN, A.M.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; OLIVEIRA, G.C.X.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimados por meio de locos microssatélites. **Scientia forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 82, p. 143-150, 2009.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, Oxford, v. 403, p. 853-858, 2000.

NOVELLO, M.; RODRIGUES, J.F.; PINHEIRO, F.; OLIVEIRA, G.C.X.; VEASEY, E.A.; KOEHLER, S. Simple-sequence repeat markers of *Cattleya coccinea* (Orchidaceae), an endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.12, p. 3274-3278, 2013.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; FONTES, M.A.L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, New Jersey, v. 32, p.793-810, 2000.

OTERO, J.T.; FLANAGAN, N.S. Orchid diversity-beyond deception. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 21, p. 64-65, 2006.

PALMA-SILVA, C.; LEXER, C.; PAGGI, G.M.; BARBARA, T.; BERED, F.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. **Heredity**, London, v. 103, p. 503-512, 2009.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 28-295, 2006.

PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.I.; WAITE, A.N.; MORANDO, M.; YASSUDA, Y.Y.; SITES, J.W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 85, p. 13-26, 2005.

PEREIRA, U.Z.; RIBEIRO, L.F. Caracterização de comunidades de Orchidaceae em fragmentos de Floresta Ombrófila Densa Montana, em diferentes estágios de regeneração em Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil. **Natureza online**, Santa Teresa, v.2, n.2, p.52-60, 2004.

PERRIER, X.; FLORI, A.; BONNOT, F. Data analysis methods. In: HAMON, P.; SEGUIN, M.; PERRIER, X.; GLASZMANN, J.C. (Eds.). **Genetic diversity of cultivated tropical plants**. Montpellier : Enfield, Science Publishers, 2003.p. 43-76.

PETIT, R.J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G.G. Comparative organisation of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 689-701, 2005.

PHILLIPS, R.D.; DIXON, K.W.; PEAKALL, R. Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, p. 5208-5220, 2012.

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; MUNT, D.D.; BARROS, F.; FÉLIX, L.P.; FAY, M. F.; PALMA-SILVA, C. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, p. 49, 2014.

PINHEIRO, F.; DE BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; FAY, M.F.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 38, p. 1923-1935, 2011.

PIRANI, J.R.; GIULIETTI, A.M.; MELLO-SILVA, R.; MEGURO, M. Checklist and patterns of geographical distribution of the vegetation of Serra do Ambrósio, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.17, p.133-147, 1994.

PORTO, T.J.; CARNAVAL, A.C.; ROCHA, P.L.B. Evaluating forest refugial models using species distribution models, model filling and inclusion: a case study with 14 Brazilian species. **Diversity and Distribution**, New Jersey, v.19, p. 330-340, 2012.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Bethesda, v. 155, p. 945-959, 2000.

RAMBAUT, A. **Tree Figure Drawing Tool**. Version 1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. 2009. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. **MCMC Trace Analysis Tool**. version 1.5.0. 2011. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

RAPINI, A.; RIBEIRO, P.L.; LAMBERT, S.; PIRANI, J.R. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Rio de Janeiro, v.4, p. 16-24, 2008.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Boston, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RIBEIRO, P. L.; RAPINI, A.; DAMASCENA, L. S.; VAN DEN BERG, C. Plant diversification in the Espinhaço Range: Insights from the biogeography of *Minaria* (Apocynaceae). **Taxon**, Bratislava, v. 63, p. 1253-1264, 2014.

RODRIGUES, J.F.; VAN DEN BERG, C.; ABREU, A.G.; NOVELLO, M.; VEASEY E, A.; OLIVEIRA, G.C.X.; KOEHLER, S. Species delimitation of *Cattleya coccinea* and *C. mantiqueirae* (Orchidaceae): insights from phylogenetic and population genetics analyses. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 301, p. 1345-1359, 2015.

RUSCHI, A. **Orquídeas do Estado do Espírito Santo**. Expressão e Cultura, Rio de Janeiro, 1986. 278 p.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, London, v. 18, p. 233-234, 2000.

SIMPSON, B.B. Quaternary biogeography of the high montane regions of South America. In: DUELLMAN, W.E. (Ed.). **The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution, and Dispersal** Monograph of the Museum of Natural History, Kansas City: University of Kansas, 1979. p.157-188

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.M.; BEDE, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica Brasileira. **Megadiversidade**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 132-138, 2005.

THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, C. F. B.; BALDISSERA JR, F. A.; ALEXANDRINO, J. M. B. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 55, p. 1018-1031, 2010.

TREMBLAY, R. L.; ACKERMAN, J.D.; ZIMMERMAN, J.K.; Calvo, R.N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 84, p. 1-54, 2005.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 22, p. 1193-1213, 2013.

VAN DEN BERG, C. Importance of hybridization for the evolution of *Cattleya*. **Renziana**, Basel, v. 4, p. 74-79, 2014.

VANZOLINI, P.E.; WILLIAMS, E.E. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria: Iguanidae). **Arquivos de Zoologia de São Paulo**, São Paulo, v. 19, p. 298, 1970.

VASCONCELOS, P.M.; BECKER, T.A.; RENNE, P.R.; BRIMHALL, G.H. Age and duration of weathering by ^{40}K - ^{40}Ar and $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$ analysis of potassium-manganese oxides. **Science**, New York, v. 258, p. 451-455, 1992.

VENCOVSKY, R. Variance of an estimate of the outcrossing rate. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 17, n.3, p. 349-351, 1994.

WANG, L.; LIU, L.M.; HOU, Y.X.; LI, L.; HUANG, S.W. Pathotypic and genetic diversity in the population of *Rhizoctonia solani* AG1-IA causing rice sheath blight in China. **Plant Pathology**, New Jersey, v. 64, p. 718-728, 2015.

WATERMAN, R.J.; BIDARTONDO, M.I. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 1085-1096, 2008.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Oxford, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 1996. 445p.

ZACHOS, J.C.; DICKENS, G.R.; ZEEBE, R.E. An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. **Nature**, London, v. 451, p. 279-283, 2008.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tanto marcadores microssatélites quanto sequências de DNA demonstraram ser eficientes ferramentas para estudos de delimitação de espécies e filogeográficos. Para o clado *Cattleya coccinea* duas linhagens principais se destacaram sendo constituídas de sete diferentes espécies. A primeira linhagem se refere às espécies *C. brevipedunculata*, predominante da Serra do Espinhaço, e *C. wittigiana*, da região norte da Serra do Mar. A outra linhagem é composta pelas espécies *C. coccinea*, *C. mantiqueirae* da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira, e três espécies novas correspondentes às populações de DMES, SJPS e populações da região Sul da Serra do Mar CSRS, JOS e PMPR. As análises de diversidade genética das espécies para o clado mostraram moderados e altos níveis de diversidade, enquanto que a estruturação foi moderada dentro de espécies. O fluxo gênico via pólen foi mais eficiente para *C. coccinea*. As espécies raramente compartilham haplótipos e *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* demonstraram ser as espécies com maior diversidade e eventos de expansão populacional. As oscilações climáticas ocorridas no Pleistoceno influenciaram na diversificação das espécies do clado. Além disso, expansões populacionais foram observadas em períodos glaciais do Pleistoceno. Todos os resultados poderão servir como ferramentas para projetos de conservação das espécies ameaçadas do complexo *C. coccinea*.